



**HAL**  
open science

# Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation

Ronald St-Louis

► **To cite this version:**

Ronald St-Louis. Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT: . tel-00636859

**HAL Id: tel-00636859**

**<https://theses.hal.science/tel-00636859v1>**

Submitted on 28 Oct 2011

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

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

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

Spécialité Neurosciences

Ecole doctorale 3C

Présentée par

**M. Ronald St-Louis**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'Université Paris VI, Pierre et Marie Curie**

Sujet de la thèse:

**Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le  
contrôle central de l'osmorégulation**

Soutenue le 16 septembre 2011

Devant le jury composé de

---

*Pr. Ann Lohof, Présidente*  
*Pr. Emmanuel Moyse, Rapporteur*  
*Pr. Anne Lorsignol, Rapporteur*  
*Dr. Olivier Bosler, Examineur*  
*Pr. Hélène Hardin-Pouzet, Directrice de thèse*

---

*Je dédie cette thèse, à mes parents, Webert et Olguina, pour  
leur support, leur amour inconditionnel, et leurs encouragements.*

*À mes demi-frères Edgar, James et Luc et à ma demie-sœur Hermina,  
pour leurs soutiens sans faille.*

*Et à tous mes ami(e)s de partout en France, sans quoi  
cette aventure au-delà des frontières de l'Amérique  
n'aurait pas été aussi agréable*

*“C’est ce que nous pensons déjà connaître qui nous  
empêche souvent d’apprendre”*

*Claude Bernard  
1813-1878*

## Remerciements

Et voilà, je rédige le dernier paragraphe de ce manuscrit après plusieurs mois d'intenses réflexions et quelques milliers de mots écrits. Pendant, que j'écris ces quelques mots, je me ressasse les huit longues années passées en France, où j'ai vécu tellement de choses que je ne sais pas par où commencer. Cette aventure a commencé en Normandie, pour au final se terminer à Paris, où j'ai eu l'immense privilège d'effectuer une thèse portant sur un domaine qui me tient particulièrement à cœur, la Neuroendocrinologie.

Par conséquent, il y a tellement de gens que je veux remercier que j'ai peur d'en oublier. Mais si tel était le cas, je m'en excuse dès à présent...

J'aimerais tout d'abord remercier les membres du jury, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma thèse de doctorat. Leur horaire étant chacun très chargé, je leur en suis très reconnaissant de m'avoir consacré un peu de leur temps.

Mes plus vives remerciements vont tout naturellement à ma directrice de thèse, le Pr. Hélène Hardin-Pouzet. Durant ces quatre dernières années, elle a su créer un environnement de laboratoire propice aux échanges et au dépassement de soi. Pour plusieurs dont moi, le laboratoire s'avérait une seconde demeure, voire même la principale, et très rares sont les fois où je rentrais à reculons les matins dans le laboratoire. Son expérience, ses connaissances et sa grande culture scientifique m'ont motivé à toujours en savoir davantage et à me poser les bonnes questions. Par son assurance, elle a su me mettre en confiance. Comme elle dit si bien: « Tu es celui qui connaît le mieux ton sujet ». À ses côtés, j'ai pu développer un esprit scientifique critique et intègre ainsi qu'une confiance en moi, éléments clés dans la carrière de chercheur. Elle a toujours été présente et disponible pour m'aider dans mes différentes démarches. Que ce soit au niveau de mes connaissances générales en neuroendocrinologie ou bien concernant mes lacunes jadis d'organisation et de présentation orale. Pour l'encadrement que j'ai reçu, pour ton côté humain, Hélène, je te remercie sincèrement pour ces quatre dernières années. Grâce à toi, mon passage dans ce laboratoire fut un réel plaisir.

Bien entendu, je remercie très sincèrement tous les membres de mon équipe : Valérie Messent, Caroline Parmentier et Danièle Raison pour leurs conseils, leur soutien, leurs encouragements et leur amitié. Merci Caro pour les petits goûters de fin d'après-midi, qui me redonnent du baume au cœur surtout après une longue journée de manips!!

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur André Calas, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire intitulé à l'époque Neurobiologie des Signaux Intercellulaires. Merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez offert au sein de l'équipe que vous avez confié rapidement par la suite aux mains du Pr. Hélène Hardin-Pouzet.

Je souhaite remercier l'équipe du Dr. Sakina Mhaouty-Kodja, qui vient récemment d'entrer en émergence avec notre équipe. Merci Sakina pour tes précieux conseils surtout pour les diapos pour mes nombreuses présentations orales. Merci à Marie, Clarisse, Lydie, pour leurs compagnies au quotidien. Good Luck à la nouvelle équipe! Je vous souhaite beaucoup de publications!

J'aimerais remercier le Pr. François Couraud de m'avoir chaleureusement accueilli au sein de l'école doctorale 3C (Cerveau-Comportement-Cognition).

Bien sûr, une pensée spéciale à tous les stagiaires que j'ai encadrés de près ou de loin au cours de ma thèse: Khuyen, Élodie, Marine, Maylis. Je dois vous remercier, car grâce à vous j'ai pu paufiner mon rôle d'encadrant, ce qui m'a permis de développer ma rigueur scientifique. Une pensée également pour Gabrielle. Ma Gapouch, notre rencontre au sein du labo n'était que trop brève, mais je me réconforte à l'idée que tu te plais maintenant en Suisse. On se reverra sur Paris bientôt...

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé quotidiennement pendant ces quelques années que ce soit les anciens et actuels doctorants du labo (Florence, Juliette, Monia, Amandine, Lydie, Anne-Claire, Vanessa, Thomas, Antoine, Jean-Baptiste, Alexandre, Victor) et les étudiants de Master (Kleanth, Farrah, Laura...et Floriane la p'tite dernière de notre équipe) grâce à qui ces années de travail ont été et sont restées un vrai plaisir quotidien.

Je tiens à remercier tous les membres de l'UMR 7224, surtout ceux du 3e étage (Christine, Marie-Jeanne, Jean-Luc, Joanna, Catherine...) pour les nombreuses conversations de couloir vraiment agréables.

Enfin, je me dois de remercier tous ceux et celles qui ont participé au maintien de ma « santé mentale » hors du labo : Luigi (Gigi pour les intimes), Karine, Kristina, Gérard (El Diablo), Aurore, Antoine, Joseph (qui s'éclate en ce moment aux States pour son post-doc), Robin, Joy, Isabelle, Brigitte, Estelle... Merci pour toutes ses soirées où j'ai pu m'évader que ce soit dans la danse, ou simplement en sirotant un *mojito* sur la place de la Bastille...

Je vous remercie tous et toutes, d'être venues dans ma vie.

## **Résumé**

Parmi les différentes fonctions du système hypothalamo-neurohypophysaire, il est notamment mis en jeu dans les voies de contrôle de l'osmolalité plasmatique et il est en particulier stimulé lors d'une déshydratation de l'organisme. Ce système reçoit des afférences provenant de la périphérie, telles que celles issues du sinus carotidien, mais aussi des informations intrinsèques au système nerveux central (SNC) en provenance de certains organes circumventriculaires. Le système de contrôle de l'osmorégulation passe par ces structures et des informations telles que l'osmolalité plasmatique peuvent être rapidement intégrées pour adapter le niveau de libération de l'arginine-vasopressine (AVP), hormone anti-diurétique qui contrôle la réabsorption de l'eau au niveau du néphron. Le noyau supraoptique (NSO), où siègent les neurones magnocellulaires synthétisant l'AVP, reçoit donc de nombreuses afférences qui modulent son activité, telles que des afférences impliquant la noradrénaline (NA), majoritaires, ainsi que des afférences aminoacidergiques qui libèrent le glutamate, l'aspartate et le GABA. Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de régulation de l'expression et de libération d'AVP par les afférences noradrénergiques. L'effet de la noradrénaline passe par une voie nitreurgique (NO) pour le contrôle de l'expression de l'AVP (Grange-Messent et al, 2004). Par ailleurs, les travaux de S. Mélik-Parsadaniantz et de son équipe ont démontré que l'expression des chimiokines, notamment la chimiokine SDF1 ainsi que son récepteur CXCR4, augmentait au cours de la déshydratation (Callewaere et al., 2006). La démonstration de la présence de chimiokines dans les neurones magnocellulaires et de leur implication au cours de la déshydratation ainsi que les résultats que nous avons obtenus sur le NO suggèrent que les médiateurs inflammatoires sont des molécules de signalisation endogènes qui participent à la chaîne de signalisation mise en jeu lors de l'osmorégulation. L'objectif de la thèse est de s'intéresser au métabolisme oxydatif dans les noyaux magnocellulaires puisque, dans les processus de plasticité post-lésionnels, les modifications de l'expression des médiateurs inflammatoires sont accompagnées de modifications de ce métabolisme et de la production de radicaux libres qualifiés d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Notre modèle d'étude est la souris C3H/HeJ adulte soumise à une hyperosmolarité plasmatique. Ce paradigme est connu pour stimuler l'axe osmorégulateur et pour causer une augmentation de l'AVP sans provoquer de stress. Dans le cas d'une stimulation hyperosmolaire chronique, les résultats obtenus montrent que lors de l'activation de l'axe osmorégulateur, démontrée par l'expression de la protéine c-Fos, la synthèse d'AVP est accompagnée d'une production d'EROs, prise en charge par la superoxyde dismutase de type 2 (SOD 2) et la catalase. Les mesures de l'osmolalité plasmatique montrent que la réponse osmorégulatrice exercée par l'AVP se met en place progressivement et qu'après 8 jours de stimulation osmotique, le système retourne au niveau contrôle montrant un nouvel équilibre allostatique. Dans le cas d'une stimulation hyperosmolaire aiguë, les EROs sont produits dès la phase précoce de l'hyperosmolarité démontrée par l'expression de c-Fos, et sont pris en charge par la SOD 2 et la catalase. De plus, cette production d'EROs est indispensable à l'augmentation de synthèse d'AVP en réponse à une hyperosmolarité plasmatique, puisqu'en présence d'un antioxydant, l'acide  $\alpha$ -lipoïque (AAL) administré avant la stimulation osmotique, il y a une inhibition de la synthèse *de novo* d'AVP.

La deuxième partie de ma thèse cherche à déterminer la place des EROs dans le contrôle exercé par les afférences noradrénergiques via le monoxyde d'azote (NO). Les résultats obtenus montrent que les souris transgéniques Tg8, qui présentent des taux élevés en NA dans le SNC, ont des niveaux de production d'EROs dans le NSO plus élevés que leurs contrôles non transgéniques, les souris C3H/HeJ, donnant une indication que la voie noradrénergique est impliquée *in vivo*. Afin de confirmer la place des EROs dans la voie de signalisation noradrénergique, nous avons analysé *ex vivo* l'effet de la NA sur des tranches d'hypothalamus maintenues en survie. Ceci nous a permis également de préciser plus avant les contributions respectives du NO et des EROs dans la voie de régulation noradrénergique de l'expression de l'AVP.

Ces résultats démontrent pour la première fois l'importance des EROs comme signaux endogènes dans la voie de régulation osmotique. Il permet de faire émerger un rôle nouveau et original des EROs en tant que médiateurs physiologiques des voies de signalisation intracellulaires.

**Mots clés** : espèces réactives de l'oxygène, noyau supraoptique, arginine-vasopressine, osmorégulation, superoxyde dismutase, catalase, noradrénaline, monoxyde d'azote

## **Abstract**

Among the various functions of the hypothalamo-neurohypophyseal system, it is particularly at stake in the control pathways of plasma osmolality and is especially stimulated during dehydration of the body. This system receives peripheral afferents, such as those from the carotid sinus, but also information intrinsic to the central nervous system (CNS) from circumventricular organs. The control system of osmoregulation gets through these structures and information such as plasma osmolality may be quickly assessed to adjust the level of release of arginine vasopressin (AVP), an anti-diuretic hormone that controls the reabsorption of water in the kidney. The supraoptic nucleus (SON), composed of magnocellular neurons synthesizing AVP, thus receives many afferents that modulate its activity, such as afferents involving noradrenaline (NA), as well as aminoacidergic afferents that release glutamate, aspartate and GABA. Our team is interested in the mechanisms regulating the expression and release of AVP by noradrenergic afferents. The effect of norepinephrine passes through a nitrenergic pathway (NO) to control the expression of AVP (Grange-Messent et al, 2004). In addition, the work of S. Parsadaniantz Malik and his team have shown that the expression of chemokines, including chemokine SDF1 and its receptor CXCR4, increased during dehydration (Callewaere et al., 2006). This demonstration of the presence of chemokines in the magnocellular neurons and their involvement in dehydration and the results we obtained on NO suggests that inflammatory mediators are endogenous signalling molecules involved in the signalling chain involved in osmoregulation. The objective of this thesis is to focus on the oxidative metabolism in the magnocellular nuclei, since in the process of post-lesional plasticity, changes in the expression of inflammatory mediators are accompanied by changes in the metabolism and the production of free radicals or reactive oxygen species (ROS).

Our study model is the adult C3H/HeJ mice subjected to plasma hyperosmolarity. This paradigm is known to stimulate the osmoregulatory axis and to cause an increase in AVP without causing stress. In the case of a chronic hyperosmolar stimulation, the results show that upon activation of the osmoregulatory axis, demonstrated by the expression of the protein c-Fos, AVP synthesis is accompanied by a production of ROS, taken in charge by superoxide dismutase type 2 (SOD 2) and catalase. Measurements of plasma osmolality indicate that osmoregulatory response exerted by AVP is set up gradually and only after 8 days of osmotic stimulation, the system returns to the control level showing a new allostatic state. In the case of an acute hyperosmolar stimulation, ROS were produced in the early phase of hyperosmolarity demonstrated by the expression of c-Fos, and are taken in charge by SOD 2 and catalase. In addition, the production of ROS is essential for the increase in AVP synthesis in response to plasma hyperosmolarity, since the presence of an antioxidant, alpha-lipoic acid (ALA) administered by osmotic stimulation, there is an inhibition of AVP synthesis.

The second part of my thesis seeks to determine the role of ROS in the control exerted by the noradrenergic afferents via the nitric oxide (NO). The results show that transgenic mice TG8, which have high rates in NA in the CNS, have levels of ROS production in the NSO higher than their non-transgenic controls, C3H/HeJ mice, giving an indication that noradrenergic pathway is involved *in vivo*. To confirm the role of ROS in the noradrenergic signaling pathway, we analyzed *ex vivo* the effect of NA on hypothalamic slices maintained in survival. This allowed us also to further clarify the relative contributions of NO and ROS in the noradrenergic regulation of the expression of AVP.

These results demonstrate for the first time the importance of ROS as endogenous signal molecules involved in osmotic regulation. From this study, a new and original role of ROS as mediators of physiological intracellular signaling pathways emerges.

**Keys words:** reactive oxygen species, supraoptic nucleus, arginin vasopressine, osmoregulation, superoxyde dismutase, catalase, noradrenaline, nitric oxide

# SOMMAIRE

<b><u>Introduction générale</u></b> .....	11
<b><u>I. Le système d'osmorégulation</u></b> .....	12
<b><u>A. Généralités</u></b> .....	12
<b><u>B. Maintien de l'homéostasie osmotique</u></b> .....	13
<b><u>C. Osmostat et structures osmosensibles</u></b> .....	16
1. <u>Système d'osmorégulation et osmostat</u> .....	16
2. <u>Structures osmosensibles</u> .....	16
2.1 <u>Structures osmosensibles périphériques</u> .....	16
2.2 <u>Structures osmosensibles centrales</u> .....	17
<b><u>II. Rôle du système hypothalamo-neurohypophysaire dans le système d'osmorégulation</u></b> .....	18
<b><u>A. Le système hypothalamo-neurohypophysaire</u></b> .....	18
1. <u>Structure</u> .....	18
2. <u>Fonction des neurohormones AVP et OT</u> .....	20
3. <u>Biologie cellulaire des neurones magnocellulaires AVP et OT</u> .....	21
<b><u>B. La plasticité neuroendocrine du système hypothalamo-neurohypophysaire</u></b> .....	23
1. <u>La plasticité neurochimique</u> .....	23
2. <u>La plasticité structurale</u> .....	24
2.1 <u>Modifications des neurones magnocellulaires</u> .....	24
2.2 <u>Modifications des neurones glutamatergiques et GABAergiques</u> .....	25
2.3 <u>Modification des astrocytes</u> .....	25
3. <u>La plasticité électrophysiologique</u> .....	26
3.1 <u>Modification des synapses GABAergiques et glutamatergiques</u> .....	26
3.2 <u>Modification de l'activité électrique générale</u> .....	27
<b><u>C. Principales voies afférentes des neurones magnocellulaires</u></b> .....	29
1. <u>Voie afférente noradrénergique</u> .....	29
1.1 <u>Effet du glutamate dans l'innervation noradrénergique</u> .....	29
1.2 <u>Effet du GABA dans l'innervation noradrénergique</u> .....	30
2. <u>Voie afférente nitrergique</u> .....	30
2.1 <u>Le monoxyde d'azote (NO) et son implication du NO dans la régulation des neurones AVP et OT</u> .....	30
2.2 <u>Modulation de la sécrétion de glutamate et du GABA par le (NO)</u> .....	31
3. <u>Autres afférences</u> .....	32

**D. Implication des chimiokines, du NMDA et du NO, et dans la régulation des neurones AVP et OT**.....32

**III. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs)**.....35

**A. Généralités**.....35

**B. La chimie des EROs**.....35

1. L'anion superoxyde :  $O_2^{\cdot-}$  .....35

2. Le peroxyde d'hydrogène :  $H_2O_2$ .....36

3. Le radical hydroxyle :  $\cdot OH$  .....36

4. Les radicaux alkyles  $R\cdot$  et peroxydes  $ROO\cdot$  .....36

5. Le NO en tant qu'espèce radicalaire.....36

**C. Effets physiologiques des EROs**.....37

1. Oxydation des protéines.....37

2. Peroxydation lipidique.....37

3. Dégradation par oxydation de l'ADN.....39

**D. Sources endogènes des EROs**.....39

1. NADPH oxydase.....39

2. La chaîne mitochondriale.....41

3. Le NO et les NO synthases (NOS).....43

**E. Prise en charge des EROs**.....43

1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....44

    1.1 La superoxyde dismutase.....44

        1.1.1 La superoxyde dismutase de type 1 (SOD 1).....44

        1.1.2 La superoxyde dismutase de type 2 (SOD 2).....45

    1.2 La catalase.....45

    1.3 La glutathion peroxydase.....45

2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....46

    2.1 Le glutathion.....46

    2.2 Autres antioxydants.....46

**F. Mécanismes d'action des EROs**.....47

1. Le système de signalisation redox.....47

2. Les EROs en tant que seconds messagers intracellulaires.....48

3. Effets pathologiques des EROs.....48

4. Théorie des radicaux libres.....49

<b><u>Résultats &amp; Discussion</u></b> .....	51
<b><u>Objectifs de l'étude</u></b> .....	51
<b><u>PARTIE 1. Implication des EROs dans le système d'osmorégulation</u></b> ....	51
<b><u>Introduction</u></b> .....	51
<b><u>Procédures expérimentales</u></b> .....	52
<u>Traitements</u> .....	52
<u>Evaluation de l'osmolalité plasmatique</u> .....	53
<u>Détection de la production d'EROs</u> .....	53
<u>Dihydroéthidine (DHE)</u> .....	53
<u>Carboxy-2'-7' dichlorofluorescéine diacétate (Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA)</u> .....	54
<u>Immunohistochimie</u> .....	55
<u>Principe de l'immunohistochimie</u> .....	55
<u>Anticorps primaires utilisés</u> .....	55
<u>Anticorps secondaires utilisés</u> .....	55
<u>Analyse par RT-PCR quantitative</u> .....	55
<u>Extraction des ARN</u> .....	55
<u>RT-qPCR</u> .....	56
<u>Synthèse d'ADNc</u> .....	56
<u>Amplification en temps réel</u> .....	56
<u>Électrophorèse et Immunoblot</u> .....	57
<u>Mesure de l'activité enzymatique des enzymes anti-oxydants</u> .....	58
<u>Administration de l'acide alpha lipoïque (AAL) et immunomarquage de l'AVP</u> .....	60
<b><u>Résultats</u></b> .....	62
<u>Synthèse des résultats obtenus dans l'article 1</u> .....	62
<b><u>PARTIE 2. Rôle des afférences noradrénergiques (NA) et nitrergiques (NO) dans la régulation de la production des EROs dans le noyau supraoptique (NSO)</u></b> .....	89
<b><u>Introduction</u></b> .....	92
<b><u>Matériels et méthodes</u></b> .....	94
<u>Méthode <i>in vivo</i> : Analyse des souris Tg8</u> .....	94
<u>Animaux</u> .....	94
<u>Traitements pharmacologiques</u> .....	95
<u>Quantification de la production d'EROs</u> .....	95
<u>Immunomarquage des enzymes anti-oxydantes</u> .....	96
<u>Méthode <i>ex vivo</i> : Analyse de tranches d'hypothalamus</u> .....	96
<u>Préparation des tranches hypothalamiques</u> .....	96
<u>Traitements pharmacologiques</u> .....	97
<u>Détection <i>ex vivo</i> de EROs</u> .....	97
<u>Dihydroéthidine (DHE)</u> .....	97
<u>Blocage de la voie des EROs : Acide alpha lipoïque (AAL)</u> .....	98
<u>Immunomarquage de l'AVP</u> .....	98

<u>Analyse statistique</u> .....	98
<b><u>Résultats</u></b> .....	99
<b><u>Discussion</u></b> .....	101
<b><u>Discussion générale</u></b> .....	106
<b><u>Conclusion-Perspectives</u></b> .....	113
<b><u>Annexe</u></b> .....	116
<b><u>Références bibliographiques</u></b> .....	117

## Abréviations

<b>AAL :</b>	acide $\alpha$ -lipoïque
<b>AMPA :</b>	acide aminométhylphosphonique
<b>ARNm :</b>	acide ribonucléique messenger
<b>AVP :</b>	arginine-vasopressine
<b>BHE :</b>	barrière hémato-encéphalique
<b>BSA :</b>	sérum albumine bovine
<b>Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA :</b>	carboxy-2'-7' dichlorofluorescéine diacétate
<b>DHE :</b>	dihydroéthidine
<b>EROs :</b>	espèces réactives de l'oxygène
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	peroxyde d'hydrogène
<b>GABA :</b>	acide $\gamma$ -aminobutyrique
<b>GAPDH :</b>	glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
<b>LCA :</b>	liquide céphalo-rachidien artificiel
<b>L-NAME :</b>	L-nitro -arginine méthyl ester
<b>MnPO :</b>	aire préoptique médiane
<b>NA :</b>	noradrénaline
<b>NMDA :</b>	N-méthyl- D-aspartate
<b>NSO :</b>	noyau supraoptique
<b>NO :</b>	monoxyde d'azote
<b>NOS :</b>	NO synthase
<b>NOX :</b>	NADPH oxydase
<b>NPV :</b>	noyau paraventriculaire
<b>NTS :</b>	noyau du tractus solitaire
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup> :</b>	anion superoxyde
<b>·OH :</b>	ion hydroxyle
<b>OVLt :</b>	organe vasculaire de la lame terminale
<b>OT :</b>	ocytocine
<b>PFA :</b>	paraformaldéhyde
<b>SNC :</b>	système nerveux central

**SNP :** sodium nitroprusside  
**pOsm :** osmolalité plasmatique  
**SFO :** organe subfornical  
**SOD :** superoxyde dismutase

## Valorisation du travail de thèse

### Publications

St-Louis R, Parmentier C, Raison D, Grange-Messent V, Hardin-Pouzet H. (2011) **Reactive oxygen species are required for the hypothalamic osmoregulatory response.** *Endocrinol.* (Soumis)

St-Louis R, Parmentier C, Raison D, Grange-Messent V, Hardin-Pouzet H. (2011) **Reactive oxygen species act as signalling mediators in the noradrenergic control of AVP expression** (En préparation)

Vacher CM, Grange-Messent V, St-Louis R, Raison D, Lacorte JM, Hardin-Pouzet H. (2011) **The neuroendocrine hypothalamus architecture is controlled by monoamines.** *J. Neurosci. Res.* In press

### Communications affichées

- 2009 : 36<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie SNE (Nice, France)

**Hyperosmolarité, plasticité du noyau supraoptique et radicaux libres**  
ST-LOUIS R., GRANGE-MESSENT V., RAISON D., HARDIN-POUZET H.

- 2010 : Colloque de l'école doctorale 3C (Roscoff, France)

**Implication des radicaux libres dans la plasticité neuroendocrine du noyau supraoptique de l'hypothalamus**  
ST-LOUIS R., PARMENTIER C., HARDIN-POUZET H.

- 2010 : 7<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience FENS (Amsterdam, Pays-Bas)

**Effects of chronic and acute hyperosmotic stimulus on free radicals in the supraoptic nucleus in mice**  
ST-LOUIS R., GRANGE-MESSENT V., RAISON D., HARDIN-POUZET H.

- 2010 : 7<sup>th</sup> International Congress of Neuroendocrinology ICN (Rouen, France)

**\*Free radicals in the neuroendocrine plasticity in the supraoptic nucleus after chronic and acute hyperosmotic stimulus**  
ST-LOUIS R., GRANGE-MESSENT V., RAISON D., HARDIN-POUZET H.  
*\*Communication affichée nominée pour le prix « Servier » 2010*

- 2010 : Xème Colloque International IFR 83 "Oxidative Metabolism in Health and Diseases" (Paris, France)

**Free radicals in the neuroendocrine plasticity in the supraoptic nucleus after chronic and acute hyperosmotic stimulus**  
ST-LOUIS R., GRANGE-MESSENT V., RAISON D., HARDIN-POUZET H.

## Liste des figures et tableaux

- Figure 1 :** Phénomène d'osmose dans les compartiments intra- et extracellulaires
- Figure 2 :** Principe de base de l'osmorégulation : équilibre entre le niveau de  $\text{Na}^+$  et le niveau d'eau
- Figure 3 :** Le système rénine-angiotensine-aldostérone
- Figure 4:** Schéma des différentes afférences périphériques et centrales vers le complexe hypothalamo-neurohypophysaire
- Figure 5:** Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire
- Figure 6:** Schéma montrant les mécanismes de réabsorption de l'eau et du sodium  $\text{Na}^+$  au niveau du rein
- Figure 7:** Organisation structurale et transcription des gènes codant les deux neuropeptides du système hypothalamo-neurohypophysaire : AVP et OT.
- Figure 8:** Phénomène de potentialisation à long terme (LTP) dans des terminaisons glutamatergiques dans le noyau supra-optique induite sur des coupes hypothalamiques de cerveau de rat
- Figure 9:** Électrophysiologie des neurones à AVP
- Figure 10:** Schéma de principe montrant la mise en jeu de diverses afférences et composantes cellulaires dans la régulation de l'expression de l'AVP
- Figure 11:** Les principales sources cellulaires des EROs.
- Figure 12:** Schéma représentant la chaîne respiratoire au niveau de la membrane mitochondriale
- Figure 13:** Schéma montrant les diverses réactions impliquant soit les EROs soit les enzymes anti-oxydants
- Figure 14:** Schéma représentatif des événements cellulaires par la production aiguë ou chronique d'EROs par la cellule
- Figure 15:** Protocole expérimental pour l'induction d'une hyperosmolarité chronique
- Figure 16:** Protocole expérimental pour l'induction d'une hyperosmolarité aiguë
- Figure 17:** Mode d'action de la dihydroéthidine (DHE)
- Figure 18:** Schéma du mode d'action du kit de dosage de la superoxyde dismutase (SOD)
- Figure 19:** Protocole expérimental pour le traitement à l'acide  $\alpha$ -lipoïque dans le cas d'une hyperosmolarité aiguë
- Figure 20:** Description du modèle Tg8
- Figure 21:** Taux cérébraux de noradrénaline (NA) et de sérotonine (5-HT) chez les souris C3H et Tg8
- Figure 22:** Schéma représentatif de la chambre d'incubation pour le maintien des tranches de cerveau en survie
- Figure 23 :** Bilan du mécanisme de régulation de l'expression de l'AVP impliquant les EROs
- Figure 24 :** Bilan du mécanisme de régulation de l'expression de l'AVP impliquant les EROs, la NA et le NO
- Tableau 1 :** Les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques
- Tableau 2 :** Principales espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres impliqués dans les réactions d'oxydation de l'ADN
- Tableau 3 :** Séquences des primers

## *Données bibliographiques*

## **Introduction générale**

Concept initialement élaboré et défini par Claude Bernard, l'homéostasie est « la capacité de l'organisme à maintenir un état de stabilité relative des différents composants de son milieu interne, et ce, malgré les changements constants de l'environnement externe ». L'environnement interne de notre organisme est le siège d'innombrables et continuels changements lesquels provoquent des déséquilibres. Si les cellules ne réussissent pas rapidement à rétablir l'équilibre interne en effectuant les actions compensatoires appropriées, un déséquilibre majeur que nous appellerons "la maladie" est inévitable.

Le centre de contrôle du maintien de l'homéostasie cellulaire se trouve principalement au niveau de l'hypothalamus situé sous le thalamus, le long des parois du 3<sup>e</sup> ventricule. Bien qu'il ne représente qu'1% de la masse du cerveau, il constitue le principal centre intégrateur de la régulation endocrine et de la vie végétative de l'organisme. En effet, l'hypothalamus joue un rôle soit directement, ou indirectement dans l'équilibre des paramètres physico-chimiques du milieu intérieur (température, osmolarité...), dans l'ensemble des fonctions végétatives (contrôle des activités cardiaque, respiratoire...), dans les différents métabolismes, dans certains comportements liés à la survie (prise alimentaire, prise de boisson) et dans la perpétuation des espèces (comportement reproducteur, sexualité). Son importance physiologique réside donc dans sa capacité à coordonner des réactions régulatrices ou à transformer des pulsions en comportements orientés. Cette fonction repose sur la capacité de l'hypothalamus à être informé des variations des conditions internes et externes pouvant perturber le milieu intérieur, ainsi que sa capacité à mettre en jeu une grande variété de réponses effectrices. Ainsi, l'hypothalamus établit un lien spécifique entre le système nerveux et le système hormonal, les deux systèmes de communication intercellulaire de l'organisme.

## I. Le système d'osmorégulation

### A. Généralités

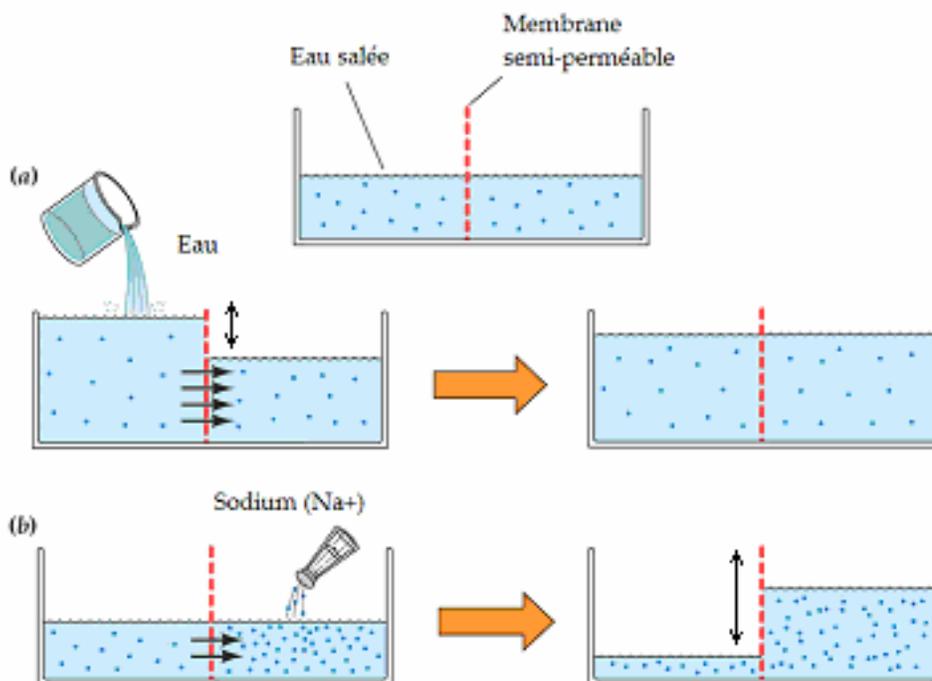
L'osmose est un phénomène de diffusion de la matière mis en évidence lorsque des molécules d'eau (ou de solvant de façon plus générale) traversent une membrane semi-perméable qui sépare deux liquides dont les concentrations en produits dissous (les solutés) sont différentes.

Chez les mammifères, l'équilibre hydrique est généralement couplé à l'équilibre minéral sous le terme « d'équilibre hydrominéral ». L'eau et certains sels minéraux comme notamment le chlorure de sodium (NaCl) sont interdépendants en ce qui concerne leur répartition dans l'organisme et leurs mouvements relatifs. L'eau, solvant vital de l'organisme, entre dans plus de 60% dans la composition de l'organisme animal. Elle se répartit entre le compartiment intracellulaire (environ 70%) et le compartiment extracellulaire (environ 30%). La stabilité de son volume et de sa répartition au sein des compartiments intra- et extracellulaire de l'organisme est un élément essentiel du fonctionnement cellulaire, car elle conditionne la qualité des échanges qui permettent, d'une part, l'approvisionnement en nutriments et en oxygène, d'autre part, l'élimination de leurs déchets métaboliques. En effet, ces échanges dépendent directement de la pression osmotique (ou osmolalité) dans les compartiments intra- et extracellulaire et de la quantité de solvant (l'eau) et de solutés (essentiellement le Na<sup>+</sup> pour les compartiments extracellulaires). L'osmolalité, bien qu'elle résulte de substances dont les propriétés osmotiques sont différentes, doit être identique dans les deux compartiments : elle est d'environ 300 mOsm. Toute perturbation de l'osmolalité du milieu extracellulaire imputable à une variation du volume d'eau (**Fig. 1a**), à une variation des concentrations en solutés (**Fig. 1b**) ou à une variation des deux à la fois, compromet cet équilibre osmotique et donc le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire.

**Figure 1 : Phénomène d'osmose dans les compartiments intra- et extracellulaires**

a) dans le cas où on diminue l'osmolarité en ajoutant de l'eau à un compartiment (hypoosmolarité), un mouvement d'eau se crée vers l'autre compartiment

b) dans le cas où un compartiment à une concentration en soluté plus élevée (hyperosmolarité), un mouvement d'eau se crée du compartiment le moins concentré vers le compartiment le plus concentré. La solution hypertonique se dilue progressivement, alors que la solution hypotonique perd de l'eau et se concentre. Le phénomène s'arrête lorsque les deux solutions sont isotoniques.

**B. Maintien de l'homéostasie osmotique**

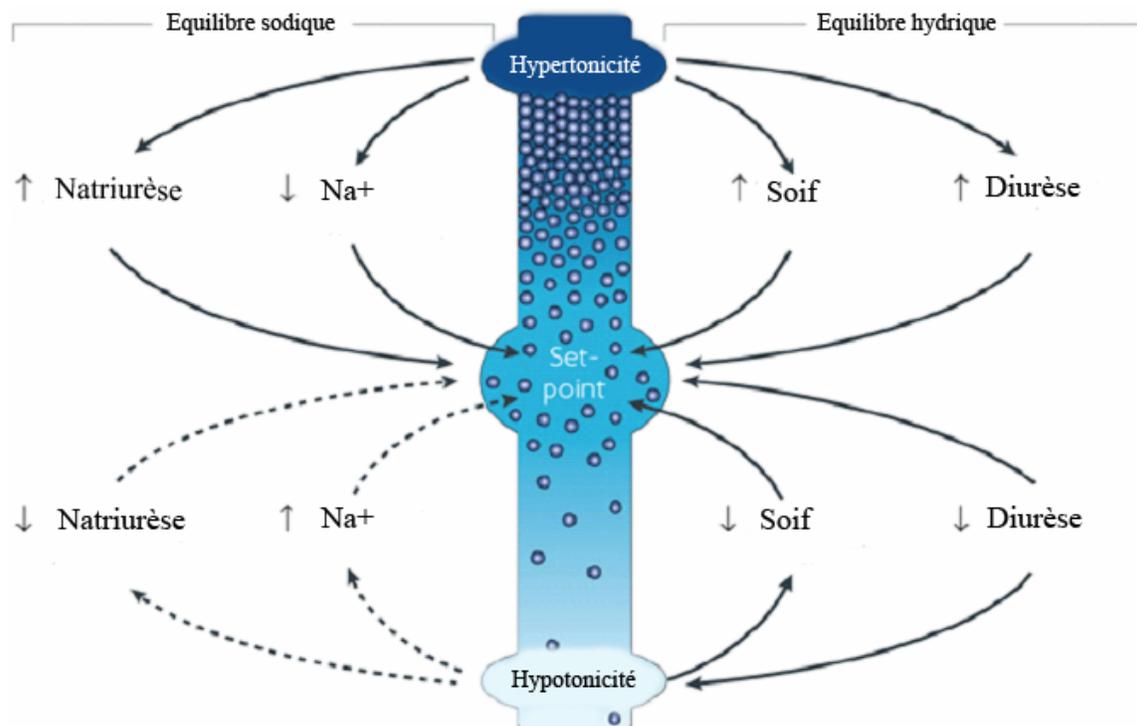
Chez les mammifères, l'homéostasie osmotique est assurée principalement par des ajustements dans la prise et l'excrétion d'eau et de sodium (Na<sup>+</sup>) lorsque la valeur de l'osmolalité plasmatique dévie de plus de 1% de la valeur du point d'équilibre (**Fig.2**). Du point de vue de l'équilibre sodique, l'hypotonicité provoque une augmentation de la prise de sodium, alors que dans le cas d'une hyperosmolarité, l'effet est inverse (Bourque et al., 1994).

Pour ce qui concerne la quantité d'eau dans l'organisme, la prise d'eau résulte de l'activation cognitive de la soif et de la réabsorption d'eau au niveau du néphron. La soif est générée par les régions corticales chez certains animaux et chez l'homme pour inciter

une augmentation homéostatique de la prise d'eau (Bourque et al., 1994 ; Denton et al., 1996). Parmi ces régions figure le cortex cingulaire antérieur (Egan et al., 2003). Ainsi, en condition hypertonique, il y a une augmentation de la sensation cognitive de la soif, incitant à un comportement dipsique pour rétablir l'équilibre hydrique.

Pour ce qui concerne le contrôle osmotique de l'excrétion d'eau (diurèse), en condition d'hypertonie, il y a une diminution de la diurèse, alors que dans le cas d'une hypotonie, l'effet est inverse.

**Figure 2 : Principe de base de l'osmorégulation : équilibre entre le niveau de  $\text{Na}^+$  et le niveau d'eau (d'après Bourque et al., 2008)**

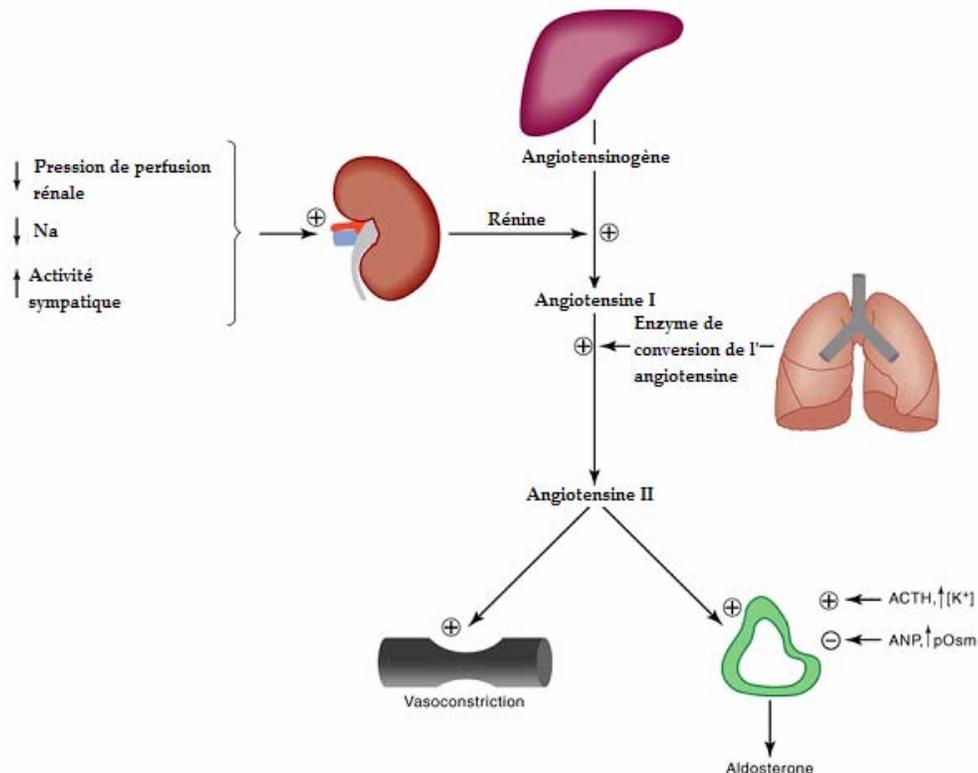


Nature Reviews | Neuroscience

Deux neurohormones sont particulièrement importantes pour le contrôle de la diurèse et de la natriurèse : l'hormone antidiurétique, l'arginine-vasopressine (AVP), et l'ocytocine (OT), libérées dans la circulation générale en conditions hypertoniques. L'augmentation de l'AVP circulante permet la réabsorption d'eau au niveau rénal, alors que l'OT agit comme hormone natriurétique et diminue la réabsorption du  $\text{Na}^+$  par le néphron.

L'AVP et l'OT ne sont pas les seules hormones contrôlant l'équilibre hydro-minéral. La régulation hydrosodée passe également par le système rénine-angiotensine-aldostérone (**Fig. 3**) et les peptides natriurétiques (pour revue, voir Antunes-Rodrigues et al., 2004).

**Figure 3 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone**



Les peptides natriurétiques sont constitués de trois membres : le peptide natriurétique atrial (ANP) découvert initialement au niveau des oreillettes cardiaques, le peptide natriurétique cérébral (BNP) et le peptide natriurétique de type C (CNP), mis en évidence dans le cerveau. L'ANP a été mis en évidence au niveau du complexe hypothalamo-neurohypophysaire et dans les autres structures impliquées dans le contrôle central de l'osmorégulation. Au niveau périphérique, le peptide natriurétique atrial (ANP) inhibe la réabsorption rénale de Na<sup>+</sup> et est antagoniste aux effets de l'angiotensine II et de l'aldostérone. Au niveau central, l'ANP inhibe le comportement dipsique et la prise de Na<sup>+</sup>. Dans les neurones magnocellulaires, l'ANP interagit avec l'AVP en inhibant l'activité électrique des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques. Dans le cadre de notre travail, nous avons porté notre attention sur le système AVP/OT.

## C. Osmostat et structures osmosensibles

### 1. Système d'osmorégulation et osmostat

L'osmorégulation constitue l'ensemble des processus homéostatiques permettant de maintenir l'osmolalité plasmatique à un niveau normal. La régulation par feedback des réponses osmorégulatrices suppose l'existence d'un « osmostat ».

L'osmostat est défini comme étant le système dans lequel la valeur de référence de l'osmolalité est conservé. Il est informé par un système de détection de la valeur réelle de l'osmolalité et il est capable de comparer la valeur réelle à la valeur de référence. Si l'écart entre les deux est trop important, il déclenche une réponse effectrice, en particulier en ajustant la diurèse. Des études électrophysiologiques ont démontrées que l'osmostat se situe au niveau des noyaux supraoptiques (NSO) et des noyaux paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus. Ils sont informés par des neurones osmosensibles, qui modifient la fréquence de décharge de leur potentiel d'action en réponse aux changements osmotiques périphériques. Par ailleurs, les neurones eux-mêmes des NSO et NPV constituent également des neurones osmosensibles (Mason, 1980 ; Oliet et Bourque, 1993).

### 2. Structures osmosensibles

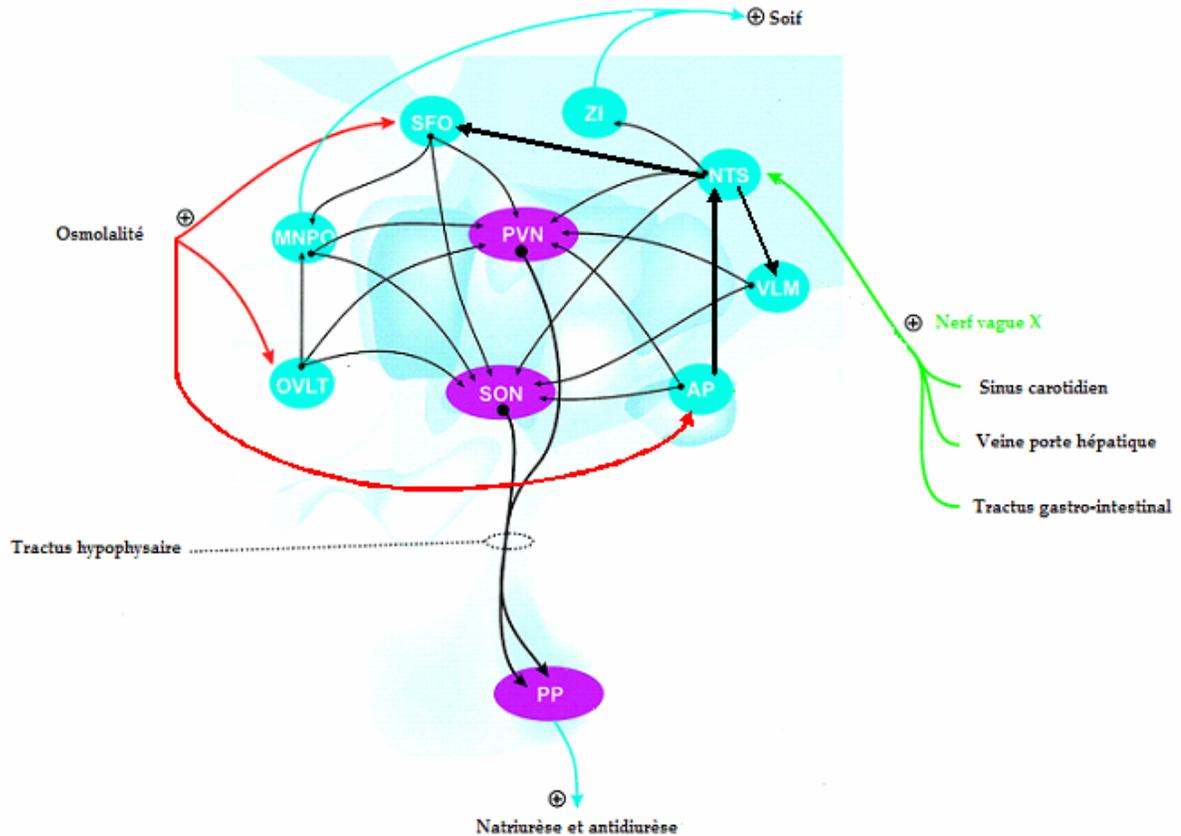
L'osmolalité plasmatique est détectée à la fois en périphérie, notamment au niveau du sinus carotidien et de la crosse aortique, mais également par des zones du système nerveux central, elles-mêmes osmosensibles (**Fig. 4**).

#### 2.1 Structures osmosensibles périphériques

L'information osmotique est détectée par des osmorécepteurs ou « stretch receptors », activés en réponse à des stimulations osmotiques (Bourque et al.,1993). Les afférences nerveuses périphériques provenant de « stretch receptors » au niveau de l'oreille gauche (inhibitrice), de la crosse aortique, et du sinus carotidien (excitateur) arrivent via le nerf vague X et se terminent dans le noyau du tractus solitaire (NTS), l'area postrema (AP), et la medulla ventro-latérale (VLM). Les cellules provenant de ces régions envoient leurs axones vers les NSO et NPV.

**Figure 4: Schéma des différentes afférences périphériques et centrales vers le complexe hypothalamo-neurohypophysaire (d'après Holmes et al., 2001)**

SON : noyau supraoptique; PVN :noyau paraventriculaire; NTS : noyau du tractus solitaire; MnPO : aire préoptique médiane; SFO : organe subforminal; OVLT :organe vasculaire de la lame terminale; VLM : medulla ventrolatérale; AP : area postrema ; PP : hypophyse postérieure; ZI : zona incerta



Des expériences anatomiques et électrophysiologiques indiquent que les neurones issus du NTS envoient directement des projections vers les neurones magnocellulaires (Kannan et al., 1981 ; Tribollet et al., 1985) et l'aire préoptique médian (MnPO) (Saper et al., 1983 ; Edwards et al., 1989). D'autres études ont démontré que le NTS envoie également des projections vers l'organe subforminal (SFO), une des structures du SNC elle-même osmosensible (Zardetto-Smith and Gray, 1987).

## 2.2 Structures osmosensibles centrales

Le système de détection de l'osmorégulation passe également par des structures telles que l'organe subforminal (SFO), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et l'aire

préoptique médiane (MnPO) (**Fig. 4**). Ces zones font partie des organes dits circumventriculaires, qui sont caractérisés par une absence de barrière hémato-encéphalique, et donc peuvent être directement influencés par l'osmolalité systémique. Les neurones constituant ces structures sont osmosensibles, équipés également de « stretch receptors » (Oliet et Bourque, 1993). Ces noyaux centraux vont intégrer les informations osmotiques. Les voies efférentes qui naissent de ces noyaux modulent les réponses osmorégulatrices grâce à leur projection sur le NSO et le NPV (Zhang et Bourque, 2003).

## **II. Rôle du système hypothalamo-neurohypophysaire dans l'osmorégulation**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le centre de contrôle de l'osmorégulation se trouve au niveau de l'hypothalamus et est constitué du complexe hypothalamo-neurohypophysaire qui reçoit des afférences issues des structures osmosensibles.

Le système hypothalamo-neurohypophysaire exerce sa fonction de maintien de l'équilibre osmotique grâce à la sécrétion de deux neurohormones, l'arginine-vasopressine et l'ocytocine qui sont synthétisées dans les noyaux supraoptiques (NSO) paraventriculaires (NPV) (Antunes-Rodrigues et al., 2004).

### **A. Le système hypothalamo-neurohypophysaire**

#### 1. Structure

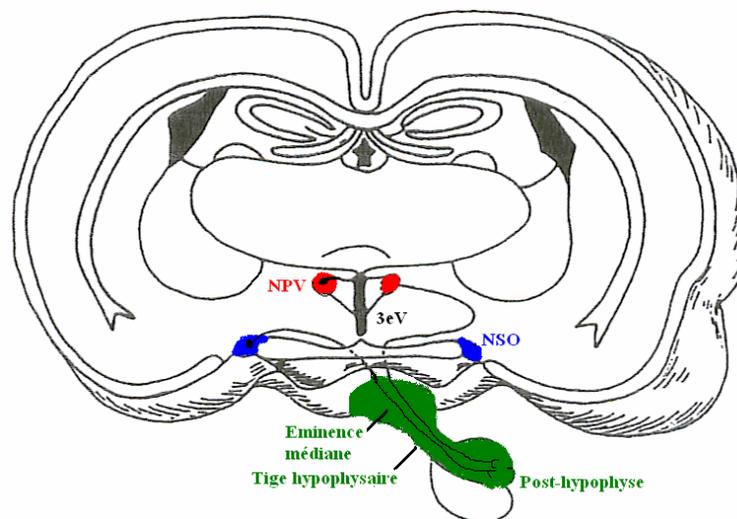
Le système hypothalamo-neurohypophysaire est constitué par des neurones de grande taille, les neurones magnocellulaires (20 à 40 µm de diamètre pour les corps cellulaires), localisés au niveau du NSO et du NPV.

Le NSO et le NPV sont deux noyaux pairs, situés respectivement de part et d'autre du chiasma optique et du 3<sup>e</sup> ventricule (**Fig. 5**). Le NSO est constitué exclusivement de neurones magnocellulaires alors que le NPV est constitué d'une division latérale magnocellulaire et d'une division parvocellulaire plus médiane. Les neurones

parvocellulaires ont un corps cellulaires de diamètre plus petit (10-15 $\mu$ m) et exercent des fonctions qui ne sont pas liées à l'osmorégulation.

En raison de cette homogénéité neuronale des NSO, dans le cadre de ce travail, nous avons porté plus spécifiquement notre attention sur ce noyau. Les neurones magnocellulaires sont constitués de 2 espèces neurochimiques : les neurones exprimant l'AVP et les neurones exprimant l'OT. Dans le NSO du rat, les neurones OT sont retrouvés principalement en position antéro-dorsale alors que les neurones AVP sont plutôt situés de façon postéro-ventrale. L'anatomie de ce système est très semblable chez le rat et la souris, avec néanmoins une ségrégation spatiale moins stricte des neurones AVP et des neurones OT. Les axones de ces neurones sont amyélinisés. Ils quittent le NSO de façon dorso-médiane pour tourner ensuite caudalement puis ils rejoignent la portion dorsale de l'éminence médiane interne pour se terminer au contact des capillaires de la neurohypophyse (Scharrer et Scharrer, 1940; Alonso et Assenmacher, 1981). Au niveau de cette jonction neuro-hémale, ils libèrent les neurohormones AVP et OT dans la circulation générale.

**Figure 5: Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire** (d'après Hatton, 2002) NPV : noyau paraventriculaire, NSO : noyau supraoptique, CO : chiasma optique, 3<sup>e</sup> V : troisième ventricule



Dans le NSO, la grande majorité des terminaisons contactant les neurones magnocellulaires est de type GABAergique (Van den Pol, 1982) mais aussi

glutamatergique (El Majdoubi et al., 1996) : 30 à 50% des synapses arrivant sur les neurones AVP et OT sont GABAergiques et 25% sont glutamatergiques. Elles proviennent de neurones dont le corps cellulaire est situé dans des zones hypothalamiques proches du NSO. Les corps cellulaires et les dendrites des neurones magnocellulaires sont proches les uns des autres et séparés par de fins pieds astrocytaires. Dans le cas où la sécrétion de neurohormones est importante, les pieds astrocytaires se rétractent, conduisant à l'apposition et au couplage des soma et des dendrites (pour revue, voir Hatton, 1997). Cette plasticité sera développée plus en détail dans un chapitre ultérieur.

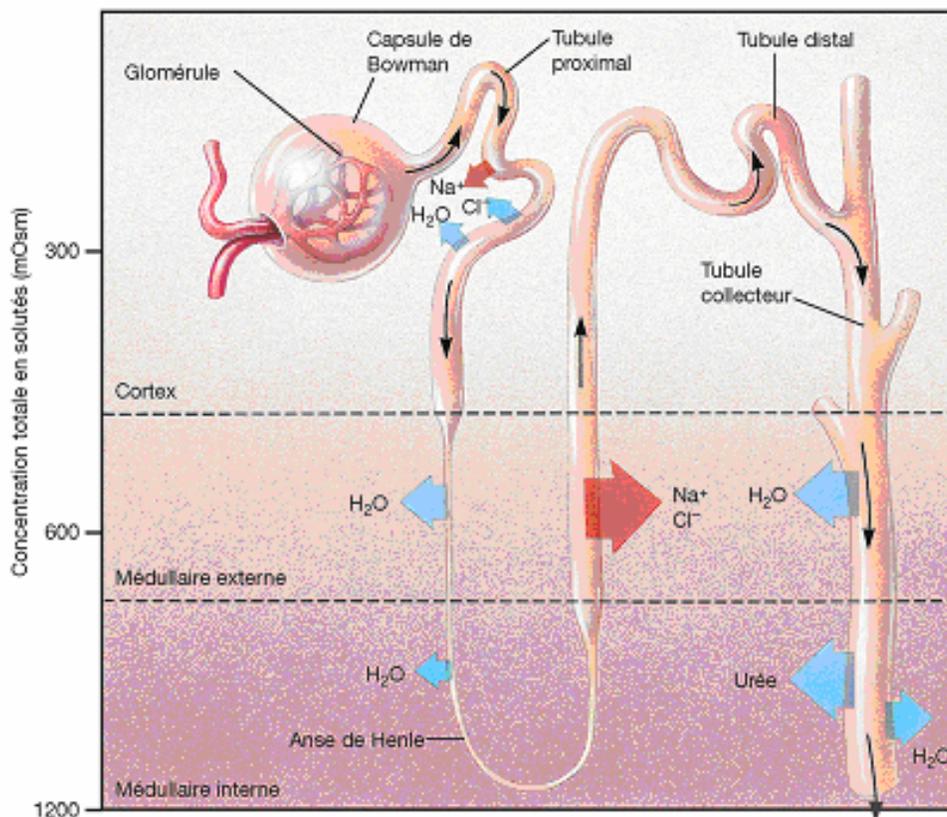
## 2. Fonction des neurohormones AVP et OT

Les deux neurohormones AVP et OT sont libérées au niveau de la neurohypophyse et transportées par la circulation générale jusqu'aux tissus cibles périphériques, là où ils vont exercer leurs effets biologiques en interagissant avec des récepteurs spécifiques.

Le rôle biologique le plus important de l'AVP est la régulation de l'excrétion de l'eau. L'AVP exerce son action antidiurétique au niveau du tubule collecteur du rein (**Fig. 6**) où sont exprimés des récepteurs de type V2. La liaison de l'AVP à ce récepteur provoque une augmentation de la concentration intracellulaire du second messenger l'AMPc, conduisant à une translocation des canaux hydriques, les aquaporines, vers la membrane apicale de ces cellules, permettant la réabsorption d'eau (Robert et Clauser 2005). L'AVP a également des propriétés vasoconstrictives. En effet, lors d'une hémorragie, il y a une activation des récepteurs V1a et V1b présents sur les muscles lisses des parois vasculaires, ce qui provoque une vasoconstriction due à une augmentation de la concentration plasmatique d'AVP. Ceci permet la baisse de la volémie et donc l'atténuation de l'hypotension (Den Ouden et Meinders, 2005). Toutefois, des études ont montrées que l'AVP ne semble pas intervenir dans le maintien de la pression artérielle (Hirsch et al., 1993). Quant à l'OT, bien qu'elle soit impliquée majoritairement dans la reproduction, elle exerce également une action natriurétique (Verbalis et al., 1991; Ozaki et al., 2004). Elle exerce son effet via son récepteur OTR situé sur la macula densa et les tubules proximaux (Verbalis et al., 1991, Windle et al., 1996).

### Figure 6: Schéma montrant les mécanismes de réabsorption de l'eau et du sodium $\text{Na}^+$ au niveau du rein

La récupération active du  $\text{Na}^+$  dans les tubules proximaux est suivie du mouvement passif du  $\text{Cl}^-$  et de l'eau. L'absorption active du  $\text{NaCl}$  dans le segment ascendant de l'anse de Henlé crée un gradient osmotique requis pour la réabsorption de l'eau dans le segment descendant de l'anse de Henlé et dans le tubule collecteur. Les changements de l'osmolalité du cortex vers la médullaire sont indiqués dans la partie gauche de la figure.



### 3. Biologie cellulaire des neurones magnocellulaires AVP et OT

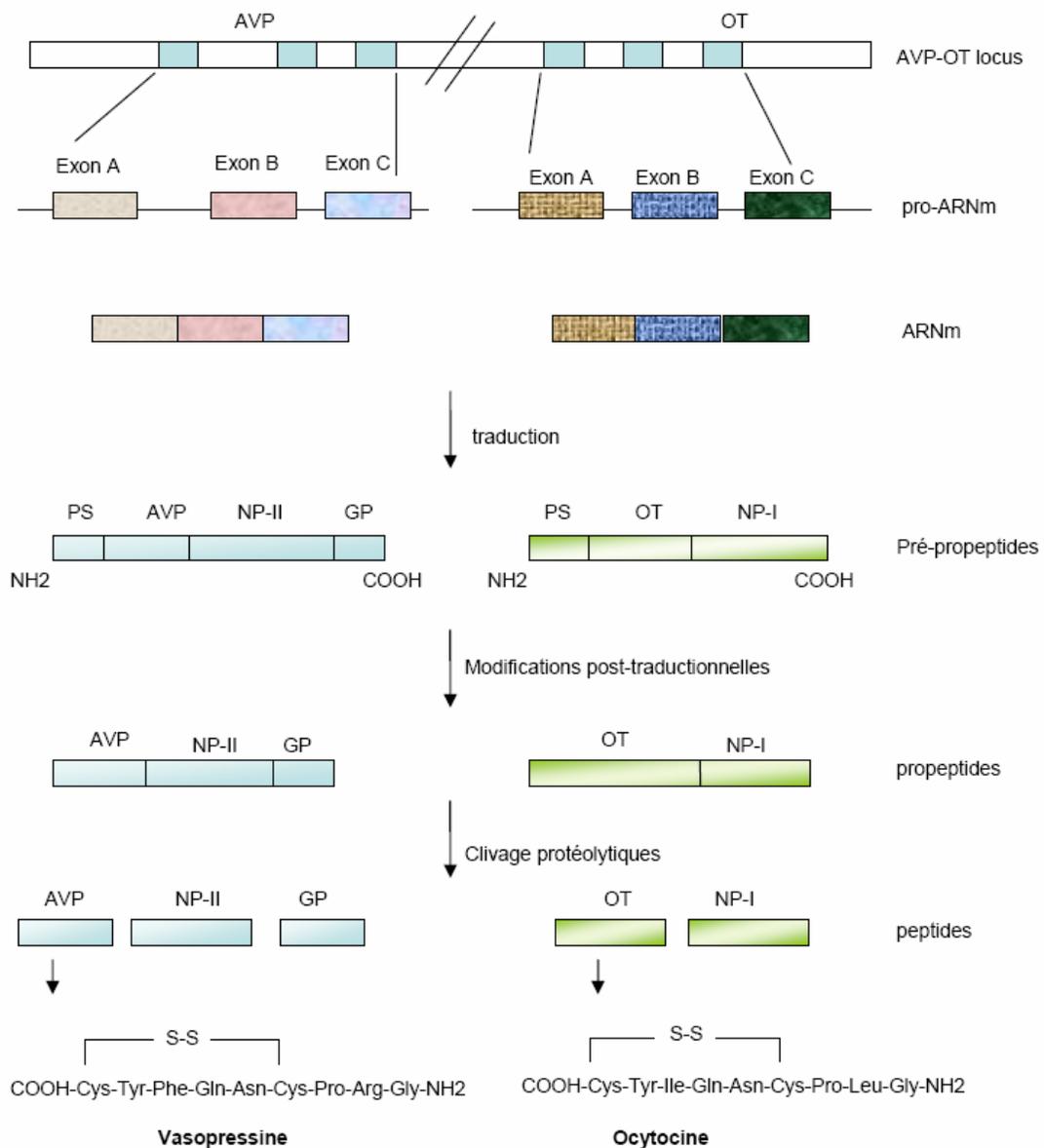
Les gènes codant l'AVP et l'OT sont issus d'un même chromosome, situés à très peu de distance l'un de l'autre (**Fig. 7**). Le gène AVP code pour une pré-pro-hormone de 166 acides aminés constituée d'un peptide signal, ensuite clivé lors de la biosynthèse, de la séquence de l'AVP (comprenant 9 acides aminés reliés par un pont disulfure entre les acides aminés 1 et 6), et de la séquence de la neurophysine II, une protéine précurseur liant l'AVP et qui sera libérée avec elle dans les terminaisons nerveuses. La partie C-terminale code une glycoprotéine dont la fonction demeure inconnue.

Le gène OT code, également pour un précurseur contenant la neurophysine I, et la pré-pro-hormone OT, ne contenant pas de glycoprotéine au niveau de la partie C-terminale.

La structure primaire de l'OT ne diffère de celle de l'AVP que par 2 acides aminés, en position 3 et 8. La presque similarité de l'organisation de ces deux gènes ainsi que la conservation de leur structure dans l'arbre phylogénique suggèrent qu'ils proviennent d'un gène ancestral commun (Urano et al., 1992).

**Figure 7: Organisation structurale et transcription des gènes codant les deux neuropeptides du système hypothalamo-neurohypophysaire : AVP et OT.**

NP : neurophysine, PS : peptide signal, GP : glycoprotéine



Après la transcription, puis la traduction des ARNm des pré-propeptides, les protéines précurseurs subissent plusieurs étapes de maturation, en particulier la clivage du peptide signal, la formation de ponts disulfures, et pour l'AVP, les premières phases de glycosylation. Elles passent donc progressivement du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi puis aux vésicules à cœur dense. Les neurophysines serviraient de protéines-chaperonnes et permettraient l'adressage des neurohormones. Le clivage final du peptide et de sa neurophysine a lieu dans les vésicules qui contiennent des prohormones-convertases (de type 1 et 3 pour les neurones AVP et de type 5 pour les neurones OT) et des carboxypeptidases de type E et H. Des études ont montré que l'expression des enzymes de maturation est modulée par des stimulations osmotiques (Mahata et al., 1992).

## **B. La plasticité neuroendocrine du système hypothalamo-neurohypophysaire**

Le fonctionnement du système hypothalamo-neurohypophysaire passe par une plasticité, qui est un ensemble de mécanismes qui régulent finement la synthèse et la libération de l'AVP et de l'OT. Cette plasticité existe sous diverses formes interdépendantes : neurochimique, structurale et électrophysiologique. Elle met en jeu à la fois des modifications de la biosynthèse des différents neuropeptides, des modifications des rapports entre les neurones magnocellulaires et les cellules gliales, et des modifications de l'excitabilité neuronale.

### 1. La plasticité neurochimique

La modification de l'expression des neuromédiateurs lors de stimulations physiologiques, est un processus dénommé plasticité neurochimique.

Lors de stimulations des neurones magnocellulaires, l'expression des neuropeptides co-exprimés avec l'AVP et l'OT est profondément modifiable. En effet, des nouveaux neuropeptides, des enzymes de biosynthèse des neurotransmetteurs sont exprimés *de novo*, ce qui contribue à modifier le langage du neurone. Cette capacité d'un neurone à modifier son expression neurochimique a été mis en évidence pour la 1<sup>ère</sup> fois lors de

l'ontogenèse avec l'acquisition du phénotype cholinergique ou noradrénergique des neurones végétatifs issus de la crête neurale en fonction de leur environnement (Le Douarin, 1980). Depuis, cette plasticité a été étendue à la vie adulte, grâce à l'étude du système hypothalamo-neurohypophysaire (Calas, 1994). Dans les neurones magnocellulaires, la plasticité neurochimique est observée lors de la déshydratation, la lactation, la parturition, et au cours du vieillissement.

Du point de vue des neuropeptides, on observe une co-expression de l'AVP et OT dans les neurones magnocellulaires. Chez un animal déshydraté, il est observé une augmentation du nombre de neurones qui expriment à la fois l'AVP et l'OT. Ce phénomène de néo-expression de neurotransmetteurs ne se limite pas à ces deux neuropeptides mais a également été décrit pour d'autres médiateurs, tels que la galanine (Landry et al., 1991; Melnikova et al., 2006), les peptides natriurétiques ou la dynorphine qui est plutôt exclusive aux neurones AVP (Sherman et al., 1986).

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

## 2. La plasticité structurale

### 2.1 Modifications des neurones magnocellulaires

Dans le cas de la déshydratation, le système hypothalamo-neurohypophysaire est le siège d'une plasticité morphologique qui affecte aussi bien les neurones AVP que les neurones OT (Marzban et al., 1992; Miyata et al., 1994; Hatton, 1997). Les neurones AVP augmentent uniquement en taille et montrent une augmentation de leur contenu en réticulum endoplasmique rugueux et en appareil de Golgi (Theodosis et Poulain, 1993; pour revue, voir Theodosis, 2002), alors que les neurones OT modifient aussi leurs appositions somatiques.

## 2.2 Modifications des neurones glutamatergiques et GABAergiques

La plasticité neurochimique s'accompagne d'une plasticité structurale, affectant les neurones magnocellulaires, les interneurons, les terminaisons des afférences aux noyaux magnocellulaires et les cellules gliales (pour revue, voir El Majdoubi et al., 2000). Lorsque le système hypothalamo-neurohypophysaire est activé, notamment lors de la lactation, il a été observé une augmentation du nombre de synapses contactant les neurones OT. La manifestation la plus visible de cette plasticité synaptique est le changement du nombre de synapses qui contactent simultanément plusieurs éléments post-synaptiques dans le NSO. Ces synapses dénommées « partagées » sont observées entre des soma adjacents, entre des soma et des dendrites ou entre des dendrites adjacentes (Theodosis, 2002; Theodosis et al., 2004). Des analyses structurales ont pu montrer que ces synapses « partagées » étaient principalement des synapses entre des interneurons, glutamatergiques et GABAergiques, et les neurones OT.

Au cours de la déshydratation, le système hypothalamo-neurohypophysaire est le siège d'une plasticité similaire qui affecte non seulement les neurones OT, mais aussi les neurones AVP (Miyata et al., 1994; Hatton, 1997). Les réarrangements neuronaux s'accompagnent d'une augmentation de la libération de glutamate et de GABA et d'une modification de l'expression de leurs récepteurs tels que les récepteurs glutamatergiques NMDA, mGluRIII et GABA<sub>A</sub> (Tasker et al., 2002).

## 2.3 Modification des astrocytes

La remarquable augmentation de la taille du corps cellulaire du neurone magnocellulaire est l'un des changements morphologiques le plus évident à observer (Theodosis et Poulain, 1993). Ceci est accompagné d'une modification de la couverture astrocytaire. Une des principales fonctions des astrocytes est la recapture et la dégradation du glutamate et du GABA. Les astrocytes, en captant le glutamate libéré dans la fente synaptique (Rothstein et al., 1996), contribuent à la baisse de l'excitation synaptique (Theodosis, 2002; Olliet et Piet, 2004).

Le raccourcissement astrocytaire provoque une accumulation extracellulaire de glutamate et de GABA dans les fentes synaptiques, modifiant la durée et l'amplitude des courants

post-synaptiques excitateurs. Enfin, les astrocytes synthétisent et libèrent la taurine, « gliotransmetteur » des neurones magnocellulaires qui agit via le récepteur à glycine et/ou à forte concentration via des récepteurs GABAergiques (Hussy et al., 1997; Hussy, 2002).

Les modifications de la couverture astrocytaire influent aussi sur l'activité électrique des neurones, en induisant des changements dans la concentration de  $K^+$  extracellulaire. En effet, les astrocytes jouent un rôle dans le retrait des ions  $K^+$  des espaces extracellulaires après le passage de l'influx nerveux. Ainsi, la rétraction des pieds astrocytaires observée lors de la lactation diminue la possibilité de capter les ions  $K^+$  et augmente l'excitabilité neuronale.

Au niveau de la neurohypophyse, il existe un mécanisme similaire de plasticité structurale, où les pieds pituicytaires au cours d'une stimulation physiologique chronique, se rétractent augmentant le contact entre les terminaisons neuronales et la lame basale (Luckman et Bicknell, 1990; Hatton, 1997). Par conséquent, la réduction de la couverture gliale autour des terminaisons permet aux neurotransmetteurs et/ou neuromodulateurs de diffuser plus efficacement vers les capillaires fenêtrés. (Miyata et al., 1997).

### 3. La plasticité électrophysiologique

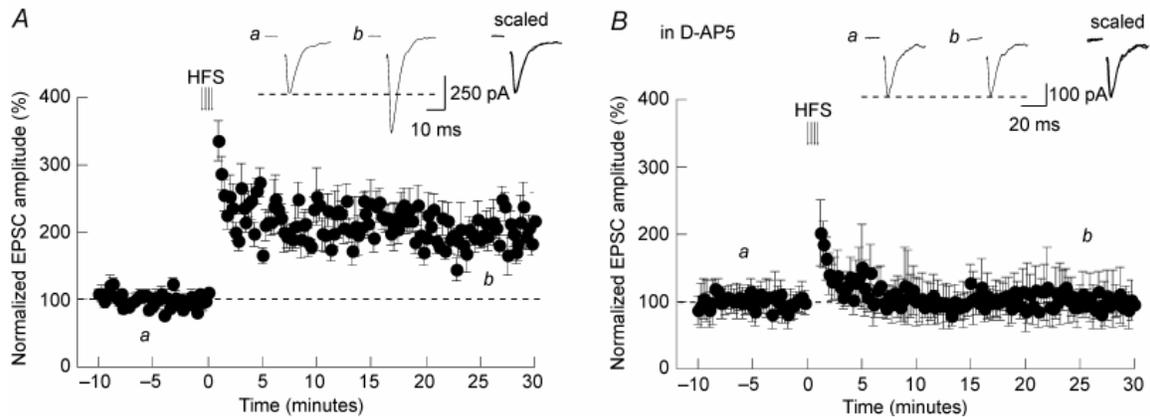
#### 3.1 Modification des synapses GABAergiques et glutamatergiques

Le processus de plasticité structurale conduit à des modifications de la connectivité des neurones et des cellules gliales.

Des études effectuées sur les NSO chez des rats déshydratés ont révélé en lien avec les modifications du nombre de synapses de glutamate et de GABA, des modifications fonctionnelles des afférences synaptiques glutamatergiques et GABAergiques qui arrivent aux neurones magnocellulaires. Dans des conditions de stimulation physiologique, la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs à glutamate (EPSC : excitatory post synaptic currents), et inhibiteurs à GABA (IPSC : inhibitory post synaptic currents) augmente, d'où l'augmentation de la sécrétion de glutamate et de GABA (Stern et al., 2000; Di et Tasker, 2004).

**Figure 8: Phénomène de potentialisation à long terme (LTP) dans des terminaisons glutamatergiques dans le noyau supra-optique induite sur des coupes hypothalamiques de cerveau de rat (d'après Panatier et al., 2006)**

A) sur des tranches hypothalamiques de rat, une stimulation à haute fréquence (HLS) (flèche) induit une LTP des courants polysynaptiques excitateurs (EPSC). B) le même protocole de stimulation à haute fréquence n'induit pas de LTP en présence de 50  $\mu$ M de D-AP5, un inhibiteur des récepteurs NMDA.



Les modifications de l'activité électrique des neurones GABAergiques et glutamatergiques entraînent l'apparition de phénomènes de potentialisation à long terme (LTP) et de dépression à long terme (LTD) dans les terminaisons glutamatergiques du NSO, ce qui modifie le contrôle qu'ils exercent sur les neurones AVP et OT (**Fig. 8**).

### 3.2 Modification de l'activité électrique générale

Le remodelage synaptique pourrait avoir un rôle spécifique pour faciliter les modifications de l'activité électrique observées plus généralement lors de la stimulation de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire. En effet, à l'état de repos, les neurones magnocellulaires ont une activité électrique à basse fréquence. En condition de stimulation du système osmotique ou cardiovasculaire, les neurones AVP augmentent leur activité électrique, qui devient phasique et asynchrone (**Fig. 9**). Il en résulte une libération soutenue d'AVP dans la circulation générale, sans épuisement des neurones et du stock hypothalamique d'AVP. L'activité électrique des neurones OT, quant à elle, augmente également (Hussy, 2002; Theodosis et al., 2006). Cependant, cette modification électrophysiologique est différente du cas de la lactation où les neurones OT se mettent à décharger de façon couplée et sous forme de bouffées de potentiel d'action à haute fréquence, induisant une libération pulsatile d'OT (Theodosis, 2002).

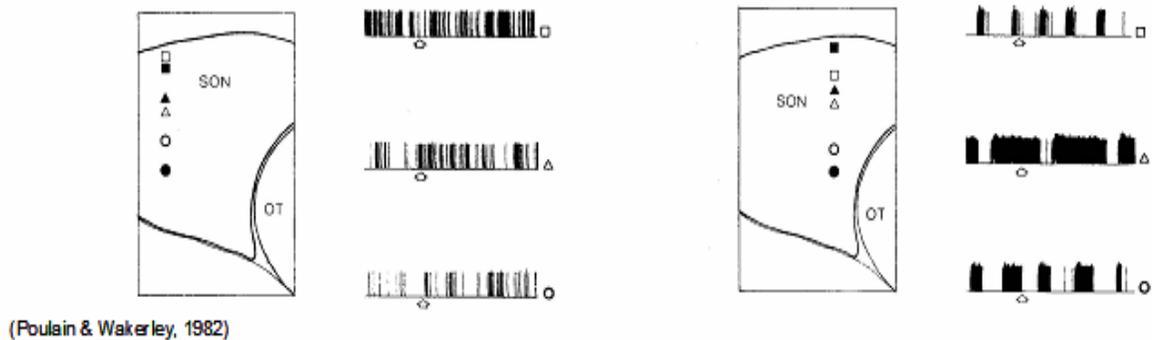
**Figure 9: Électrophysiologie des neurones à AVP (d'après Poulain et Wakerley, 1982).** A) soit au repos, soit en réponse à une hyperosmolarité; B) enregistrement de plusieurs neurones AVP simultanément, conduisant à une libération soutenue et continue d'AVP sans épuisement durant toute la durée du stimulus

A)



B) No water deprivation (O.P. 289mOsm)

18<sup>h</sup> water deprivation (O.P. 321mOsm)



L'absence d'apposition somatique pour les neurones AVP peut s'expliquer par le fait que ces neurones, lorsqu'ils sont activés, déchargent de façon asynchrone. Un couplage structural entre les somas n'est donc pas nécessaire. Par contre, les modifications structurales au sein du NSO favorisent une synthèse et une libération accrue de neurohormone : diminution du tampon spatial du  $K^+$  par les astrocytes, augmentation de l'excitabilité neuronale par le maintien de hauts niveaux de glutamate extracellulaire et diminution du taux local de taurine liée à la rétraction astrocytaire.

## **C. Principales voies afférentes des neurones magnocellulaires**

### 1. Voie afférente noradrénergique

Les afférences noradrénergiques, issues du tronc cérébral et du bulbe rachidien, constituent les afférences modulatrices majeures du système hypothalamo-neurohypophysaire. Ces afférences monoaminergiques sont impliquées dans la régulation de la plasticité neurochimique et structurale de ce système. Des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* montrent que les terminaisons noradrénergiques stimulent l'expression et la libération de l'AVP et de l'OT dans les NSO et NPV (Vacher et al., 2002).

#### 1.1 Effet du glutamate dans l'innervation noradrénergique

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

Les synapses glutamatergiques représentent 25% des synapses impliquant les neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques en condition normale (El Majdoubi et al., 1996 ; El Majdoubi et al., 1997; Meeker et al., 1993; Theodosis, 2002).

Dans le cadre de la déshydratation, il a été mis en évidence une augmentation parallèle du nombre des synapses glutamatergiques et noradrénergiques (Meeker et al., 1994 ; Di et Tasker, 2004). Les afférences impliquant la noradrénaline (NA) sont aussi concernées par le phénomène de synapses partagées (Theodosis et al., 2004).

### 1.2 Effet du GABA dans l'innervation noradrénergique

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur prédominant dans l'hypothalamus : approximativement 40% de synapses sont des synapses GABAergiques (El Majdoubi et al., 2000 ; Oliet et Piet 2004). Par ailleurs, l'implication de ce neurotransmetteur dans l'inhibition de l'activité des neurones magnocellulaires a été largement démontrée (pour revue, voir Renaud et Bourque, 1991). Il a été suggéré que le GABA pouvait inhiber la libération d'AVP et d'OT par les neurones magnocellulaires (Poulain et Wakerley, 1982). L'action du GABA implique des récepteurs post-synaptiques GABA<sub>A</sub> et pré-synaptiques GABA<sub>B</sub>. Des injections intracérébroventriculaires ou des microinfusions directes au niveau du NSO, de muscimol (agoniste) et de bicuculine (antagoniste), des récepteurs GABA<sub>A</sub> inhibent l'activité basale des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques et le réflexe d'éjection du lait lors de la tétée (Moos 1995 ; Voisin et al., 1995). Ces récepteurs sont exprimés par les neurones AVP et OT du NSO et NPV (Fenelon et al., 1995). Du plus, les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont localisés au niveau des terminaisons glutamatergiques et GABAergiques du NSO et ces récepteurs pourraient être impliqués à la fois dans l'excitation glutamatergique et l'inhibition GABAergique sur les neurones magnocellulaires (Ibrahim et al., 1998 ; Kombian et al., 1996).

Un effet indirect de la NA sur l'activité des neurones vasopressinergiques et ocytocinergiques *via* les neurones GABAergiques a été mis en évidence. En premier lieu, Wang et ses collègues (1998) ont montré que la NA pouvait inhiber la libération de GABA dans le NSO via les récepteurs  $\alpha$ 2-adrénergiques. Une telle interaction entre les deux neurotransmetteurs a été aussi mise en évidence d'une part, dans l'hypothalamus médio-basal en cas d'hypoglycémie (Beverly et al., 2001), et d'autre part, dans le NSO durant la déshydratation chronique (Di et Tasker, 2004).

## 2. Voie afférente nitrergique

### 2.1 Le monoxyde d'azote (NO) et son implication dans la régulation des neurones AVP et OT

Le NO est un neuromédiateur gazeux inorganique de demi-vie très courte (6-30s) capable de diffuser à travers la membrane des cellules. Il est produit par des NO synthases (NOS) à partir de la L-arginine et d'oxygène, cette réaction utilisant comme co-substrat le

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Knowles et Moncada, 1994; Moncada et Higgs, 1993). Il agit comme second messenger intra- et intercellulaire dans une grande variété de tissus. Des études ont montré que le NO est impliqué dans diverses fonctions du SNC, dont le contrôle de la réponse neuroendocrine face à des stimuli hydro-osmotiques (Summy-Long et al., 1993; Kadekaro et al., 1997; Kadekaro et al., 2000; Ventura et al., 2002; Kadekaro, 2004).

Dans les neurones magnocellulaires du NSO et du NPV, la synthèse du NO est stimulée par un déséquilibre hydro-osmotique. En effet, il a été démontré que les enzymes de synthèse du NO, les NOS et notamment la NOS neuronale (NOSn), avaient leur niveau d'expression augmenté dans les neurones magnocellulaires. La participation du NO dans le retour à l'homéostasie osmotique a fait l'objet de plusieurs études montrant que l'inhibition centrale de la NOS diminue la prise d'eau chez des souris assoiffées (Summy-Long et al., 1993; Kadekaro et al., 1994; Liu et al., 1996; Liu et al., 1998).

Ainsi, lors d'une perturbation hydro-osmotique, le système magnocellulaire est activé et donc la production de NO augmente afin de réguler l'expression de l'AVP et de l'OT.

Notre équipe a en particulier démontré que l'effet de la noradrénaline (NA) passe par une voie nitrergique (NO) pour le contrôle de l'expression de l'AVP (Vacher and al., 2003; Grange-Messent et al., 2004; Maolood et al., 2007).

## 2.2 Modulation de la sécrétion de glutamate et du GABA par le NO

Le NO possède des propriétés de messenger inter- et intracellulaire (Bredt et Snyder 1992 ; Lowenstein et Snyder 1992).

La voie impliquant le NO est stimulée à la fois par le glutamate et la NA et modulée par le GABA (Srisawat et al., 2000, Grange-Messent et al., 2004). De plus, le NO joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des neurones magnocellulaires (Kadekaro, 2004).

Les récepteurs du glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et l'enzyme permettant la synthèse du NO, la NO synthase (NOS), sont colocalisés dans certains sites synaptiques. Ces récepteurs ainsi que la NOS sont distribués dans les neurones du système hypothalamo-neurohypophysaire (Meeker et al., 1993) et les organes circumventriculaires osmosensibles (Brann, 1995). De plus, la sécrétion du GABA est

modulée par l'activation présynaptique des récepteurs glutamatergiques (Schrader et Tasker, 1997).

### 3. Autres afférences

Il existe également d'autres voies afférentes au système hypothalamo-neurohypophysaire moins denses et ne participant pas au contrôle de l'osmorégulation. Ce sont en particulier des innervations cholinergiques et histaminergiques.

Une innervation cholinergique très modérée provenant de l'hypothalamus latéral a été identifié dans les NSO et les NPV (Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 2001).

Des projections histaminergiques directes provenant des corps mammillaires contactent les neurones magnocellulaires vasopressinergiques par les récepteurs H1 (Hatton et Yang, 1994; Knigge et al., 1999). D'autres afférences provenant d'autres structures peuvent également être citées telles que l'aire préoptique, le septum, les structures limbiques et les bulbes olfactifs (Sawchenko et al., 1983; Thellier et al., 1994).

## **D. Implication des chimiokines, du NMDA et du NO dans la régulation de l'expression de l'AVP et le contrôle de l'osmorégulation**

Les chimiokines constituent une large famille de petites protéines (de 6 à 15 kDa) sécrétées par un grand nombre de cellules, dont principalement les globules blancs ou leucocytes. Elles sont reconnues comme des molécules stimulant le chimiotactisme des leucocytes. Les récepteurs des chimiokines sont essentiellement exprimés sur les leucocytes. L'interaction chimiokine/récepteur de chimiokine entraîne une migration des leucocytes, jouant ainsi un rôle important dans les réactions inflammatoires et la mise en place d'une réponse immunitaire.

Ce n'est que depuis des études récentes, que les chimiokines sont reconnues comme molécules de signalisation dans des processus physiologiques, notamment dans le cas de la déshydratation. En effet, les travaux de Mélik-Parsadaniantz et de son équipe ont permis d'observer un rôle neuroendocrine de la chimiokine SDF1 et de son récepteur CXCR4 dans les neurones AVP du NSO. Ainsi, l'expression de la chimiokine SDF1 et

de son récepteur CXCR4 est augmentée au niveau des neurones AVP du NSO après déshydratation (Callaweare et al., 2006; Callaweare et al., 2008).

La comparaison entre réponse osmotique et réponse inflammatoire indique qu'elles partagent un certain nombre de signaux régulateurs, en particulier le NO, les chimiokines et l'activation des récepteurs NMDA. Ces 3 types de molécules conduisent à la production de radicaux libres, notamment par la stimulation de la NADPH oxydase (NOX) (Zhao et al., 2004; Kishida et al., 2005). Par ailleurs, on sait par les travaux de Leloup et de Jaillard que les radicaux libres peuvent réguler des boucles homéostatiques durant le contrôle de la prise alimentaire (Leloup et al., 2006; Jaillard et al., 2009)

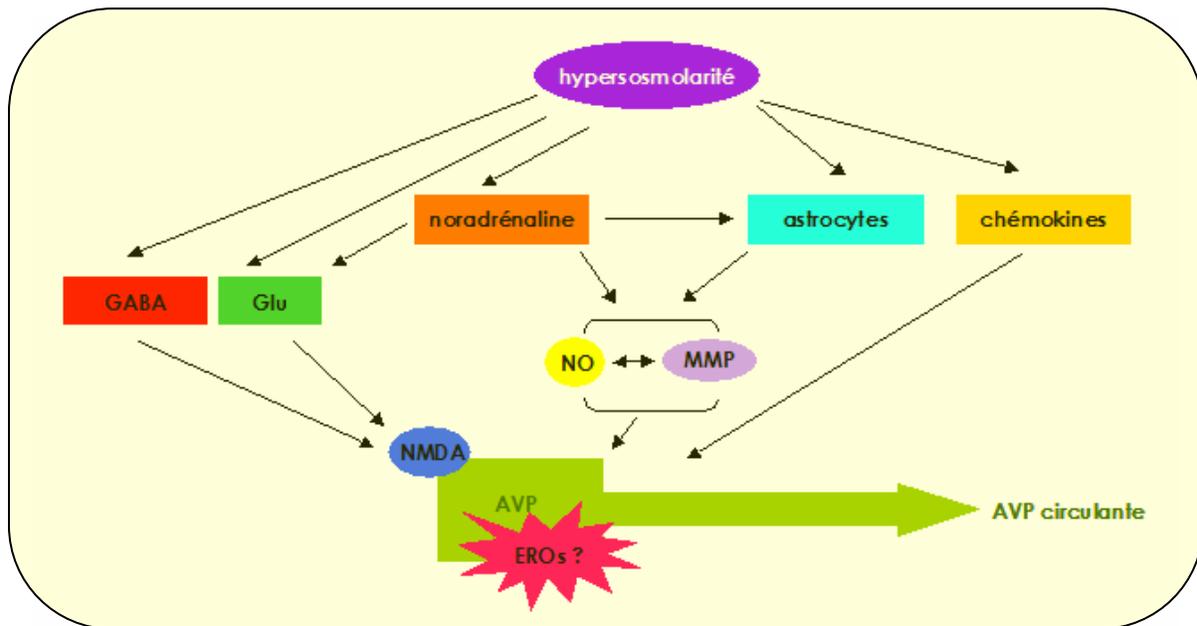
La démonstration de la présence de chimiokines dans les neurones magnocellulaires et de leur implication au cours de la stimulation hydro-osmotique, de l'implication des interneurones glutamatergiques et GABAergiques dans la régulation de l'excitabilité neuronale au niveau du NSO via les récepteurs NMDA, ainsi que les résultats que nous avons obtenus sur le NO nous amènent à suggérer que les médiateurs inflammatoires sont des molécules de signalisation endogènes qui participent à la chaîne de signalisation mise en jeu lors de la régulation osmotique (**Fig. 10**).

Cette hypothèse nous amène à nous intéresser au métabolisme oxydatif dans les noyaux magnocellulaires et à la production de radicaux libres.

Enfin, cette hypothèse est renforcée par le fait que la réponse cellulaire face à la déshydratation s'accompagne d'une augmentation du métabolisme des neurones donc d'une augmentation de la respiration cellulaire, augmentant la probabilité de production de radicaux libres.

**Figure 10: Schéma de principe montrant la mise en jeu de diverses afférences et composantes cellulaires dans la régulation de l'AVP**

Les différents aspects de la plasticité neuroendocrine et donc de la réponse osmorégulatrice sont sous le contrôle d'un certain nombre d'afférences. Les interneurones glutamatergiques et GABAergiques jouent un rôle important dans la régulation de l'excitabilité neuronale au niveau du NSO via les récepteurs NMDA et GABAA et GABAB. La noradrénaline se révèle être particulièrement importante et elle exerce son action via le NO et les neurones GABAergiques et glutamatergiques. L'hyperosmolarité modifie également l'activité des astrocytes, que nous avons démontré au niveau de l'expression des MMP. Enfin, il a été démontré la présence de chimiokines dans les neurones magnocellulaires et leur implication au cours de la déshydratation. Puisque le NMDA, le NO et les chimiokines sont des molécules de signalisation conduisant à la production de radicaux libres, nous avons donc émis l'hypothèse que les radicaux libres étaient produits au cours de la réponse osmorégulatrice.



### **III. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs)**

#### **A. Généralités**

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes comportant un électron célibataire sur leur couche périphérique (Halliwell, 1999). La présence d'un électron libre confère à ces molécules une grande réactivité et la possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés afin de stabiliser leur orbitale externe.

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko et al. 2007).

#### **B. La chimie des EROs**

##### 1. L'anion superoxyde : $O_2^{\bullet-}$

Au cours du métabolisme cellulaire, l' $O_2$  peut être réduit en  $H_2O$ . Ce passage d'une molécule d'oxygène à deux molécules d'eau nécessite l'action de quatre électrons :



Cependant, dans quelque cas (2 à 5%), l'oxygène fait l'objet d'une réduction incomplète. Chaque molécule d'oxygène sera réduite par un seul électron, aboutissant ainsi à la formation d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Dawson et al., 1993 ; Cadenas et al., 2000) :



Les anions superoxydes ne sont pas très réactifs et ont une demi-vie courte, mais ils constituent des radicaux précurseurs et ils exercent leurs effets par la formation d'espèces radicalaires beaucoup plus réactives.

## 2. Le peroxyde d'hydrogène : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En milieu protoné, l'anion superoxyde subit généralement une réaction spontanée de dismutation, aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et d'oxygène :



En présence de métaux de transition sous forme réduite, le peroxyde d'hydrogène se dégrade en radical hydroxyl (OH<sup>•</sup>), un radical libre très réactif (réaction de Fenton)



## 3. Le radical hydroxyle : OH<sup>•</sup>

OH<sup>•</sup> peut être formé par la scission homolytique de la liaison -O-O- de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou par la réaction de Fenton, ou encore par la réaction entre le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, produit par certaines cellules (notamment par les cellules nerveuses), et O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ce radical a une durée de vie de l'ordre de 10<sup>-11</sup> s et une très grande réactivité dans les milieux biologiques. Il oxyde pratiquement toutes les macromolécules dans son entourage telles que les protéines, les acides nucléiques, les acides gras poly-insaturés et les glucides (Gutteridge, 1994, Bergendi et al. 1999).

## 4. Les radicaux alkyles R<sup>•</sup> et peroxydes ROO<sup>•</sup>

Les radicaux alkyles sont les derniers maillons dans la chaîne de production des EROs : ils sont les résultats de l'action oxydante de OH<sup>•</sup> sur les chaînes d'acides gras poly-insaturés (RH). R<sup>•</sup> et ROO<sup>•</sup> sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique (Gutteridge 1994, Bergendi et al. 1999).

## 5. Le NO<sup>•</sup> en tant qu'espèce radicalaire

Dans le cas où le NO<sup>•</sup> se retrouve en trop fortes concentrations, il interagit avec l'anion superoxyde pour former le peroxydinitrite. Ce composé hautement réactif, cause des dommages aux protéines, lipides et acides nucléiques. Le fait qu'il diffuse largement à travers les membranes contribue à son effet délétère. L'exposition à de faibles concentrations de NO<sup>•</sup> conduit à la S-nitrosylation du glutathion réduit intracellulaire. Ce

dernier étant majoritairement converti en glutathion oxydé, la cellule perd une grande partie de sa capacité de défense contre les EROs (voir plus loin) (Kroncke et al., 2000).

## **C. Effets physiologiques des EROs**

### 1. Oxydation des protéines

Dans les conditions physiologiques, les cibles majeures des EROs sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) (Brot et Weissbach, 2000 ; Finkel, 2000), les acides aminés basiques (arginine, lysine) (Stadtman, 1993 ; Uchida et al., 1998) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (Armstrong et Swallow, 1969 ; Huggins et al., 1993). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

Certains acides aminés comme la cystéine (Cyst) sont particulièrement sensibles à l'oxydation *via* leur groupement thiol. La cystéine une fois oxydée conduit à plusieurs composés comme l'acide cystéique, ou génère des ponts disulfures. Ceux-ci peuvent être aisément régénérés en fonction thiols, *in vivo* par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Finkel, 2000). L'oxydation de la méthionine, particulièrement sensible au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s'effectue en deux étapes : l'une réversible conduit au sulfoxyde de méthionine, l'autre irréversible, donne la sulfone de méthionine, cette réaction n'étant pas possible *in vivo* (Vogt, 1995). Les acides aminés basiques et aromatiques subissent en majorité des modifications d'hydroxylation (Armstrong et Swallow, 1969; Huggins et al., 1993).

### 2. Peroxydation lipidique

Au niveau cellulaire, les lipides membranaires et tout particulièrement les acides gras polyinsaturés, estérifiés ou non, à cause de leur double liaison, sont une cible privilégiée des EROs. Ceux-ci provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés, à l'origine de la formation de très nombreux produits primaires (hydroperoxydes) ou secondaires (aldéhydes) dont les activités biologiques sont multiples. Ce phénomène est la peroxydation lipidique. Parmi les acides gras polyinsaturés, l'acide linoléique (C18 : 2)

est le plus abondant dans les tissus des mammifères. La position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux double-liaisons les rendent particulièrement sensibles à l'oxydation par les EROs. Ainsi, la peroxydation des acides gras polyinsaturés les rend plus hydrophiles, ce qui tend à altérer la structure des membranes cellulaires et à perturber le fonctionnement de ces membranes, notamment leur rôle de barrière de transport et de récepteur.

Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques présentent trois phases principales (**Table 1**) :

- une phase d'initiation qui peut être due à l'intervention d'un radical hydroxyl qui est capable d'arracher un atome d'hydrogène.
- une phase de propagation : le radical formé  $R^\bullet$  va immédiatement réagir avec l'oxygène moléculaire, donnant un radical peroxy  $ROO^\bullet$ , qui va à son tour arracher un atome d'hydrogène sur la chaîne insaturée voisine pour générer un hydroperoxyde  $ROOH$  instable et un nouveau radical  $R$  assurant la propagation du processus.
- une phase de terminaison, où se recombinent différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables.

**Table 1** : Les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + OH^\bullet \longrightarrow R^\bullet + H_2O$
Propagation	$R^\bullet + O_2 \longrightarrow ROO^\bullet$ $ROO^\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R^\bullet$
Terminaison	$R^\bullet + R^\bullet \longrightarrow RR$ $ROO^\bullet + R^\bullet \longrightarrow ROR$ $ROO^\bullet + ROO^\bullet \longrightarrow ROOR + O_2$

### 3. Dégradation par oxydation de l'ADN

Il est désormais établi que la production d'EROs conduit à la formation d'un large spectre de modifications de l'ADN (pour revue, voir Cadet et al., 1999; Burrows et Muller, 1998). Les modifications des bases puriques et pyrimidiques, les cassures simple et double-brin, et les sites abasiques, oxydés ou non, constituent les catégories principales de dommages oxydatifs de l'ADN (**Table 2**).

**Table 2 : Principales espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres impliqués dans les réactions d'oxydation de l'ADN**

<b>Espèces - Radicaux</b>	<b>Réactivité avec l'ADN</b>
Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Oxydation de l'adénine
Radical hydroxyle ( <sup>•</sup> OH)	Oxydation des bases et du 2-désoxyribose
Radical superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>•</sup> )	Action indirecte (réduction des radicaux ROO <sup>•</sup> )
Radicaux alkoxydes (RO <sup>•</sup> ) et peroxydes (ROO <sup>•</sup> )	Oxydation des bases et du 2-désoxyribose

## **D. Sources endogènes des EROs**

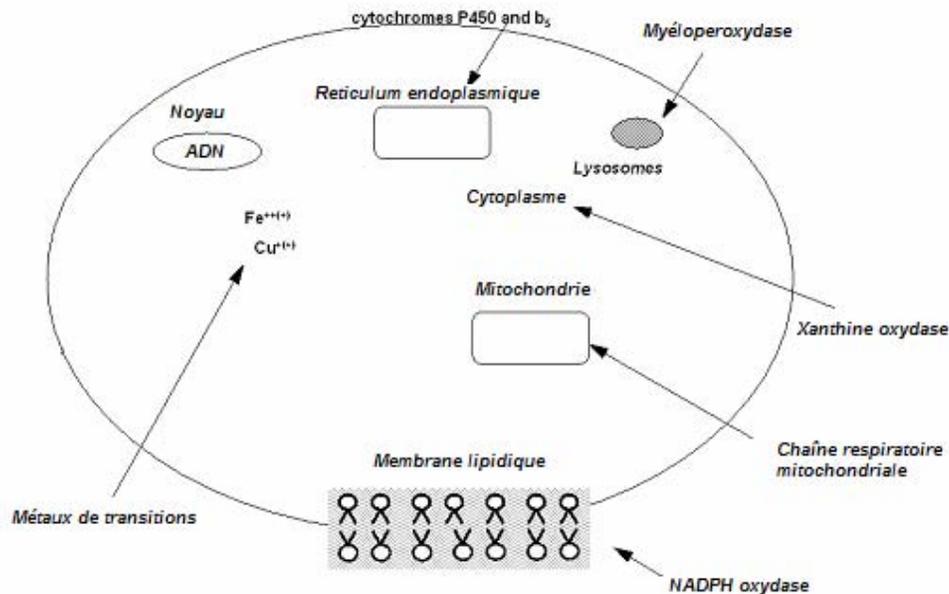
Les EROs sont produits majoritairement à partir de 2 sites cellulaires : la membrane plasmique et la mitochondrie (**Fig. 11**).

### 1. NADPH oxydase

La NADPH oxydase est un complexe multimérique, présent de manière constitutionnelle dans toutes les cellules. Elle catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, pour produire 2 molécules d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

L'enzyme est ancrée dans toute l'épaisseur membranaire, définissant ainsi des domaines intra-, trans- et extra-membranaires.

**Figure 11: Les principales sources cellulaires des EROs. Schéma modifié à partir de Kehrer (Kehrer, 1993).**



Cette disposition lui permet donc d'interagir avec le substrat intracellulaire (NADH,H<sup>+</sup> ou NADPH,H<sup>+</sup>) et de libérer l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de façon préférentielle soit à l'extérieur, soit à l'intérieur des cellules (Souza et al., 2001).

La NADPH oxydase (NOX) est une enzyme composée de plusieurs sous-unités associées aux membranes cellulaires (p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup>) ou localisées dans le cytosol (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, et p67<sup>phox</sup>) (Babior 2004). Le rôle des NADPH oxydases a été très étudié dans les cellules phagocytaires. Ainsi, l'isoforme phagocytaire de la NOX activée produit de larges quantités d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de ses dérivés (Babior 2002). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est ensuite rapidement dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui donnera <sup>•</sup>OH. Lors de l'inflammation, cette production massive d'EROs, est appelée la flambée respiratoire ou « burst oxydatif » et joue un rôle clé dans la première ligne de défense contre les organismes pathogènes.

Plusieurs isoformes de la NOX non phagocytaire sont également présentes dans les cellules nerveuses, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes, les adipocytes, et les hépatocytes. Ces NOX sont capables d'utiliser aussi bien le NADPH que le NADH pour produire des EROs. Elles jouent un rôle clé dans la régulation de voies de signalisation intracellulaires impliquées dans des fonctions

physiologiques essentielles, comme la régulation du système cardiovasculaire (Griendling, 2004; Infanger et al. 2006). Les NADPH oxydases interviennent dans des fonctions neuronales en conditions physiologiques (Infanger et al. 2006). A titre d'exemple, l'activité des NOX dans l'hippocampe est nécessaire à l'induction du phénomène de potentialisation à long-terme (LTP) qui permet la mise en mémoire des informations nerveuses (Knapp et Klann, 2002; Thiels et al., 2000). Dans l'hypothalamus, la signalisation redox dérivée de l'activité de la NOX et initiée dans cette structure cérébrale par l'angiotensine II est essentielle à la régulation centrale du système cardio-vasculaire (Sun et al., 2005). Les NOX jouent aussi un rôle important dans l'induction du stress oxydant observé au niveau de la périphérie et du SNC en conditions pathologiques, comme dans l'hypertension (Infanger et al. 2006) ou lors de la résistance à l'insuline dans l'obésité (Bashan et al. 2009).

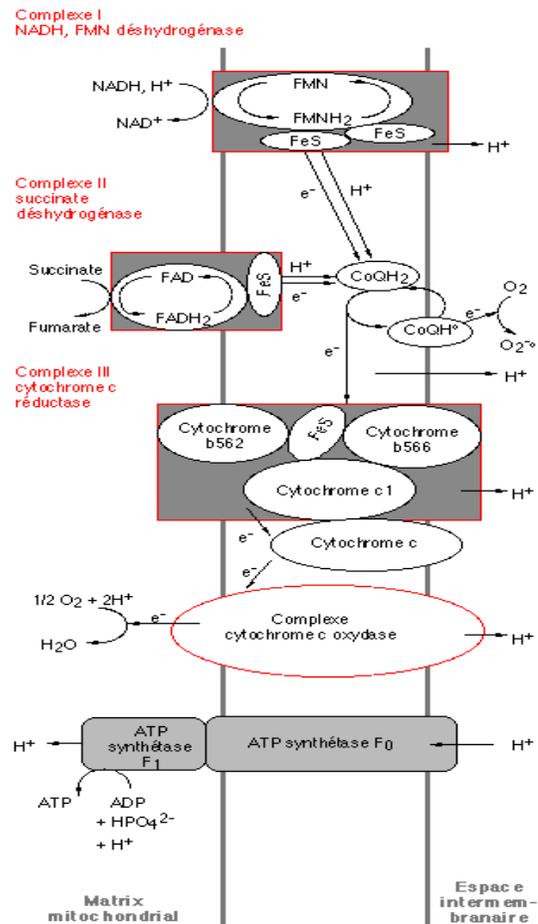
## 2. La chaîne mitochondriale

Les EROs sont également générés au niveau de la membrane mitochondriale interne, près de laquelle est localisé l'ADN mitochondrial (**Fig. 12**). La mitochondrie est le siège d'un métabolisme important de l'oxygène. Lorsque ce métabolisme est incomplet, des EROs sont produits et peuvent sortir de la mitochondrie. Les complexes I et III de la chaîne mitochondriale semblent être à l'origine de la fuite des électrons. Ainsi, compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, la fuite des électrons d'origine mitochondriale semble être la source majoritaire d'EROs dans la cellule, devançant les activités de la NADPH oxydase membranaire.

La mitochondrie est un organite intracellulaire ubiquitaire hautement spécialisé dans la production d'énergie sous forme d'ATP, indispensable aux fonctions cellulaires. La production d'énergie sous forme d'ATP se fait à partir du catabolisme des nutriments. Ceux-ci sont pris en charge par le cycle de Krebs, voie métabolique particulière qui libère très peu d'énergie sous forme de liaison phosphate mais permet l'oxydation complète de l'acétyl CoA. L'énergie ainsi libérée est transformée sous forme d'équivalents réduits, NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>, substrats donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons sont transférés tout le long de la chaîne respiratoire au cours des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Les formes

réduites, NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>, cèdent respectivement leurs électrons au complexe I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Fig. 12**).

**Figure 12: Schéma représentant la chaîne respiratoire au niveau de la membrane mitochondriale**



En condition physiologique, 80% des EROs de la cellule sont produites par la mitochondrie. Une proportion significative de l'oxygène (2 à 6%) échappe à la réduction complète en molécule d'eau et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, pour produire l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La contribution relative des différents complexes de CRM à la production totale mitochondriale d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dépend fortement du tissu examiné (Kwong & Sohal 1998). Le complexe III a longtemps été considéré comme le site principal de production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Turrens & Boveris 1980). Néanmoins, ces dernières années, il a été largement montré que le complexe I joue aussi un rôle important dans la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, notamment dans

les cellules cérébrales (Barja 1999), en condition physiologiques et pathologiques comme lors du vieillissement ou de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Schapira, 1998).

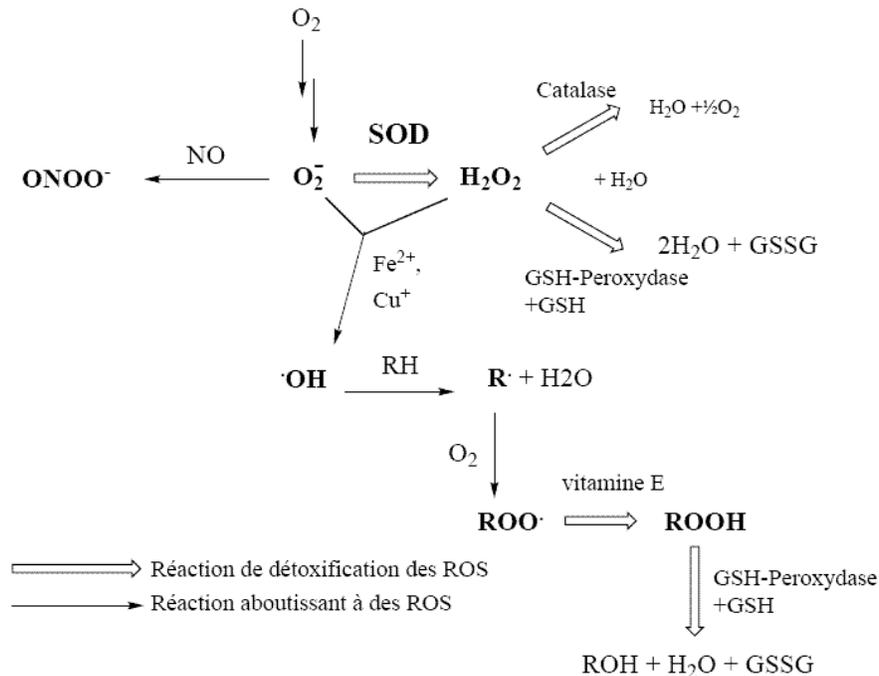
### 3. Le NO et les NO synthases (NOS)

La synthèse de NO<sup>\*</sup> est catalysée par les NO synthases (NOS) (Bergendi et al. 1999). Il en existe 3 isoformes canoniques : 1) Neuronale ou nNOS ; 2) Inductible ou iNOS ; 3) Endothéliale ou eNOS. Les nNOS et les eNOS, constitutives, se caractérisent par une activation rapide et transitoire permettant de faciliter la transmission synaptique ou d'induire la vasodilatation en réponse à des changements du débit sanguin. L'effet de la iNOS est lié quant à la modulation de son expression, par exemple par des médiateurs inflammatoires.

## **E. Prise en charge des EROs**

Comme nous venons de l'expliquer, les EROs sont des molécules capables de modifier l'ensemble des composants cellulaires et de perturber ainsi leur fonction. Il est donc important que les EROs ne s'accumulent pas en trop grande quantité dans la cellule. La production d'EROs est maîtrisée par l'intervention d'enzymes spécifiques et de piègeurs de radicaux libres. Le métabolisme cellulaire répond aux attaques des radicaux libres par une voie enzymatique avec notamment les superoxyde dismutase (SOD1 et SOD2) et la catalase (**Fig. 13**). Ces enzymes constituent ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. Il existe en parallèle une voie non enzymatique telles que le glutathion et l'acide L-ascorbique qui captent les radicaux libres. Les molécules limitant la quantité d'EROs dans la cellule sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent « toute substance présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, qui retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell et Gutteridge, 1990).

**Figure 13: Schéma montrant les diverses réactions impliquant soit les EROs soit les enzymes anti-oxydants**



## 1. Systèmes antioxydants endogènes

### 1.1 La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase est une des rares enzymes capable d'avoir un radical comme substrat, en l'occurrence l'anion superoxyde. La superoxyde dismutase transforme les radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ce dernier étant beaucoup moins réactif. Le peroxyde d'hydrogène produit sera ensuite détoxifié par la catalase.

#### 1.1.1 La superoxyde dismutase de type 1 (SOD 1)

La SOD 1 requiert un noyau hémique Cu/Zn (Cu/ZnSOD), afin de potentialiser son activité enzymatique. La SOD 1 est ubiquitaire et exprimée au niveau des cellules somatiques, et est reconnue comme enzyme anti-oxydant retrouvé au niveau du cytosol. Elle fonctionne sous forme d'un homodimère de 15 KDa. Le cuivre est lié au site actif par interaction avec les atomes d'azote des noyaux imidazole des quatre histidines (His 44, 46, 61, 118) et le zinc est lié au cuivre par interaction avec le noyau imidazole de l'histidine 61 ainsi que His 69, His 78 et Asp 81. L'histidine 61 interagit donc avec les deux métaux et fournirait les protons nécessaires à la réaction de dismutation. L'activité

de la Cu/Zn-SOD est inhibée par le cyanure et par le diéthylthiocarbamate (qui lie le cuivre et le retire du site actif) (à l'inverse de la Mn-SOD ce qui permet une détermination différentielle de ces activités).

### 1.1.2 La superoxyde dismutase de type 2 (SOD 2)

La SOD 2 est une protéine de 222 acides aminés qui est codée au niveau de la chromatine nucléaire, synthétisée dans le cytosol, puis importée dans la matrice mitochondriale. Contrairement à la SOD 1, la SOD 2 est un homotétramère de 22 KDa possédant un noyau manganèse (MnSOD) au niveau de son site actif, qui agit au niveau de la mitochondrie. C'est une protéine acide dont la stabilité est plus faible que celle de la SOD1. Alors que la SOD1 conserve son activité enzymatique dans une large gamme de pH, la SOD2 a une faible activité pour un pH supérieur à 7,8. En revanche, elle n'est pas inactivée par le cyanure de potassium et le diéthylthiocarbamate. Son activité catalytique s'effectue selon un système rédox dans lequel le métal passe d'un état oxydé à un état réduit puis à un état oxydé (Hsu et al., 1996).

### 1.2 La catalase

Cette enzyme retrouvée spécifiquement dans les peroxysomes et les hématies (Ko et al., 2000), permet la dismutation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et en oxygène. La catalase est un homotétramère de 59 KDa, comportant 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase. Le 3-amino-1,2,4-triazole en présence de peroxyde d'hydrogène est un inhibiteur de la catalase. La catalase peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$ .

### 1.3 La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme également capable de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique. Son substrat est le glutathion (GSH) mais d'autres peroxydases existent utilisant le cytochrome c et le

NADH. Il existe 5 isoenzymes de la glutathion peroxydase chez les eucaryotes, dont la plus abondante est la glutathion peroxydase 1 qui est exprimée dans la plupart des cellules (Ursini et al., 1995). Toutefois, il faut noter que la GPx n'est pas spécifique du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais plutôt du glutathion. Toutes les GPx sont inhibées d'une façon irréversible par les cyanures quand le GSH est absent du milieu et par l'iodoacétate. Elles sont également inhibées par les ions superoxydes.

## 2. Systèmes anti-oxydants non enzymatiques

### 2.1 Le système glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) impliqué dans de nombreux processus métaboliques, parmi lesquels le maintien des communications intercellulaires (Barhoumi et al., 1993) et la prévention de l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il constitue le thiol majoritaire au niveau intracellulaire (concentration de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mol/L), où il est présent essentiellement sous forme réduite. Au cours du vieillissement, un déplacement de cet équilibre entre forme thiol et forme disulfure a été mis en évidence et pourrait être impliqué dans des dysfonctionnements cellulaires observés avec l'âge (pour revue, voir Dröge, 2002).

Le glutathion, un chélateur hydrophilique direct retrouvé dans pratiquement tous les compartiments cellulaires, constitue un cofacteur pour la GPx et permet de régénérer les vitamines C et E dans leur forme active (Masella et al. 2005). Le glutathion joue également un rôle très important au niveau cérébral, car les cellules cérébrales consomment 20% de l'oxygène de l'organisme, alors que le cerveau ne représente que 2% du poids corporel. La détoxification des EROs formés de façon continue au cours du métabolisme oxydatif est donc impérative. Le glutathion peut chélater les ions cuivreux et ainsi limiter les réactions de type Fenton (Hanna et Mason, 1992). En tant qu'antioxydant, le glutathion peut donc intervenir par deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes anti-oxydants.

### 2.2 Autres anti-oxydants

Les antioxydants non-enzymatiques incluent l'acide ascorbique (vitamine C) ou l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E). La vitamine E est le chélateur le plus efficace afin de

contrecarrer les radicaux peroxy dans la bicouche de phospholipides membranaires. Cependant, un des produits finaux de l' $\alpha$ -tocophérol (LOOH) est réactif et doit par la suite, être neutralisé par la glutathion peroxydase (Chaudiere and Ferrari-Iliou 1999).

## **F. Mécanismes d'action des EROs**

Les cellules communiquent entre elles et répondent aux stimuli extracellulaires par l'intermédiaire de cascades de signalisation ou de transduction cellulaire.

Différents types cellulaires présentent une légère et rapide augmentation de leurs quantités d'EROs lorsque stimulés par des cytokines, hormones et facteurs de croissance et l'Ang II (Thannickal et Fanburg 2000). D'autres études ont suggéré que l'initiation et/ou le fonctionnement adéquat de certaines cascades de transduction s'appuyaient sur l'action des EROs en tant que molécules de signalisation comme telles à différents niveaux (Lowenstein et al. 1994; Storz 2005).

Les cystéines constituant les protéines peuvent se trouver dans des domaines particulièrement importants pour l'activité de la protéine. Ces cystéines critiques peuvent se situer dans des domaines importants pour la conformation tridimensionnelle, l'activité catalytique d'enzymes, l'interaction d'un facteur de transcription avec sa séquence consensus d'ADN, la dimérisation de facteurs de transcription, comme ceux « à doigt de zinc », ou le trafic subcellulaire de protéines. Leur oxydation peut donc modifier la fonctionnalité de la protéine. Le degré de sensibilité des protéines à cette régulation redox dépend de leur structure et de leur aptitude à être modifiée par oxydation.

### **1. Le système de signalisation redox**

Le terme de signalisation redox est utilisé et regroupe les modifications des molécules (par oxydation) sous l'action des EROs. Lorsque le système est bien géré, la signalisation redox met en jeu la réponse anti-oxydante qui permet un retour rapide à l'état redox initial (**Fig. 14**). Ainsi, les EROs peuvent activer de façon transitoire des voies de signalisation intracellulaires. En condition physiologique, le maintien de la balance entre les systèmes producteurs et les systèmes antioxydants à un état d'équilibre constitue l'homéostasie redox (pour revue, voir Dröge, 2002). Une production relativement modérée d'EROs par les systèmes générateurs, d'une part, et des systèmes de gestion

efficaces, d'autre part, induisent une augmentation physiologique aiguë et transitoire de la concentration d'EROs.

## 2. Les EROs en tant que messagers intracellulaires

Un aspect particulier de la signalisation redox est l'action des EROs sur des facteurs de transcription.

Plusieurs facteurs de transcription peuvent être régulés par les EROs (Pande et Ramos 2005; Valko et al. 2007) :

NFκB (Nuclear Factor κB) : facteur ubiquitaire qui peut être activé *in vivo* par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et HClO (Baeuerle et Baltimore, 1996). La présence d'anti-oxydants tels que la N-acétyl cystéine, les vitamines C et E, la thiorédoxine inhibe cette activation. Les EROs activeraient des kinases chargées de phosphoryler les facteurs I-κB entraînant leur dissociation de NF-κB ce qui lève leur inhibition. Cette action serait inhibée par la glutathion peroxydase de type 1.

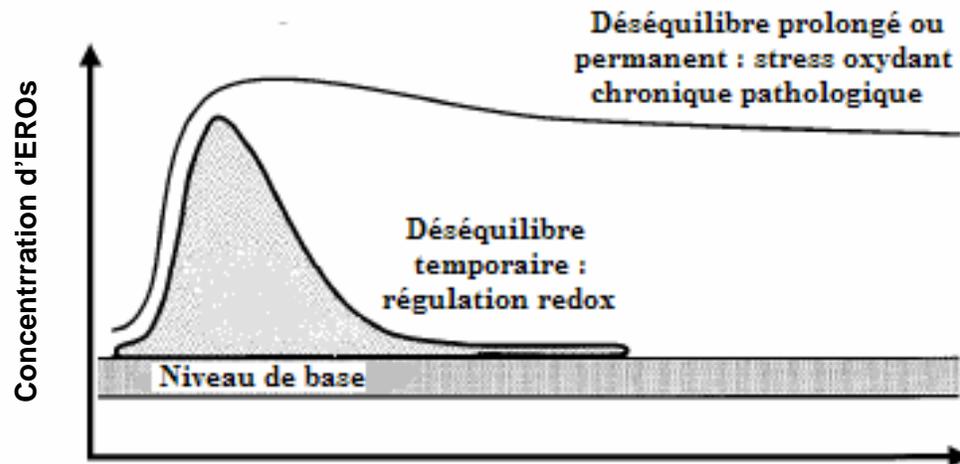
AP-1 : facteur dimérique composé des sous-unités Jun et Fos (association Jun-Jun ou Jun-Fos). Il est activé *in vivo* par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, les Jun kinases (JNK) sont activées par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Abate et al., 1990).

p53 : facteur de transcription qui contient 12 cystéines dans sa séquence protéique. La liaison à l'ADN ainsi que la transcription d'un gène rapporteur placées sous le contrôle de p53 diminuent lors d'un traitement oxydant (peroxyde hydrogène) (Cerruti, 1985).

## 3. Effets pathologiques des EROs

Lorsque les systèmes de gestion des EROs sont dépassés (en raison d'un excès de production d'EROs et/ou d'une diminution des systèmes antioxydants), un stress oxydant apparaît (pour revue, voir Dröge 2002). Ce stress résulte d'une concentration d'EROs très élevée et/ou persistante dans le temps (**Fig. 14**).

**Figure 14: Schéma représentatif des événements cellulaires par la production aiguë ou chronique d'EROs par la cellule**



L'oxydation des molécules environnantes devient alors aspécifique et irréversible, pouvant entraîner une stimulation chronique des voies de signalisation. Dans ce contexte, les EROs, devenues toxiques pour la cellule, peuvent être associées au développement de certains marqueurs pathologiques. Il est donc important de comprendre que le maintien de l'homéostasie des oxydants est primordial pour la physiologie, et qu'un déséquilibre dans le sens d'un excès comme d'un déficit peut conduire dans les deux cas à une situation pathologique, notamment retrouvée dans des cas de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou encore le vieillissement prématuré (Beckman et Ames, 1998; Przedborski et al., 2003; Zhang, 2005).

#### 4. Théorie des radicaux libres

Une théorie du vieillissement semble s'établir comme une référence : celle du vieillissement par les radicaux libres (*The Free Radical Theory of Aging*) (Harman 1956; Harman 1993; Muller et al. 2007). Harman s'est basé sur les travaux de Gerschman (Gerschman et al. 1954) portant sur la toxicité des substances radicalaires oxygénées libres. Il a postulé que ces molécules réactives, notamment les radicaux hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ) et l'hydroperoxyl ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), sont formées à l'intérieur des cellules à partir des processus

oxydatifs normaux du métabolisme cellulaire et participent au développement du vieillissement (Harman 1956). Depuis, plusieurs études ont appuyé et raffiné son hypothèse, la modifiant légèrement pour inclure plus globalement toutes les espèces dites réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) telles que les peroxydes et les aldéhydes. Ces molécules peuvent également jouer un rôle dans les dommages cellulaires oxydants (Sohal et Weindruch 1996; Beckman et Ames 1998). Cette nuance apportée provient de l'existence d'un environnement pro-oxydant dans des conditions physiologiques dû à un déséquilibre dans les molécules pro-oxydantes et anti-oxydantes. Comme les EROs provoquent des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides cellulaires, ce déséquilibre favorisera *in fine* une accumulation, avec l'âge, de dommages oxydants touchant diverses macromolécules menant ainsi à une diminution progressive des fonctions cellulaires. Cette cascade d'événements expliquerait les pathologies associées au vieillissement.

## *Résultats & Discussion*

## **Résultats & Discussion**

### **Objectifs de l'étude**

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'implication des EROs et du métabolisme oxydatif dans les mécanismes de régulation hydro-osmotique.

### **PARTIE 1 - Implication des EROs dans la réponse osmorégulatrice**

#### **Introduction**

L'objectif de cette 1<sup>ère</sup> partie est de démontrer que des EROs sont produites lors de la réponse osmorégulatrice puis de démontrer qu'ils sont indispensables à la mise en jeu de cette réponse.

#### 1) Est ce que les EROs sont produits au cours de la réponse osmorégulatrice ?

Notre modèle d'étude est la souris adulte soumise à une hyperosmolarité plasmatique de longue durée par prise de boisson d'eau salée. Ce paradigme est connu pour stimuler l'axe osmorégulateur et pour causer une augmentation de l'AVP sans provoquer de stress. Ce protocole expérimental nous a permis de démontrer que lors de l'hyperosmolarité plasmatique, l'augmentation d'expression d'AVP et de c-Fos, qui signe la mise en place de la réponse osmorégulatrice, s'accompagne d'une production d'EROs.

#### 2) A quel moment de la réponse osmorégulatrice les EROs sont-elles produites ?

Dans une 2<sup>e</sup> étape, nous avons cherché à quel moment de la mise en place de la réponse osmorégulatrice les EROs sont produits et pour cela nous avons développé un modèle de stimulation osmotique aigüe.

#### 3) La production d'EROs est-elle indispensable à la mise en jeu de la réponse osmorégulatrice ?

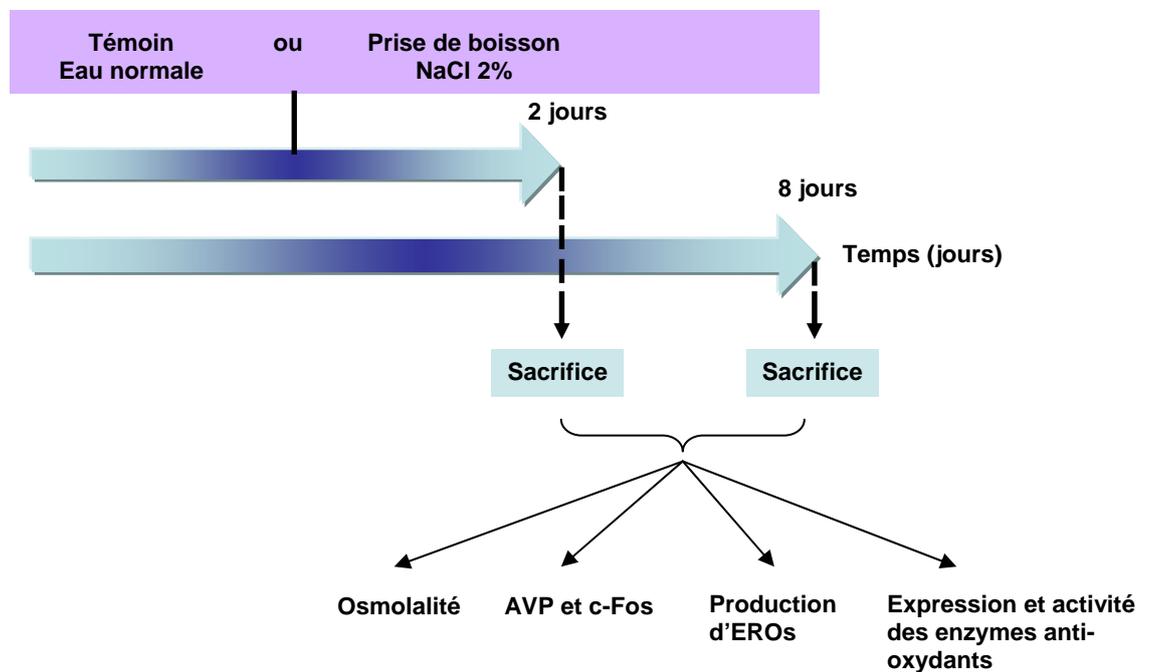
Le modèle d'hyperosmolarité aigüe nous a permis d'analyser l'importance de la production d'EROs dans la réponse osmorégulatrice en combinant la stimulation osmotique aigüe à un traitement systémique par un piègeur de radicaux libres, l'acide  $\alpha$ -lipoïque (AAL).

## Procédures expérimentales

### Traitements

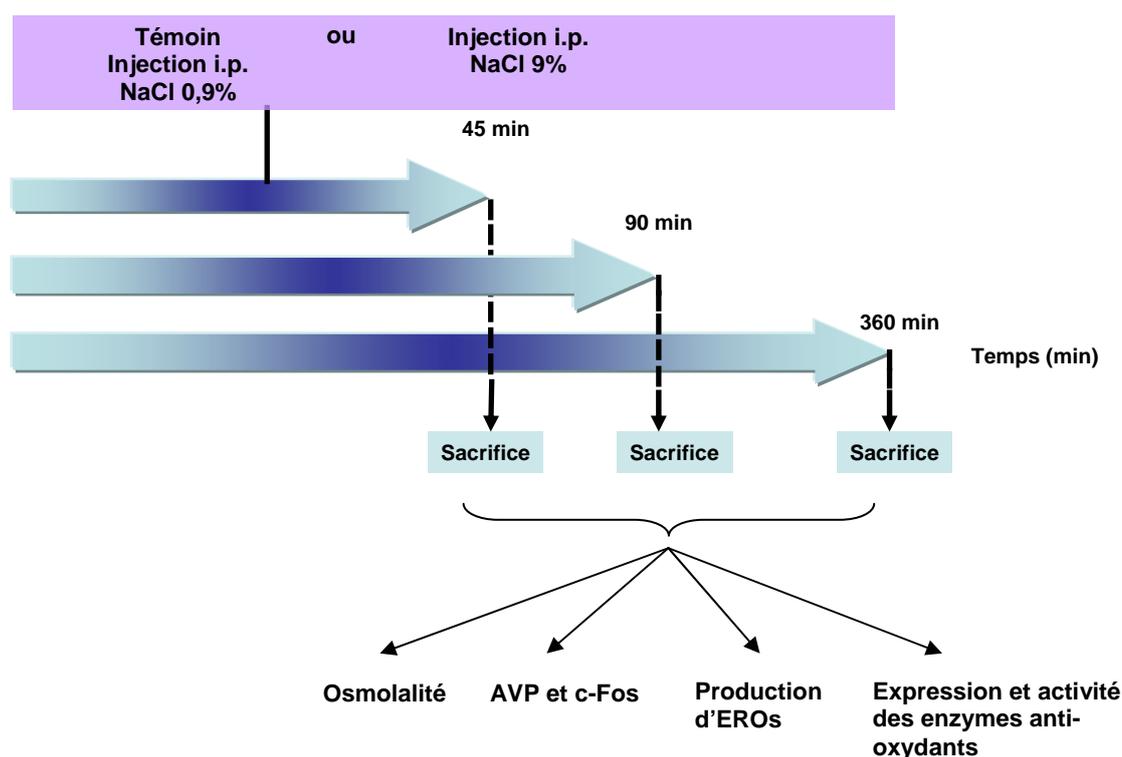
L'hyperosmolarité chronique est induite par consommation d'eau salée (NaCl 2%). Ce paradigme est connu pour stimuler l'axe osmorégulateur sans provoquer l'activation de l'axe corticotrope (Gharbi et al., 2004). Les souris témoins ont eu accès à l'eau normale. Les souris ont été sacrifiées 2 jours ou 8 jours après consommation d'eau salée et divers paramètres de la réponse osmorégulatrice et de la production d'EROs ont été analysées (**Fig.15**).

**Figure 15: Protocole expérimental pour l'induction d'une hyperosmolarité chronique**



Pour l'hyperosmolarité transitoire, les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale (i.p. 1 ml/100 g) (Shiromani et al., 1995) avec une solution saline hyperosmolaire (NaCl 9%). Les souris servant de témoins ont été injectées avec du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Elles sont sacrifiées après 45 min, 90 min ou 360 min, et divers paramètres de la réponse osmorégulatrice et de la production d'EROs ont été analysées (**Fig.16**).

Figure 16: Protocole expérimental pour l'induction d'une hyperosmolarité aiguë



#### Evaluation de l'osmolalité plasmatique

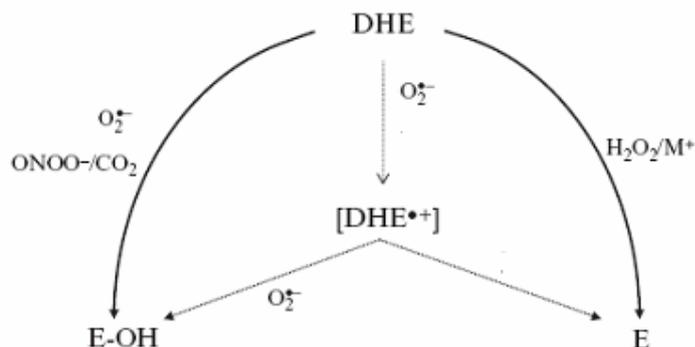
Pour la détermination de l'osmolalité plasmatique, du sang a été prélevé au niveau intracardiaque puis recueilli dans des tubes héparine-lithium. Après centrifugation du sang à 2500g pendant 20 minutes à +4°C, le plasma est recueilli. L'osmolalité du plasma a été ensuite déterminée sur 100 µl, en utilisant un osmomètre (BioBlock Scientific, France). L'osmomètre détermine le point de congélation de solutions aqueuses. La baisse du point de congélation en comparaison avec l'eau pure représente une mesure directe de la concentration osmotique.

#### Détection de la production d'EROs

##### Dihydroéthidine (DHE)

Nous avons utilisé de la dihydroéthidine (DHE, 50 mg/ml dans du sulfoxyde diméthyle-DMSO). Cette molécule a comme propriété de s'oxyder en présence d'anions superoxydes pour former de l'éthidium, une molécule qui s'intercale ensuite dans l'ADN et le rend fluorescent (**Fig. 17**). Son spectre d'émission est de 585 nm et son spectre d'absorption de 488 nm.

Figure 17: Mode d'action de la dihydroéthidine (DHE)



48 h et 24 h avant sacrifice, les souris ont été injectées par voie intrapéritonéale avec une solution de dihydroéthidine (DHE) (Wang et al., 2005). Après les traitements hyperosmolaires chroniques et aigus, les souris ont été anesthésiées puis perfusées avec du paraformaldéhyde 4%. Les cerveaux une fois prélevés et post-fixés, des coupes coronales de 20  $\mu$ m d'épaisseur ont été effectuées avec un cryostat à  $-20^\circ\text{C}$ . Les coupes sont montées sur des lames SuperFrost Plus puis observées avec un microscope à fluorescence Zeiss AxioCam.

#### Carboxy-2'-7' dichlorofluorescéine diacétate (Carboxy- $H_2$ DCFDA)

Les changements intracellulaires en concentration de  $H_2O_2$  ont été mesurés à l'aide d'une sonde redox, le carboxy-2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy- $H_2$ DCFDA, 50 mM dans du DMSO) (Molecular Probes, Invitrogen, France). Elle a la caractéristique de pénétrer dans les cellules et de s'accumuler dans le cytosol. L' $H_2$ DCFDA est tout d'abord, déacétylée par une estérase en dichlorofluorescéine ( $H_2$ DCFH). Ce produit non fluorescent réagit ensuite avec le radical libre  $H_2O_2$  pour former la dichlorofluorescéine désestérifiée ( $H_2$ DCF) qui fluoresce à 535 nm quand elle est excitée à 485 nm. Nous nous sommes basés sur le protocole établi par Jaillard et collaborateurs (Jaillard et al., 2009). Après prélèvement des NSO par punch sur des coupes de cerveau de 400  $\mu$ m d'épaisseur, les niveaux d'EROs ont été évalués en mesurant la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre sur des homogénats. Les résultats sont normalisés sur la teneur en protéines des échantillons.

## Immunohistochimie

### Principe de l'immunohistochimie

Les marqueurs biochimiques étudiés ont été détectés par simple ou double immunofluorescence. Cette technique repose sur la reconnaissance des molécules endogènes que l'on souhaite identifier par des anticorps spécifiques. Les complexes immuns ainsi formés sont mis en évidence par des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce ayant produit les anticorps primaires. Nous avons utilisé deux types d'anticorps secondaires : des anticorps couplés de manière covalente à des marqueurs fluorescents (Alexa488, Alexa594), ou des anticorps biotinylés afin d'amplifier le signal immunohistochimique suivis d'un marqueur fluorescent (Streptavidine couplée à Alexa 488). Les complexes formés sont visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

### Anticorps primaires utilisés

- anti-AVP monoclonal de souris (Robert et al., 1985) dilué 1/5000<sup>e</sup>
- anti-OT monoclonal de souris (Chemicon, Millipore) dilué 1/2500<sup>e</sup>
- anti-c-Fos polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/2000<sup>e</sup>
- anti-SOD1 polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/100<sup>e</sup>
- anti-SOD2 polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1/100<sup>e</sup>
- anti-catalase polyclonal de lapin (Rockland) dilué 1/1000<sup>e</sup>

### Anticorps secondaires utilisés

- anticorps anti-IgG de lapin biotinylé (Vector) dilué 1/250<sup>e</sup>
- streptavidine couplée à l'Alexa 488 (Invitrogen) dilué 1/400<sup>e</sup>
- anticorps anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen) dilué 1/400<sup>e</sup>
- anticorps anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 594 (Invitrogen) dilué 1/400<sup>e</sup>

La spécificité de la technique d'immunomarquage a été vérifiée par omission de l'anticorps primaire ou de l'anticorps secondaire dans le protocole.

## Analyse par RT-PCR quantitative

### Extraction des ARN

Après anesthésie, les cerveaux ont été prélevés et les NSO bilatéraux ont été prélevés par punch à l'aide d'un emporte-pièce de 200 µm de diamètre, puis immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stocké à - 80° C. Les ARNs totaux sont extraits en utilisant un kit d'extraction PicoPure<sup>TM</sup> RNA Isolation Kit (Excilone, France). Le kit comprend un

traitement DNase contre les ADN génomiques contaminants. Les ARNs sont dosés à l'aide d'un spectrofluorimètre (Nanodrop) et leur pureté est vérifiée sur gel d'agarose

### RT-qPCR

#### Synthèse d'ADNc

Environ 1 µg d'ARNs sont convertis en ADNc monobrin, en utilisant Superscript III first strand Synthesis System (Invitrogen, USA) avec 0,3 µg oligo (dT)<sub>20</sub> primer (Invitrogen, USA).

#### Amplification en temps réel

La RT-PCR a été effectuée en utilisant un thermocycleur LightCycler480 II (Roche, Allemagne). Les réactions PCR sont réalisées 3 fois pour chaque échantillon. Le mix PCR contient du LightCyclerR 480 SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Germany). Le milieu d'incubation contient 1/500 de chaque réaction de RT dans du tampon Mastermix 1X contenant les dNTPs, le MgCl<sub>2</sub>, les primers spécifiques (500 nM) et le SYBR Green. Les paramètres de la PCR sont 95°C pendant 5 min puis 45 cycles de 10s à 95°C, 15s à 60°C et 15s à 72°C. Les niveaux d'ARNm sont déterminés par quantification en utilisant le gène rapporteur GAPDH comme contrôle interne.

Les primers (**Table 3**) ont été choisis en utilisant un logiciel Amplifix program (NCBI) primer blast et leur spécificité a été vérifiée en utilisant les logiciels NCBI Gen Bank et Fasta. Les primers nous ont été fournis par Eurogentec (Belgique).

**Table 3 : Séquences des primers**

primers	Séquence (5'-3')
GAPDH for GAPDH rev	TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG TGG GAG TTG CTG TTG AAG TC
SOD1 for SOD1 rev	GCC TTC CGT CCG TCG GCT TC ACG CAC ACC GCT TTC ATC GC
SOD2 for SOD2 rev	TGG GGC TGG CTT GGC TTC AA GCA GCG GAA TAA GGC CTG TTG T
Catalase for Catalase rev	CCT ATT GCC GTT CGA TTC TCC ACA AAG ACT CCA GAA GTC CCA GAC CAT

### Électrophorèse et Immunoblot

La détection et la quantification des enzymes anti-oxydants ont été effectuées par Western-Blot.

A partir de tranches hypothalamiques de 400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur coupées au vibroslice, les NSO bilatéraux sont prélevés par punch à l'aide d'un emporte-pièce de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre. Chaque punch est ensuite homogénéisé dans un tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM à pH 7, 0.2% Triton X-100 et 1% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma, France). Après sonication puis centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes à +4°C, le surnageant est recueilli puis les concentrations en protéines sont déterminées par la méthode de Bradford. Les protéines des différents échantillons sont dénaturées dans du tampon Leammli 2X (Sigma, France) par chauffage à 95° C pendant 5 min. Les protéines (15  $\mu\text{g}$  par puits) ont été séparées par électrophorèse sur gel NuPage 12 % précoulé (Invitrogen) puis transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF). La membrane subit par la suite des traitements immunochimiques afin de détecter les bandes protéiques correspondant aux différentes enzymes anti-oxydantes. Les complexes antigène-anticorps ont été révélés par un kit de détection ECL Plus (GE Healthcare, Royaume-Uni). Chez la souris, les poids moléculaires des enzymes anti-oxydants attendus sont les suivants :

PM SOD 1 : 15 KDa

PM SOD 2 : 22 KDa

PM Catalase : 59 KDa

Nous avons vérifié grâce à de la protéine purifiée que l'anticorps détectait une protéine de PM satisfaisant.

Afin de pouvoir procéder à la semi-quantification des résultats de western-blot, la quantité de protéine totale à déposer sur le gel a été déterminée de façon à se situer dans la partie linéaire de la courbe signal en fonction de la quantité de protéine. L'intensité de chaque bande d'intérêt a ensuite été normalisée par rapport au signal  $\beta$ -actine et rapporté au  $\mu\text{g}$  de protéines totales.

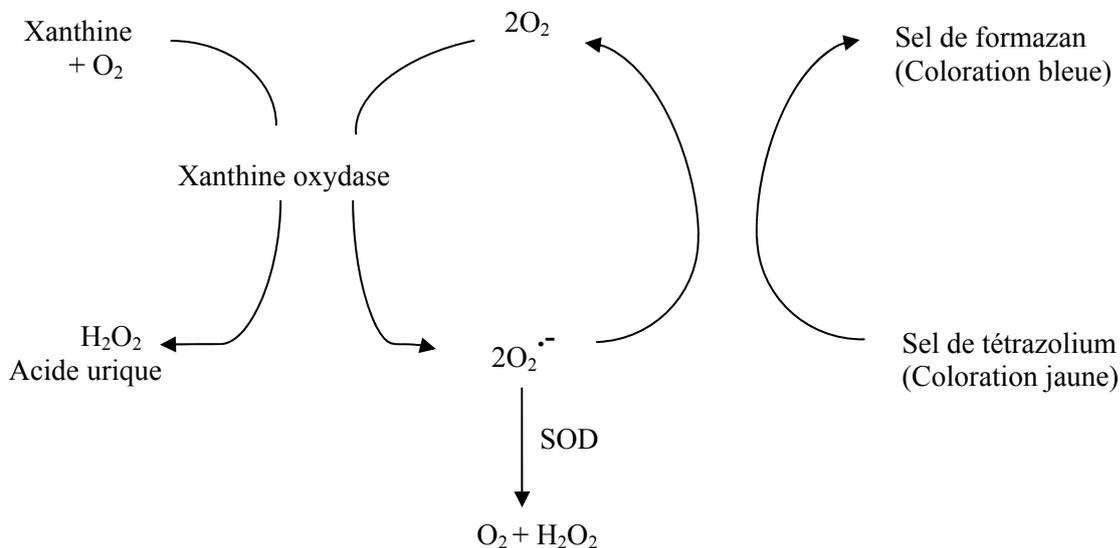
La quantification est réalisée en mesurant la densité optique et la surface de chaque bande grâce au logiciel ImageJ. Les valeurs obtenues sont exprimées en unité arbitraire et sont calculées à partir de l'intensité de la bande (en niveau de gris) par rapport à leur surface ( $\text{mm}^2$ ).

Mesure de l'activité enzymatique des enzymes anti-oxydants

Les activités des enzymes anti-oxydantes SOD 1, SOD2 et catalase ont été évaluées à l'aide d'un kit de dosage fourni par Cayman Chemicals.

Le kit de détection des SOD permet de générer de l'anion superoxyde par le biais de l'action de la xanthine oxydase sur la xanthine. L'anion superoxyde est ensuite détecté par le sel de tétrazolium (solution jaune) qui en présence du radical superoxyde donne une solution bleue violette (**Fig. 18**). Ce kit permet la mesure de l'activité totale des SOD (c'est-à-dire SOD 1 et SOD2). L'activité de la SOD2 seule peut être mesurée en ajoutant à la réaction du cyanure de potassium (KCN), qui inhibe la SOD1.

Figure 18: Schéma du mode d'action du kit de dosage de la superoxyde dismutase (SOD)



Des extraits de NSO ont été homogénéisés dans du tampon refroidi de  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  5mM à pH 7 contenant 1 mM EGTA, du mannitol à 210 mM et du sucrose à 70 mM. Les homogénats ont été centrifugés à 1500g pendant 15 minutes à 4 ° C. Pour séparer les deux enzymes, le surnageant a été centrifugé à 10 000g pendant 15 minutes à 4 ° C. Le surnageant résultant contient préférentiellement Cu/ZnSOD et le culot contient préférentiellement MnSOD mitochondriale. Ensuite, le culot est homogénéisé dans le tampon  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  5mM à pH 7 contenant 1 mM EGTA, du mannitol à 210 mM et du sucrose à 70 mM et 2 mM de KCN pour inhiber la Cu/Zn-SOD.

Une caractéristique-clé du kit est l'inclusion d'un standard SOD afin d'établir une gamme d'étalonnage. La courbe standard est générée en utilisant cette enzyme, fournissant un moyen

de quantifier avec précision l'activité de la Cu/Zn et MnSOD. Dans une plaque de 96 puits, le volume final est de 230 µl dans tous les puits. Les échantillons et les étalons de SOD ont été dosés en double. La plaque a été incubée 20 minutes sur un agitateur à température ambiante. L'absorbance a été suivie à 450 nm en utilisant un lecteur de plaques (Bio-Tek ELx800). La valeur de l'activité SOD de chaque échantillon a été mesurée en utilisant l'équation obtenue à partir de la régression linéaire de la courbe standard:

$$\text{Activité SOD (U/ml)} = (\text{échantillon } A_0/A - (\text{ordonnée à l'origine}) / \text{pente})$$

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour générer la dismutation de 50 % du radical superoxyde. Les données ont été exprimées en U/µg de protéine. Les concentrations en protéines ont été déterminées en utilisant la méthode de Bradford (Coomassie Plus Assay kit, Pierce).

Le kit de dosage de l'activité de la catalase utilise la fonction de peroxydation de la catalase sur le méthanol en présence du radical libre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le formaldéhyde produit est ensuite mesuré par colorimétrie avec le 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) comme substance chromogène. Le purpald incolore forme un composé bicyclique avec les aldéhydes présents pour former par oxydation un composé de couleur violette.



Les tissus ont été homogénéisés dans du tampon K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM à pH7 contenant 1 mM d'EDTA. Après centrifugation à 10000g pendant 15 minutes à 4 ° C, le surnageant a été dosé selon le protocole du kit de dosage. La plaque de 96 puits a été incubée 20 minutes sur un agitateur à température ambiante avant d'ajouter l'hydroxyde de potassium pour arrêter la réaction et en ajoutant ensuite du Purpald. La mesure a été effectuée sur un volume final de 240 µl dans tous les puits. L'absorbance a été suivie à 540 nm en utilisant un lecteur de plaque (Bio-Tek ELx800). La concentration en formaldéhyde de chaque échantillon a été mesurée en utilisant l'équation obtenue à partir de la régression linéaire de la courbe standard de la concentration du formaldéhyde standard fournie par le kit:

$$\text{Formaldéhyde } (\mu\text{M}) = (\text{absorbance échantillon} - (\text{ordonnée à l'origine})) / \text{pente}$$

Enfin, l'activité CAT de l'échantillon a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité CAT (nmol/min/ml)} = \mu\text{M échantillon} / 20 \text{ min}$$

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque la formation de 1 nmol de formaldéhyde par minute à 25° C. Les données ont été exprimées en U /  $\mu\text{g}$  de protéine. Les concentrations en protéines ont été déterminées en utilisant la méthode de Bradford (Coomassie Plus Assay kit, Pierce).

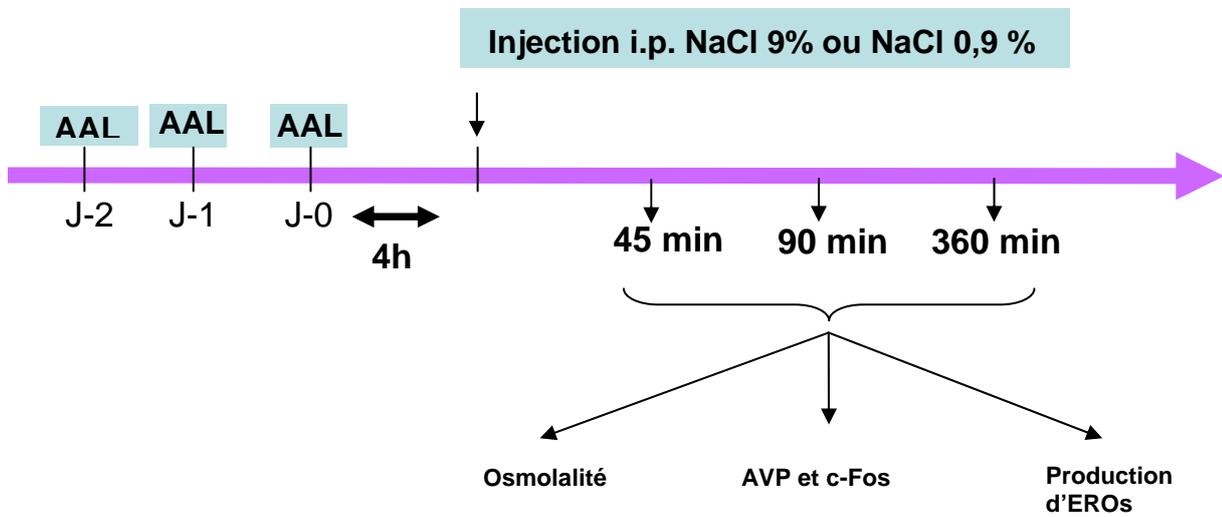
#### Administration de l'acide alpha lipoïque (AAL) et immunomarquage de l'AVP

L'AAL est un puissant anti-oxydant ayant à la fois des propriétés hydro- et liposoluble. Contrairement à d'autres anti-oxydants exogènes classiques comme le Trolox, l'AAL traverse aisément la barrière hémato-encéphalique (BHE) lorsqu'elle est injectée intrapéritonéalement (Schreibelt et al., 2006). Ce procédé nous permet de nous affranchir d'une injection en intra-cérébro-ventriculaire, générant une réponse inflammatoire locale pouvant masquer la production d'EROs due à la réponse osmorégulatrice.

Des souris C3H/HeJ ont été injectées de façon journalière pendant trois jours consécutifs avec de l'acide alpha lipoïque (AAL) (i.p., 100 mg/kg, Sigma, USA) (Packer et al., 1997; Lee et al., 2007). Quatre heures après la dernière injection d'AAL, les souris ont été soumises à des injections de sérum hyperosmolaire, alors que les contrôles ont reçu du sérum physiologique NaCl 0,9%. L'osmolalité plasmatique, le niveau d'AVP et de c-Fos, ainsi que la production de EROs ont été mesurés (**Fig. 19**).

**Figure 19: Protocole expérimental pour le traitement à l'acide  $\alpha$ -lipoïque dans le cas d'une hyperosmolarité aiguë**

AAL : acide alpha lipoïque



## **Résultats**

### Synthèse des résultats obtenus dans l'article 1

Lors de l'activation de l'axe osmorégulateur, l'osmolalité plasmatique est augmentée de façon significative au bout de 2 jours puis retourne à un niveau contrôle après 8 jours. Ces variations s'accompagnent d'un pic d'expression à 2 jours de la protéine c-Fos dans les NSO, ainsi qu'une augmentation progressive au cours des 8 jours de leur contenu en AVP. Ces variations démontrent que la réponse osmorégulatrice exercée par l'AVP se met en place progressivement et qu'après 8 jours de stimulation osmotique, un nouvel état d'équilibre du système est atteint, qui permet de retrouver une osmolalité plasmatique normale grâce à l'augmentation de la synthèse de l'AVP malgré le maintien du stimulus osmotique.

Les analyses des marquages par la DHE montrent un pic de production d'EROs 2 jours après stimulation osmotique, pour revenir à des niveaux proches des contrôles à 8 jours. La quantification de la production d'EROs par le carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA confirme ces observations.

Dans la mesure où la stimulation osmotique pendant 8 jours et la production de EROs qui en résulte ne provoque pas d'altération tissulaire au niveau du NSO, nous avons voulu savoir si les neurones AVP et OT exprimaient les enzymes anti-oxydants. Nous avons porté notre attention sur le système SOD/catalase qui est le principal système antioxydant. Par immunohistochimie, nous avons observé que les 2 isoformes de la SOD (SOD1 et SOD2) ainsi que la catalase sont présents dans les NSO et sont exprimées dans les neurones à AVP et à OT, c'est-à-dire ceux qui contrôlent l'osmorégulation.

L'analyse par immunohistochimie des enzymes anti-oxydants capables de prendre en charge les EROs montre une augmentation nette du niveau de SOD2 dans le NSO de souris soumises à 8 jours de boisson salée, et un pic d'expression de la catalase après 2 jours alors que la SOD1 ne varie pas. L'expression de la SOD1, de la SOD2 et de la catalase a également été mesurée par qRT-PCR et par Western-Blot sur des microdissections de NSO. Enfin, les mesures de l'activité de ces enzymes anti-oxydantes confirment qu'après stimulation hyperosmotique, la SOD 2 et la catalase sont sollicitées pour prendre en charge les EROs alors que la SOD1 ne présente pas de variation de son activité.

Pour mieux comprendre le rôle des EROs dans la réponse osmorégulatrice, nous avons analysé la cinétique de cette réponse. Pour cela, nous avons développé un paradigme

d'hyperosmolarité aiguë par injection intrapéritonéale de NaCl 9%. L'osmolalité plasmatique est augmentée à 45 min puis revient à la normale à 90 min montrant que la réponse osmorégulatrice se met en place rapidement après l'injection de NaCl. Les expressions de c-Fos et d'AVP sont augmentées à 45 min puis on note un retour progressif à la normale témoignant de la normalisation de l'osmolalité.

Les mesures de la production de EROs montrent une production précoce dès 45 minutes après la stimulation hyperosmolaire, démontrée par le marquage redox à la DHE et par la mesure de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détecté par le H<sub>2</sub>DCFDA. A l'inverse de ce que nous avons observé dans le cadre de l'hyperosmolarité chronique, les niveaux d'expression et d'activité des enzymes anti-oxydants ne varient pas. Seules les activités enzymatiques de SOD2 et de catalase sont augmentées et ceci de façon significative 45 minutes après l'injection hyperosmolaire de NaCl.

En conclusion de cette partie, le modèle d'hyperosmolarité aiguë nous a permis de montrer que les ROS sont produits lors de la phase précoce de la réponse osmorégulatrice. Grâce à ce modèle nous avons ensuite pu revenir à la question de départ : Est ce que les ROS sont indispensables à la réponse osmorégulatrice ?

Après injection péritonéale d'AAL pendant 3 jours consécutifs, nous avons soumis les souris au protocole d'hyperosmolarité aiguë pour ensuite analyser la réponse osmotique.

Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité du traitement et effectivement la production de EROs dans le NSO est abolie. L'osmolalité plasmatique chez les souris traitées par l'AAL augmente dès 45 min mais reste élevée au moins jusqu'à 360 min, à la différence de ce que nous avons vu précédemment. Ceci montre que la réponse osmotique ne se met pas en place. L'expression de c-Fos est induite significativement lors de la stimulation osmotique et son niveau reste élevé jusqu'à 360 min, alors qu'elle s'atténuait chez les animaux non traités. Ces résultats démontrent que l'information d'hyperosmolarité est bien signalée au NSO et que l'effet de l'AAL ne s'exerce pas à ce niveau. Enfin, en analysant l'expression de l'AVP, on voit que l'administration d'AAL bloque l'augmentation d'expression d'AVP que l'on observe chez les animaux non traités.

Ces résultats démontrent donc que l'hyperosmolarité plasmatique induit une production de EROs indispensable à l'augmentation d'expression de l'AVP et à la mise en place de la réponse osmotique. Les EROs sont pris en charge spécifiquement par la SOD2 et la catalase.

Les résultats sont présentés dans l'article I suivant (soumis pour publication dans *Endocrinology*).

## **Reactive oxygen species are required for the hypothalamic osmoregulatory response**

Running title: free radicals and regulation of AVP expression

**Ronald St-Louis**<sup>1, 2, 3</sup>, **Caroline Parmentier**<sup>1, 2, 3</sup>, **Danièle Raison**<sup>1, 2, 3</sup>, **Valérie Grange-Messent**<sup>1, 2, 3</sup> and **Hélène Hardin-Pouzet**<sup>1, 2, 3</sup>

1 UPMC Univ Paris 06, 7 quai Saint Bernard, F-75 005 Paris, France

2 INSERM, U952, F-75005 Paris, France

3 CNRS, UMR 7224, F-75005 Paris, France

Correspondence should be addressed to:

Hélène Hardin-Pouzet, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, INSERM UMRS 952, CNRS UMR 7224, UPMC, 7 quai Saint Bernard, Bât A, 3<sup>ème</sup> étage, 75252 Paris Cedex 05, France. phone : 33 1 44 27 36 57, fax : 33 1 44 27 25 08, e-mail: [helene.pouzet@snv.jussieu.fr](mailto:helene.pouzet@snv.jussieu.fr)

Key words: free radicals, supraoptic nucleus, vasopressin, superoxide dismutase, catalase, hyperosmolarity

Acknowledgments : Authors are grateful to Samuel Bornens, IFR83, UPMC, for his technical assistance in the qRT-PCR experiments.

Disclosure summary : the authors have nothing to disclose.

## Abstract

Free radicals, or reactive oxygen species (ROS), are highly reactive byproducts of oxygen degradation. They are well known for their cellular toxicity but few studies have analysed their potential role in homeostatic processes. We investigated ROS production and function during the vasopressin (AVP) hypothalamic response to hyperosmolarity. Six-week old male C3H/HeJ mice were subjected to salt loading for 2 or 8 days. The osmotic axis was progressively activated and reached a new steady-state status at 8 days as demonstrated by monitoring of plasmatic osmolality and c-Fos and AVP expression in the supraoptic nucleus (SON). Free radicals, visualised by dihydroethidine staining and measured by H<sub>2</sub>DCFDA assays, were detected 2 days after salt loading. The activity and expression of superoxide dismutase 2 (SOD2) and catalase were concomitantly upregulated in the SON, suggesting that free radicals are detoxified by endogenous antioxidant systems, thereby avoiding their deleterious effects. The early phase of the osmoregulatory response has been investigated using an acute hyperosmotic model: free radicals were produced 45 minutes after an i.p. injection of 1.5 M NaCl. This was followed by an increase in c-Fos and AVP expression and an increase in SOD2 and catalase activities. Alpha-lipoic acid, a ROS scavenger, administrated during the 3 days prior to the hypertonic i.p. injection, abolished the increase of AVP. These findings establish that hyperosmolarity causes ROS production in the SON, which is essential for AVP increase. This demonstrates the importance of free radicals as physiological signalling molecules in the regulation of body-fluid balance.

## Introduction

Free radicals or reactive oxygen species (ROS) have been extensively studied for their involvement in pathological states such as neurodegenerative diseases, aging, or ischemic stroke (1-3). Indeed, ROS are generated during cellular metabolism, through enzymatic reactions involving oxygen, and their high redox reactivity may alter different cellular components, modifying their biological functions and leading to cellular death (4). Whereas most studies focus on the pathological events resulting from ROS production, recent studies suggest a possible role of ROS in the homeostatic process (5). ROS are known to be involved in the central control of food intake through “nutrient sensing” which adapts the hypothalamic response to glucose intake as needed (6, 7).

The hypothalamus is the main control center for maintaining homeostasis particularly the regulation of body-fluid balance. The osmoregulatory system is controlled by the hypothalamo-neurohypophyseal complex (8), which is composed of magnocellular neurons located within the supraoptic nucleus (SON) and paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. These neurons project their axons towards the neurohypophysis where they release the neurohormone vasopressin (AVP) into the bloodstream. AVP induces water reabsorption by the kidney, contributing to the normalization of plasma osmolality. The synthesis and release of AVP are controlled by complex interactions between the peripheral osmoregulatory pathways and an intrinsic osmosensitivity of the hypothalamus. Among the regulatory systems involved in the regulation of AVP expression, we have previously shown that norepinephrine was particularly important and exerted its action via a nitric oxide (NO) pathway (9, 10). Glutamatergic inputs also play an important role in the regulation of SON neuron excitability, mainly via NMDA receptors (11). Finally, Banisadr et al. have demonstrated the importance of some chemokines in the AVP expression regulating pathway (12, 13). Since NMDA, NO, and chemokines are signalling molecules that lead to the production of ROS (14, 15), we hypothesized that ROS may be produced during the osmoregulatory response, as is the case in the central control of food intake, and that this ROS production may participate in the control of AVP expression.

To address these questions, we adapted to the mouse two classical models of hyperosmotic stimulation in the rat. Using chronic intake of salted water (16, 17), we established that ROS were generated during the osmoregulatory response and that endogenous antioxidant systems

(superoxide dismutase 2, SOD2, and catalase) were stimulated. With the second model, consisting in intraperitoneal injection of hypertonic NaCl (18, 19), we analysed the early phases of the osmoregulatory response. ROS were produced in the first minutes after the injection, followed by an activation of the antioxidant systems. Finally, to demonstrate the importance of ROS in the AVP regulation pathway, mice were pre-treated with a ROS scavenger before the acute hyperosmotic stimulation and the osmoregulatory response was evaluated.

## Materials and methods

### **Animals**

All the experiments were carried out according to French and European legal requirements (Decree 87-848, 86/609/ECC). Six-weeks-old male C3H/HeJ mice (Janvier breeding, France) were housed on a 12:12-h light – dark cycle and provided with food and water *ad libitum*.

*chronic hyperosmolarity stimulation* : mice were supplied with drinking water containing 2% NaCl *ad libitum*. Control male mice were given normal drinking water. Mice were sacrificed at 2 days or 8 days after salt loading.

*acute hyperosmolarity stimulation* : mice received an intraperitoneal injection of hypersomolar saline (NaCl 1.5 M) and were sacrificed after 45 min, 90 min, or 6h. Control male mice were injected with NaCl 0.15 M.

*alpha lipoic acid (ALA) administration* : three-days before acute hyperosmolar treatment, mice were injected daily with DL-alpha lipoic acid (i.p., 100 mg/kg, Sigma, USA) (20, 21). Four hours after the last ALA injection, they were divided into control and experimental groups and were subjected to the acute hyperosmolar procedure.

### **Evaluation of plasma osmolality**

Mice were deeply anesthetized and blood was transcardially collected in heparin-lithium tubes. Plasma was obtained after centrifugation at 2500 g (20 min, 4°C) and osmolality was determined on 100 µl of plasma (n =10 mice per group), using an osmometer (BioBlock Scientific, France).

### **Evaluation of ROS production**

The intracellular changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels were assessed with the fluorescent redox-sensitive dye carboxy-2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA, 50 mM in DMSO) (Molecular Probes, Invitrogen, France) using an adapted protocol from Jaillard (22). SON were dissected and tissues were homogenized in 50 µl of ROS buffer (150 mM KCl, 20 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, and 0.5 mM octanoic acid, pH 7.4). Homogenates were exposed for 30 min (37°C, agitation) to 16 µmol/l carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA and the reaction was stopped with 70% ethanol and 0.1 M HCl (v/v). After centrifugation (3000 g, 15 min, 4°C), supernatants were neutralized with 35 µl of 1 M NaHCO<sub>3</sub>, and centrifuged (6000 g, 15 min, 4°C). The ROS level was evaluated by measuring fluorescence

intensity with a spectrofluorimeter (Cary Eclipse Varian, excitation: 485 nm, emission: 535 nm). Intensity of fluorescence was expressed as concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmol/μg of protein).

### **In situ detection of ROS production**

Dihydroethidine (DHE, 50 mg/ml in dimethyl sulfoxide-DMSO, Invitrogen, France) was diluted 1:50 in 0.05 M PBS and maintained at 37°C. 48 h and 24 h before sacrifice, mice received an i.p. injection of 300 μl of diluted DHE (23). At the end of the chronic or acute hyperosmolarity procedure, mice were anesthetized (pentobarbital 25 mg/kg) and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Frozen brains were sectioned (20 μm). Sections were observed with a Zeiss Axioskop coupled to a Zeiss AxioCam.

### **Immunohistochemistry**

Mice were anesthetized with pentobarbital (25 mg/kg), perfused with saline (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB and frozen brains were sectioned (20 μm). Sections including the SON were blocked in 0.05 M PBS pH 7.4, 1% BSA (Sigma, USA), 0.2% Triton X-100 (1 h), and then incubated overnight with rabbit antisera against Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), Mn-superoxide dismutase (SOD2, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), catalase (1:1000; Rockland, USA), AVP (1:2 000) (24) or c-Fos (1:400, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluted in PBS-BSA-Triton. The sections were then incubated for 2 h with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250; Vector Laboratories, USA) and then for 2 h with streptavidine conjugated to Alexa 488 (1:400; Invitrogen, France). For double immunohistochemistry, sections were incubated with both polyclonal rabbit antibodies against SOD1, SOD2, or catalase and mouse anti-AVP antibody (1:5 000) (25) or mouse anti-OT (1:2 500, Millipore). The antigen-antibody complexes were revealed with a combination of Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody (1:400; Vector Laboratories, USA) and Alexa 594-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:400; Invitrogen, France). Fluorescence was observed with a Zeiss microscope.

### **Electrophoresis and immunoblotting**

After anesthesia, animals were perfused with refrigerated 0.05 M PBS and brains removed. Both SON were punched out on thick frontal sections (400 μm) of the hypothalamus area and homogenized in 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 0.2% Triton X-100, 1% of protease inhibitor cocktail (Sigma, France). Each sample was denatured in 2X Laemmli buffer (Sigma, 5 min, 95°C). Total protein (15 μg) was subjected to electrophoresis (120 V) on NuPAGE 12% Bis-

Tris SDS-PAGE (Invitrogen, France), and electrotransfer (2 h, 400 mA, 4°C) onto a PVDF membrane (Millipore, France). Blots were blocked with 3 % BSA in PBS and 0.1% Tween-20 (1 h) and incubated overnight with the primary antibodies against SOD1 (1:200), SOD2(1:200), catalase (1:2 000), or anti-β-actin antibody (1:5 000, Sigma, France) diluted in the same solution. Antibody binding to blots was detected by incubation with HRP anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10 000, Jackson, France) and the ECL Plus detection system (GE Healthcare, United Kingdom), using Kodak Biomax Light 1 films. Protein levels on blots were estimated arbitrarily with TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, Durham, NC).

### **Superoxide dismutase and catalase activity assay**

SOD1, SOD2, and catalase activities were determined using spectrophotometric assays (Superoxide Dismutase Assay kit and Catalase Assay kit, Cayman, USA).

For SOD1 and 2 determination, the SON were punched out and homogenized in 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose. The homogenates were centrifuged (1 500 g, 5 minutes, 4°C) and their supernatants centrifuged at 10 000 g (15 minutes, 4°C). The cytosolic Cu/Zn SOD1 activity was measured on the resulting supernatant. The mitochondrial Mn-SOD2 was measured in the pellet homogenized in 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, and 2 mM KCN. The samples and the SOD standards were assayed in duplicate (in a 230 µl final volume) in accordance with the manufacturer's instructions. The absorbance was monitored at 450 nm using a plate reader (Bio-Tek ELx800) and the SOD activity value of each sample was expressed as U/µg protein using the standard curve.

For the catalase assay, SON were homogenized in 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 1 mM EDTA and centrifuged (10 000 g, 15 minutes, 4°C). The supernatant was assayed with potassium hydroxide and Purpald in a 240 µl final volume. The absorbance was monitored at 540 nm using a plate reader (Bio-Tek ELx800). The CAT activity of the sample was calculated from the formaldehyde standard curve and was expressed as U/µg protein.

### **RT-qPCR**

After anesthesia, brains were removed, the bilateral SON were punched out and immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNAs were extracted using PicoPure™ RNA Isolation Kit (Excilone, France). Contaminated genomic DNA was removed by treatment with DNase I (Invitrogen, USA). About 1µg of treated RNA was converted into first-strand cDNA using

Superscript III first strand Synthesis System (Invitrogen, USA) with 0.3 µg oligo(dT)20 primer (Invitrogen, USA).

RT-qPCR was carried out in a LightCycler480 II (Roche, Germany) using a LightCyclerR 480 SYBR Green I PCR Mastermix (Roche, Germany). Three RT reactions were performed for each sample and each cDNA sample was analysed in triplicate along with standard and no-template controls. The incubation media contained 1:500 of each RT reaction in 1X Mastermix containing dNTPs, MgCl<sub>2</sub> and buffer, along with 500 nM forward and reverse primers, and the SYBR Green reporter dye. PCR parameters were 95°C for 5 min, 45 cycles at 95°C for 10s, 60°C for 15s and 72°C for 15s. mRNA levels were determined by relative quantification using the GAPDH gene as an internal control (26). All data were normalized to value of genes of interest in the SON to ensure a direct comparison of expression levels. Product purity was confirmed by agarose gel electrophoresis. Data from triplicate experiments were analysed with the LCS 480 1.5 software (Roche, Germany) and were expressed as mean ± S.E.M.

Primers were designed using Amplifix program (NCBI) primer blast and their specificity was checked using NCBI Gen Bank and Fasta. Primers were obtained from Eurogentec (Belgium).

primer	Sequence (5'-3')
GAPDH for GAPDH rev	TCA AGA AGG TGG TGA AGC AG TGG GAG TTG CTG TTG AAG TC
SOD1 for SOD1 rev	GCC TTC CGT CCG TCG GCT TC ACG CAC ACC GCT TTC ATC GC
SOD2 for SOD2 rev	TGG GGC TGG CTT GGC TTC AA GCA GCG GAA TAA GGC CTG TTG T
Catalase for Catalase rev	CCT ATT GCC GTT CGA TTC TCC ACA AAG ACT CCA GAA GTC CCA GAC CAT

### **Protein assay determination**

Protein concentration of samples was determined using the Coomassie Plus™ Protein Assay Kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical Analysis**

All data are expressed as mean percentages of the control value ± SEM, and were compared in a one-way ANOVA, followed by Scheffe's test. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### **Effects of chronic and acute hypertonic stimulation on the osmoregulatory response**

After 2 days of salt-loading, plasma osmolality was significantly increased compared with control C3H mice ( $388.3 \text{ mOsm/kg} \pm 6.7^*$  versus  $343.6 \text{ mOsm/kg} \pm 15.4$ ,  $P < 0.05$ ) and returned to the level of the controls after 8 days ( $339.5 \text{ mOsm/kg} \pm 11.9$ ) (Table 1A). The variations of plasma osmolality paralleled the expression of c-Fos in the SON (Fig. 1B, E, H), which was expressed in cellular nuclei only 2 days after salt loading. AVP immunostaining in the SON was increased 2 days after salt loading compared with the control group (Fig. 1A, D), and remained elevated at 8 days (Fig. 1G). These results demonstrated that salt loading caused a stimulation of the osmoregulatory axis which reached a new steady-state level at 8 days.

In the acute hyperosmolarity model, injection of hypertonic NaCl caused a significant early increase in plasma osmolality at 45 minutes ( $396.2 \text{ mOsm/kg} \pm 7.7^*$  versus  $352 \text{ mOsm/kg} \pm 4.8$ ,  $P < 0.05$ ). Plasmatic osmolality was returned to the control level at 90 minutes ( $366 \text{ mOsm/kg} \pm 8.1$ ) and 6 h after injection ( $367 \text{ mOsm/kg} \pm 2.9$ ) (Table 1B). c-Fos expression was strongly increased in the SON after the hypertonic injection with a peak at 45 minutes (Fig. 5B, E, G). At 360 minutes, c-Fos expression was still higher than in controls (Fig. 5B, J). Immunoreactivity against AVP was increased at 45 minutes (Fig. 5A, D), and then started to decrease at 90 minutes (Fig. 5F) to return to the control level at 360 min (Fig. 5I). These results demonstrate that the osmoregulatory response takes place in the first 45 minutes after hypertonic stimulation and turns off after 360 minutes with a gradual attenuation.

### **ROS production during chronic and acute hypertonic stimulation**

Production of ROS during the osmoregulatory response was investigated by *in situ* detection of oxidized dihydroethidine. Dihydroethidine functions as a redox-sensitive probe, and is oxidized by superoxide to a red fluorescent product (27).

In control animals, a weak cytoplasmic punctiform staining was observed in the SON (Fig. 1C). This staining is enhanced after two days of salt loading (Fig. 1F) and returned to control levels at 8 days (Fig. 1I).

In the acute hypertonic model, an equivalent punctiform staining was detected in control animals (Fig. 5C). Staining intensity was elevated at 45 minutes after the hypertonic

injection (Fig. 5F) and returned towards control levels at 90 minutes and 360 min (Fig. 5H, K).

These results are confirmed by the measurement of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the SON was significantly increased after 2 days of salt loading (148% ± 8\* *versus* 100% ± 9, P<0.05) (Fig. 4A) and returned to control levels after 8 days (119% ± 9). With acute hypertonic stimulation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production increased only at 45 minutes compared with controls (165% ± 9\* *versus* 100% ± 7, P <0.05) (Fig. 7A1). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> then returned to control levels at 90 at 360 minutes (103% ± 20 and 91% ± 8 respectively).

### **Antioxidant profile in response to chronic and acute hypertonic stimulation**

Since no alterations in the tissue integrity of the SON was observed after acute or chronic hypertonic stimulation, we hypothesized that ROS production was catabolized by physiological antioxidant systems to prevent any cytotoxic effects. SOD1, SOD2, and catalase are the main antioxidant systems and their expression and activity were monitored during the chronic and acute hypertonic stimulation.

#### **Antioxidant response after chronic hypertonic stimulation**

Within the SON of control mice, SOD1 is expressed in the AVP and OT magnocellular cell bodies, which is consistent with its constitutively cytoplasmic localization (Fig. 2A, 3A, 3B). The intensity of the staining remained stable throughout the 8 days of salt loading (Fig. 2D, G). This finding was confirmed by the results obtained with RT-qPCR (100% ± 15 for the control, 95% ± 13 for 2 days of salt loading and 65% ± 35 for 8 days of salt loading) (Fig. 4B) and western blots (100% ± 5 for the control, 91% ± 7 for 2 days salt loading and 93% ± 5 for 8 days salt loading) (Fig. 4E). SOD1 enzymatic activity did not vary during the chronic hypertonic stimulation (100% ± 6 for the control, 91% ± 12 for 2 days salt loading and 86% ± 8 for 8 days salt loading) (Fig. 4H).

For SOD2, a weak immunostaining was detected in the SON of control mice (Fig. 2B). SOD2 reactivity was elevated in the cytoplasm of both AVP and OT magnocellular neurons after 2 days of salt loading (Fig. 2E, 3C, 3D) and the staining was more intense after 8 days (Fig. 2H). SOD2 mRNA expression was significantly upregulated by salt loading (123% ± 3\* and 137% ± 12\* *versus* 100% ± 6, P<0.05) (Fig. 4C). The western-blots analyses confirmed the significant increase in SOD2 level at 2 days (149% ± 15\* *versus* 100% ± 12, P<0.05) and 8 days (139% ± 11\*, P<0.05) after salt loading (Fig. 4F). SOD2 enzymatic activity was greatly

elevated after 2 days ( $250\% \pm 16^*$  versus  $100\% \pm 20$ ,  $P < 0.05$ ) and 8 days ( $274\% \pm 15^*$ ,  $P < 0.05$ ) after salt loading (Fig. 4I).

For catalase, the immunostaining level was low in the SON of control mice and it progressively increased throughout salt-loading (Fig. 2C, F, I). Catalase is expressed in both AVP and OT neurons (Fig. 3E, F). The mRNA expression of catalase was significantly increased after 2 days of salt loading ( $142\% \pm 6^*$  versus  $100\% \pm 11$ ,  $P < 0.05$ ) but returned to control levels at 8 days ( $95\% \pm 14$ ) (Fig. 4D). Catalase protein levels were upregulated 2 days and 8 days after salt loading ( $200\% \pm 9^*$ ,  $211\% \pm 13^*$  versus  $100\% \pm 18$  respectively,  $P < 0.05$ ) (Fig. 4G), as was the case for its enzymatic activity ( $178\% \pm 5^*$ ,  $187\% \pm 9^*$  versus  $100\% \pm 16$  respectively,  $P < 0.05$ ) (Fig. 4J).

#### Antioxidant response after acute hypertonic stimulation

The immunoreactive distribution of SOD1 was similar to that observed in the chronic model : a constitutive cytoplasmic distribution in magnocellular neurons (Fig. 6A). No variation in the intensity of the staining was observed after the hypertonic injection (Fig. 6D, G, J). SOD1 transcript expression did also not show any variation ( $100\% \pm 15$  for the control,  $89\% \pm 4$  after 45 minutes,  $78\% \pm 7$  after 90 minutes and  $95\% \pm 4$  after 360 minutes) (Fig. 7B). The stability of SOD1 expression was confirmed by western-blot analysis ( $100\% \pm 6$  for the control,  $124\% \pm 7$  after 45 minutes,  $117\% \pm 5$  after 90 minutes, and  $101\% \pm 5$  after 360 minutes) (Fig. 7E). Finally, the enzymatic activity of SOD1 remained constant after the hypertonic injection ( $100\% \pm 6$  for the control,  $107\% \pm 6$  after 45 minutes,  $106\% \pm 23$  after 90 minutes and  $103\% \pm 9$  after 360 minutes) (Fig. 7H).

For SOD2, immunoreactivity was observed in the magnocellular neurons of the SON (Fig. 6B) and no variation in the staining intensity was detected after the hypertonic injection (Fig. 6E, H, K). The stability of SOD2 expression was confirmed by the RT-qPCR ( $100\% \pm 6$  for the control,  $92\% \pm 5$  after 45 minutes,  $88\% \pm 10$  after 90 minutes and  $108\% \pm 7$  after 360 minutes) (Fig. 7C) and western blots ( $100\% \pm 5$  for the control,  $113\% \pm 2$  after 45 minutes,  $124\% \pm 9$  after 90 minutes and  $115\% \pm 5$  after 360 minutes) (Fig. 7F). In contrast, SOD2 enzymatic activity was significantly increased 45 minutes and 90 minutes after the hypertonic injection ( $138\% \pm 6^*$  and  $136\% \pm 8^*$  versus  $100\% \pm 6$  respectively,  $P < 0.05$ ). Enzymatic activity returned to control levels after 360 minutes ( $102\% \pm 9$ ) (Fig. 7I).

Catalase immunoreaction was found in the cytoplasm of the magnocellular neurons and the intensity of the staining was unchanged after hypertonic injection (Fig. 6C, F, I, L). Catalase presented a similar response profile to SOD2: no variation was detected in expression of

catalase mRNA ( $100\% \pm 17$  for the control,  $100\% \pm 16$  after 45 minutes,  $76\% \pm 19$  after 90 minutes and  $101\% \pm 8$  after 360 minutes) (Fig. 7D) or protein ( $100\% \pm 5$  for the control,  $115\% \pm 5$  after 45 minutes,  $115\% \pm 4$  after 90 minutes and  $84\% \pm 8$  after 360 minutes) (Fig. 7G). A significant increase in catalase enzymatic activity was detected 45 and 90 minutes after the hypertonic injection ( $129\% \pm 6^*$  and  $204\% \pm 21^*$  *versus*  $100\% \pm 8$  respectively,  $P < 0.05$ ). Catalase activity returned to control levels 360 minutes after injection ( $121\% \pm 17$ ) (Fig. 7J).

### **Effect of DL-alpha lipoic acid administration on the osmoregulatory response**

To evaluate the importance of ROS production in triggering the osmoregulatory response, mice were administrated with  $\alpha$ -lipoic acid over three days prior to acute hypertonic stimulation, the last injection taking place 4 h prior to the 1.5 M NaCl injection. After 45, 90, and 360 minutes, plasmatic osmolality was measured; c-Fos and AVP expression, and ROS production were evaluated in the SON.

In control mice (NaCl 0.15 M),  $\alpha$ -lipoic acid alone did not have any effect on plasmatic osmolality (table 1C) neither on c-Fos and AVP expression and distribution (compare Fig. 8A, B with Fig. 5A, B).

In mice treated with  $\alpha$ -lipoic acid, a significant increase in plasmatic osmolality was detected 45 minutes after NaCl 1.5 M injection, as for untreated mice, but this increase was maintained at 90 and 360 minutes after the injection. Similarly, in the SON, the c-Fos expression profile was increased at 45 minutes in  $\alpha$ -lipoic acid-treated mice and maintained over 360 minutes (Fig. 8D, F, H *versus* Fig. 5E, G, J). By contrast, AVP expression and distribution did not vary in  $\alpha$ -lipoic acid treated mice at 45, 90, and 360 minutes after the hypertonic injection of NaCl 1.5 M (Fig. 8B, C, D) and  $H_2O_2$  production, evaluated with  $H_2DCFDA$ , remained stable ( $102 \pm 4$  ;  $93 \pm 6$ ,  $104 \pm 3$  *versus*  $100 \pm 6$  respectively) (Fig. A2).

## Discussion

The present study has analysed the importance of free-radical production in the osmoregulatory response. To demonstrate that ROS are produced in response to hyperosmolarity, we first adapted to the mouse a chronic model of salt loading classically described for the rat (17). The kinetics of the osmoregulatory response was followed by monitoring plasma osmolality, and c-Fos and AVP expression levels in the SON since numerous studies have demonstrated that upregulation of c-Fos expression is an early event of the osmoregulatory response taking place before the increase in AVP expression (18, 28). In the normal mice, plasma osmolality was found at 343 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (29). After 48 h of salt loading, plasma osmolality was significantly increased and c-Fos and AVP expression were stimulated in the SON, as previously described (30, 31). After 8 days, SON stopped expressing anymore c-Fos whereas AVP expression was still increased and the plasmatic osmolality returned to the control levels. This established that the AVP osmoregulatory response took place progressively, and after 8 days of osmotic stimulation, a new allostatic steady-state level settled (32).

This response of the osmotic system is accompanied by ROS production 48 h after salt loading, as demonstrated by the *in situ* oxidation of the fluorescent redox-sensitive dye DHE, and by the carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA assay. Eight days after salt loading, when the new allostatic steady state is reached, and plasma osmolality is normalized, ROS production returned to the control level.

Free radicals are the result of respiratory metabolism involving mitochondria, which generates superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (33). Free radicals are highly reactive oxidant species and can adversely affect DNA, lipid, and cellular proteins, resulting in nucleotide oxidation, lipid peroxidation, and protein nitration (34, 35). The fact that no cellular alteration was detected in the SON even after 8 days of salt loading, suggests that ROS produced in response to the hyperosmotic stimulus are removed by the cellular antioxidant systems thus maintaining the cellular redox status and avoiding toxicity (36). Among the cellular anti-oxidant systems, one of the most important is the superoxide dismutase/catalase system (37, 38). Superoxide dismutase is expressed in the brain under two isoforms: copper/zinc (Cu/Zn)-SOD1 and manganese (Mn)-SOD2. Cu/Zn-SOD1 is constitutively expressed and located in the cytosol (37, 39) and we found this isoform to be

particularly abundant in magnocellular neurons. Mn-SOD2 is located in mitochondria (40, 41) and its expression is highly regulated (38). Both SOD isoforms convert the superoxide anion into hydrogen peroxide. The latter is then converted into H<sub>2</sub>O through catalase in peroxisomes or other enzymatic or non-enzymatic antioxidant systems.

We analysed SOD1, SOD2, and levels of catalase expression and activity in the chronic hyperosmolarity model. These antioxidant enzymes were expressed within the SON, in vasopressinergic magnocellular neurons. They were also present in oxytocin neurons, which do participate in the osmoregulatory response (31, 42). Our results demonstrate unchanged levels of activity and protein expression of SOD1 throughout salt loading, which is consistent with a constitutive expression within the cell. In contrast, SOD2 enzymatic activity was increased after 2 days of salt loading, and was maintained for 8 days. This correlated with an upregulated SOD2 protein expression, demonstrated by increased levels of SOD2 mRNA and protein. The contrast between SOD1 and SOD2 responses demonstrates the specificity of the antioxidant response : this was not a global increase of the cellular enzymatic activities but the result of activation of a particular regulation pathway. The profile of catalase activity closely followed that of SOD2, and this was consistent since catalase dismutates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by SOD2. The increase in catalase activity resulted from an upregulation of the protein level after 2 and 8 days of salt loading. However, mRNA levels were increased only at 2 days after the onset of salt loading. This return to control values of catalase mRNA levels could be related to the normalization of plasma osmolality, the stopping of ROS production, and to the establishment of the new allostatic steady state by the osmoregulatory system.

The second aim of our study was to determine the time course of ROS production during the osmoregulatory response. For this purpose, an i.p. hypertonic NaCl injection protocol was designed (18). This model had the advantage of better controlling the duration of the osmotic stimulation and thereby allowing the early phases of the osmoregulatory response to be analysed. The hypertonic injection induced a plasmatic hyperosmolality at 45 minutes, which is compensated at 90 minutes. This was accompanied by a peak in c-Fos expression, which was maximal at 45 minutes (43), and by similar variations of AVP expression. Analysis of DHE staining and H<sub>2</sub>DCFDA assays demonstrated that free radicals were produced during the early phase of the osmoregulatory response, at 45 minutes, and their levels returned to control values at 90 minutes. The antioxidant response to free-radical production was also analysed during chronic stimulation. This response was exerted by SOD2 and catalase, because the expression and activity levels of SOD1 did not vary. In contrast with the chronic stimulation

protocol, only the activities of SOD2 and catalase were increased, at 45 minutes and 90 minutes. This could be because the hypertonic stimulation by i.p. injection is punctual. In contrast chronic stimulation is maintained over time and requires a long-term response, involving translational and transcriptional mechanisms to ensure elevated enzymatic activities over the whole duration of the stimulus.

Our findings demonstrate that, when the osmotic axis is activated, ROS are produced in the early phase of the osmoregulatory response. Our initial hypothesis suggested that ROS production was part of the signalling pathway involved in the regulation of AVP expression. The ROS scavenger  $\alpha$ -lipoic acid (ALA), a powerful antioxidant molecule, was therefore injected into mice before acute osmotic stimulation and the different parameters of the osmoregulatory response, in particular AVP expression, were evaluated. ALA is an essential co-factor for mitochondrial respiratory enzymes (44) and is found naturally in diets (45). Compared with other classical antioxidants, such as Trolox, ALA easily crosses the blood brain barrier when injected intraperitoneally (21, 46). This procedure therefore does not require an i.c.v. injection, which generates an inflammatory response and ROS production, which could interfere with the osmoregulatory ROS production. Administration of ALA alone did not modify the plasmatic osmolality neither AVP levels. In contrast, when ALA was injected before the acute hypertonic stimulation, ROS production was abolished, AVP response was blocked and hyperosmolarity was not corrected. Since c-Fos expression profile was found similar to untreated mice, it demonstrates that the hyperosmolality was still signalled to the SON and that AVP and c-Fos are on two distinct transduction pathway (47).

In conclusion, our study demonstrates that ROS production is crucial for the AVP regulatory pathway and more generally for the osmoregulatory response. Free radicals could have a role in the “osmosensing” pathway, as they are involved in “nutrient sensing” for food intake (48). They could be the result of the osmoregulatory ascending projections that converge on NMDA, NO, and chemokine signalling. They could also be the result of the activation of osmoreceptors located in the membranes of magnocellular neurons (31).

Our study also brings new insights into the effects of antioxidant treatments. Indeed, antioxidant molecules such as ALA, are frequently used to prevent cardiovascular diseases (49), renal inflammation (50), or memory loss during aging and Alzheimer’s disease (45). The effect that we described here on the osmoregulatory axis must be taken into account since it could worsen the electrolytic balance, which is frequently dysregulated in aging patients.

**Table 1****A**

Treatment	Mouse (n)	Plasmatic osmolality (mOsmol/kg H <sub>2</sub> O) (mean ± SEM)
Control (H <sub>2</sub> O)	10	343.6 ± 15.4
Salt loading		
2% NaCl (2 days)	10	388.3 ± 6.7 *
2% NaCl (8 days)	10	339.5 ± 11.9

\* p < 0.05 as compared to control group

**B**

Treatment	Mouse (n)	Plasmatic osmolality (mOsmol/kg H <sub>2</sub> O) (mean ± SEM)
NaCl 0.15 M	6	352 ± 4.8
NaCl 1.5 M 45 min	6	396.2 ± 7.7 *
NaCl 1.5 M 90 min	6	366 ± 8.1
NaCl 1.5 M 360 min	6	367 ± 2.9

\* p < 0.05 as compared to control group

**C**

Treatment	Mouse (n)	Plasmatic osmolality (mOsmol/kg H <sub>2</sub> O) (mean ± SEM)
NaCl 0.15 M + ALA	6	352.6 ± 5.1
NaCl 1.5 M 45 min + ALA	6	385.2 ± 7.8 *
NaCl 1.5 M 90 min + ALA	6	385.7 ± 9.1 *
NaCl 1.5 M 360 min + ALA	6	384.8 ± 14.7 *

\* p < 0.05 as compared to control group

## Figure legends

### Table 1. Plasmatic osmolality along chronic or acute hyperosmotic stimulation

Osmolality was assessed on 100  $\mu$ l of plasma and expressed as mOsm/kg H<sub>2</sub>O. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 10). \* P<0.05.

A: Plasmatic osmolality after 2 or 8 days of salt loading. B: Plasmatic osmolality 45, 90, and 360 minutes after intraperitoneal injection of 1.5 M NaCl. C: Plasmatic osmolality 45, 90, and 360 minutes after intraperitoneal injection of 1.5 M NaCl in mice pre-treated for 3 days with  $\alpha$ -lipoic acid.

### Figure 1. Effect of chronic hypertonic stimulation on AVP and c-Fos expression and on ROS production

Immunodetection of AVP and c-Fos in the supraoptic nucleus (SON) of control mice (A, B), and salt-loaded mice after 2 days (D, E) or 8 days (G, H). AVP expression was increased after 2 days and remained elevated at 8 days. c-Fos was expressed in the SON after 2 days of salt loading. OC: optic chiasm, bar =50  $\mu$ m.

*In situ* detection of ROS production by dihydroethidine (DHE) in control (C) or salt-loaded mice (F, I) indicated by white arrows. DHE staining is enhanced 2 days after salt loading. Bar = 20  $\mu$ m.

### Figure 2. Effect of chronic hypertonic stimulation on SOD1, SOD2 and catalase expression

Immunodetection of SOD1, SOD2, and catalase in the supraoptic nucleus (SON) of control mice (A, B, C), and salt-loaded mice after 2 days (D, E, F) and 8 days (G, H, I). SOD1 expression did not vary with salt loading (A, D, G) whereas SOD2 and catalase expression was enhanced after 2 and 8 days of salt loading (B, E, H and C, F, I respectively). OC : optic chiasm, bar = 50  $\mu$ m.

### Figure 3. Co-detection of SOD1, SOD2, or catalase with AVP or OT in mice subjected to 2 days of salt loading

SOD1 (A, B), SOD2 (C, D) and catalase (E, F) were detected in both AVP (A, C, E) and OT (B, D, F) neurons of the SON. Green fluorescence indicates SOD1, SOD2, or catalase, red fluorescence indicates AVP or OT. OC : optic chiasm, bar = 50  $\mu$ m, inset bar = 20  $\mu$ m.

**Figure 4. Effect of chronic hypertonic stimulation on ROS production and antioxidant enzymes profile**

ROS production was measured by carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA assay in control, and salt-loaded mice at 2 and 8 days (A). SOD1 (B, E), SOD2 (C, F) and catalase (D, G) expressions were assessed by RT-qPCR and western-blot analysis (B, C, D and E, F, G respectively). Enzymatic activity of SOD1 (H), SOD2 (I) and catalase (J) was measured by specific spectrophotometric assays. Data reported are mean percentages of the control mice  $\pm$  SEM. \**p* <0.05 compared with control group by a one-way ANOVA. Insets: representative bands of SOD1, SOD2, catalase and  $\beta$ -actin obtained by western blot for control, and salt-loaded mice at 2 and 8 days.

**Figure 5. Effect of acute hypertonic stimulation on AVP and c-Fos expression and on production of ROS**

Immunodetection of AVP and c-Fos in the supraoptic nucleus (SON) of control mice (A, B), or mice injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl at 45 minutes (D, E), 90 minutes (F, G), and 360 minutes (I, J). AVP expression was increased after 45 minutes and gradually returned to control levels. c-Fos was expressed as a peak reaching a maximum at 45 minutes. OC: optic chiasm, bar = 50  $\mu$ m.

*In situ* detection (indicated by white arrows) of ROS production by dihydroethidine (DHE) in control mice (C) or mice injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl at 45 (F), 90 (H), and 360 minutes (K). DHE staining is enhanced at 45 minutes. Bar = 20  $\mu$ m.

**Figure 6. Effect of acute hypertonic stimulation on SOD1, SOD2, and catalase expression**

Immunodetection of SOD1, SOD2, and catalase in the supraoptic nucleus (SON) of control mice (A, B, C), or mice injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl at 45 minutes (D, E, F), 90 minutes (G, H, I) and 360 minutes (J, K, L). SOD1, SOD2, and catalase expression did not vary after NaCl injection. OC: optic chiasm, bar = 50  $\mu$ m.

**Figure 7. Effect of acute hypertonic stimulation on ROS production and anti-oxidant enzymes profile**

ROS production was measured by carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA assay in mice injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl after 45, 90, and 360 minutes (A1) and in mice pre-treated

over 3 days with  $\alpha$ -lipoic acid and injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl after 45, 90, and 360 minutes (A2). SOD1 (B, E), SOD2 (C, F), and catalase (D, G) expression levels were assessed by RT-qPCR and western-blot analysis (B, C, D and E, F, G respectively). Enzymatic activity of SOD1 (H), SOD2 (I), and catalase (J) was measured by specific spectrophotometric assays.

Data reported are mean percentages of the control mice values  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  compared with control group by one-way ANOVA. Insets: representative bands of SOD1, SOD2, catalase, and  $\beta$ -actin obtained by western blot for control, or mice injected intraperitoneally with 1.5 M NaCl.

**Figure 8. Effect of acute hypertonic stimulation on AVP and c-Fos expression in ALA-pre-treated mice**

Alpha-lipoic acid (ALA) was injected intraperitoneally over 3 days before a 1.5 M NaCl intraperitoneal injection. AVP and c-Fos were immunodetected in the SON at 45, 90, and 360 minutes after the hypertonic stimulation. OC: optic chiasm, bar = 50  $\mu$ m.

## References

1. **Fernández-Checa JC, Fernández A, Morales A, Marí M, García-Ruiz C, Colell A** 2010 Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 439-454.
2. **Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P** 2010 Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S453-73.
3. **Mancuso A, Sacchetta S, Saletti PC, Tronconi C, Milesi L, Garassino M, Martelli O, Leone A, Zivi A, Cerbone L, Recine F, Sollami R, Labianca R, Cavalli F, Sternberg CN** 2010 Clinical and molecular determinants of survival in pancreatic cancer patients treated with second-line chemotherapy: results of an italian/swiss multicenter survey. *Anticancer Res* 30: 4289-4295.
4. **Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona M, Pénicaud L, Casteilla L** 2006 Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species. *Med Sci (Paris)* 22: 47-53.
5. **MacFarlane PM, Mitchell GS** 2008 Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience* 152: 189-197.
6. **Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud L** 2007 Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56: 152-160.
7. **Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Périquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L** 2006 Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084-2090.
8. **Bourque CW** 2008 Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9: 519-531.
9. **Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A** 2004 Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J Neurosci Res* 78: 683-690.
10. **Maolood N, Grange-Messent V, Raison D, Hardin-Pouzet H** 2007 Noradrenergic regulation in mouse supraoptic nucleus involves a nitric oxide pathway only to regulate arginine-vasopressin expression and not oxytocin expression. *J Neurosci Res* 85: 2991-2999.

11. **Panatier A, Gentles SJ, Bourque CW, Oliet SHR** 2006 Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol* 573: 711-721.
12. **Callewaere C, Banisadr G, Desarménien MG, Mechighel P, Kitabgi P, Rostène WH, Mélik Parsadaniantz S** 2006 The chemokine sdf-1/cxcl12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through cxcr4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8221-8226.
13. **Callewaere C, Banisadr G, Rostène W, Parsadaniantz SM** 2007 Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 38: 355-363.
14. **Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA** 2009 NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12: 857-863.
15. **Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C** 2009 NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2. *J Neurosci* 29: 2545-2552.
16. **Di S, Tasker JG** 2004 Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Endocrinology* 145: 5141-5149.
17. **Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J** 2005 Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett* 379: 75-80.
18. **Penny ML, Bruno SB, Cornelius J, Higgs KAN, Cunningham JT** 2005 The effects of osmotic stimulation and water availability on c-fos and fosB staining in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Exp Neurol* 194: 191-202.
19. **Wang K, Guldenaar SE, McCabe JT** 1997 Fos and jun expression in rat supraoptic nucleus neurons after acute vs. repeated osmotic stimulation. *Brain Res* 746: 117-125.
20. **Lee EY, Lee C, Lee K, Park JY, Cho K, Cho YS, Lee HR, Moon SH, Moon H, Yoo B** 2007 Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen-induced arthritis and protects against bone destruction in mice. *Rheumatol Int* 27: 225-233.
21. **Packer L, Roy S, Sen CK** 1997 Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol* 38: 79-101.
22. **Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Pénicaud L, Lorsignol A** 2009 Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58: 1544-1549.

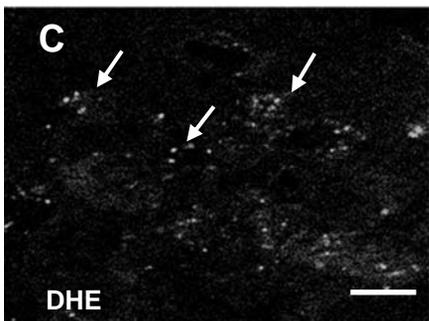
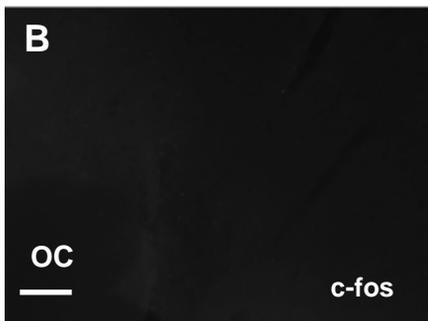
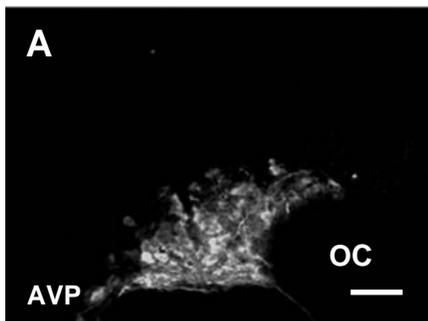
23. **Wang J, Tsirka SE** 2005 Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 36: 613-618.
24. **Alonso G** 1988 Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res* 453: 191-203.
25. **Robert FR, Léon-Henri BP, Chapleur-Chateau MM, Girr MN, Burlet AJ** 1985 Comparison of three immunoassays in the screening and characterization of monoclonal antibodies against arginine-vasopressin. *J Neuroimmunol* 9: 205-220.
26. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** 2002 Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
27. **Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ** 1996 Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-1336.
28. **Pirnik Z, Mravec B, Kiss A** 2004 Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (pvn) and supraoptic (son) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochem Int* 45: 597-607.
29. **Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J** 2000 Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F339-51.
30. **Amaya F, Tanaka M, Tamada Y, Tanaka Y, Nilaver G, Iyata Y** 1999 The influence of salt loading on vasopressin gene expression in magno- and parvocellular hypothalamic neurons: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *Neuroscience* 89: 515-523.
31. **Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM** 2004 Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169-208.
32. **McEwen BS, Wingfield JC** 2003 The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15.
33. **Indo HP, Davidson M, Yen H, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, Higuchi M, Koga Y, Ozawa T, Majima HJ** 2007 Evidence of ros generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial dna damage. *Mitochondrion* 7: 106-118.
34. **Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN** 1996 Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and dna in the brain of rats. *FASEB J* 10: 1532-1538.

35. **Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC** 2001 Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24: 420-429.
36. **Wilson JX** 1997 Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 1149-1163.
37. **Filipović D, Pajović SB** 2009 Differential regulation of cuznsod expression in rat brain by acute and/or chronic stress. *Cell Mol Neurobiol* 29: 673-681.
38. **Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH** 2009 Regulation of mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by stat3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29: 7003-7014.
39. **Siqueira IR, Fochesatto C, de Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA** 2005 Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci* 23: 663-671.
40. **Bayir H, Kochanek PM, Kagan VE** 2006 Oxidative stress in immature brain after traumatic brain injury. *Dev Neurosci* 28: 420-431.
41. **Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J** 1998 The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 5: 1219-1228.
42. **Van Tol HH, Voorhuis DT, Burbach JP** 1987 Oxytocin gene expression in discrete hypothalamic magnocellular cell groups is stimulated by prolonged salt loading. *Endocrinology* 120: 71-76.
43. **Shiromani PJ, Magner M, Winston S, Charness ME** 1995 Time course of phosphorylated creb and fos-like immunoreactivity in the hypothalamic supraoptic nucleus after salt loading. *Brain Res Mol Brain Res* 29: 163-171.
44. **Bist R, Bhatt DK** 2009 The evaluation of effect of alpha-lipoic acid and vitamin e on the lipid peroxidation, gamma-amino butyric acid and serotonin level in the brain of mice (mus musculus) acutely intoxicated with lindane. *J Neurol Sci* 276: 99-102.
45. **Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, Carlson DA, Münch G** 2008 Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1463-1470.
46. **Akpınar D, Yargıçođlu P, Derin N, Alicigüzel Y, Ađar A** 2008 The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Physiol Res* 57: 893-901.

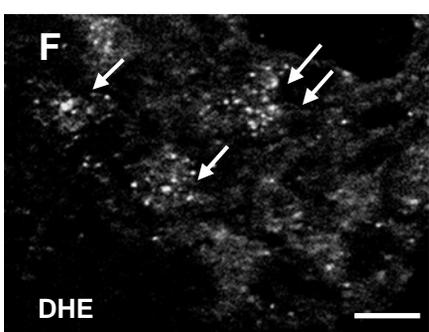
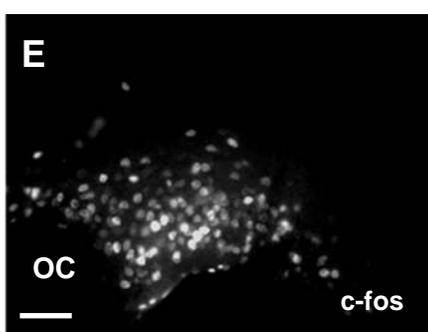
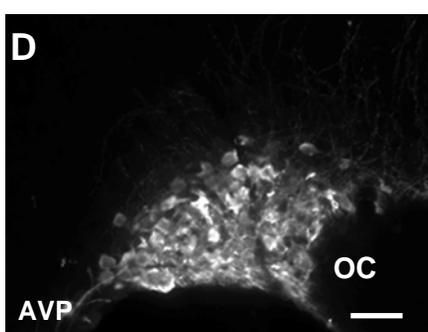
47. **Arima H, Baler R, Aguilera G** 2010 Fos proteins are not prerequisite for osmotic induction of vasopressin transcription in supraoptic nucleus of rats. *Neurosci Lett* 486: 5-9.
48. **Leloup C, Casteilla L, Carrière A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Pénicaud L** 2011 Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519-530.
49. **Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L** 2009 Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 391-398.
50. **Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W** 2009 Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 24: 3012-3020.

Figure 1

Control



2 % NaCl 2 days



2 % NaCl 8 days

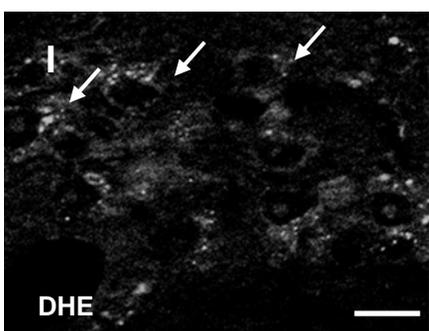
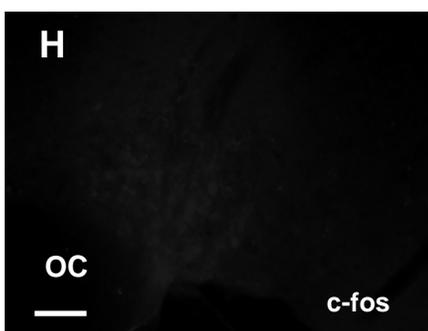
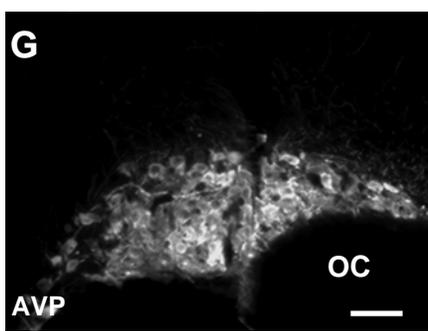


Figure 2

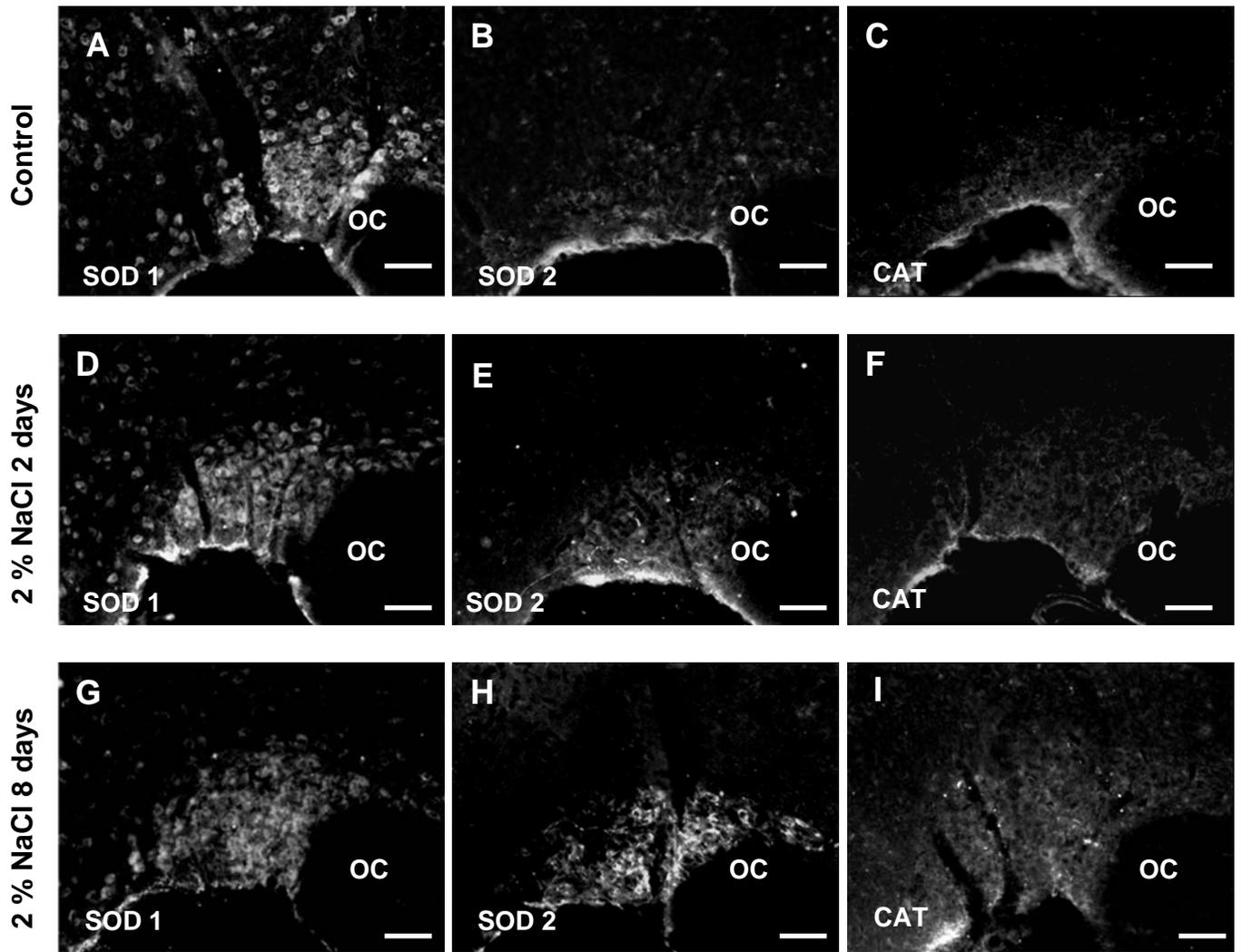
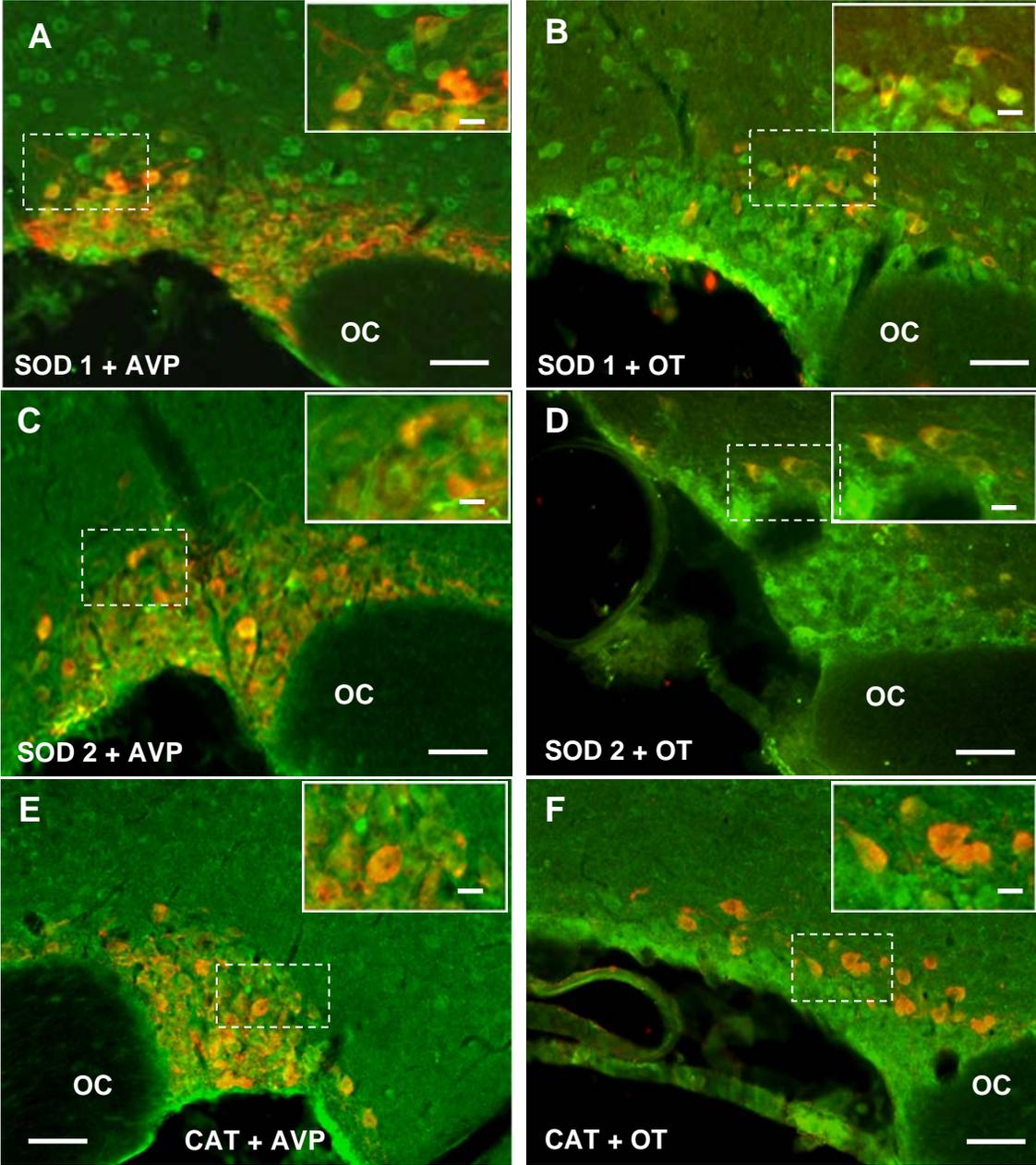


Figure 3



# Figure 4

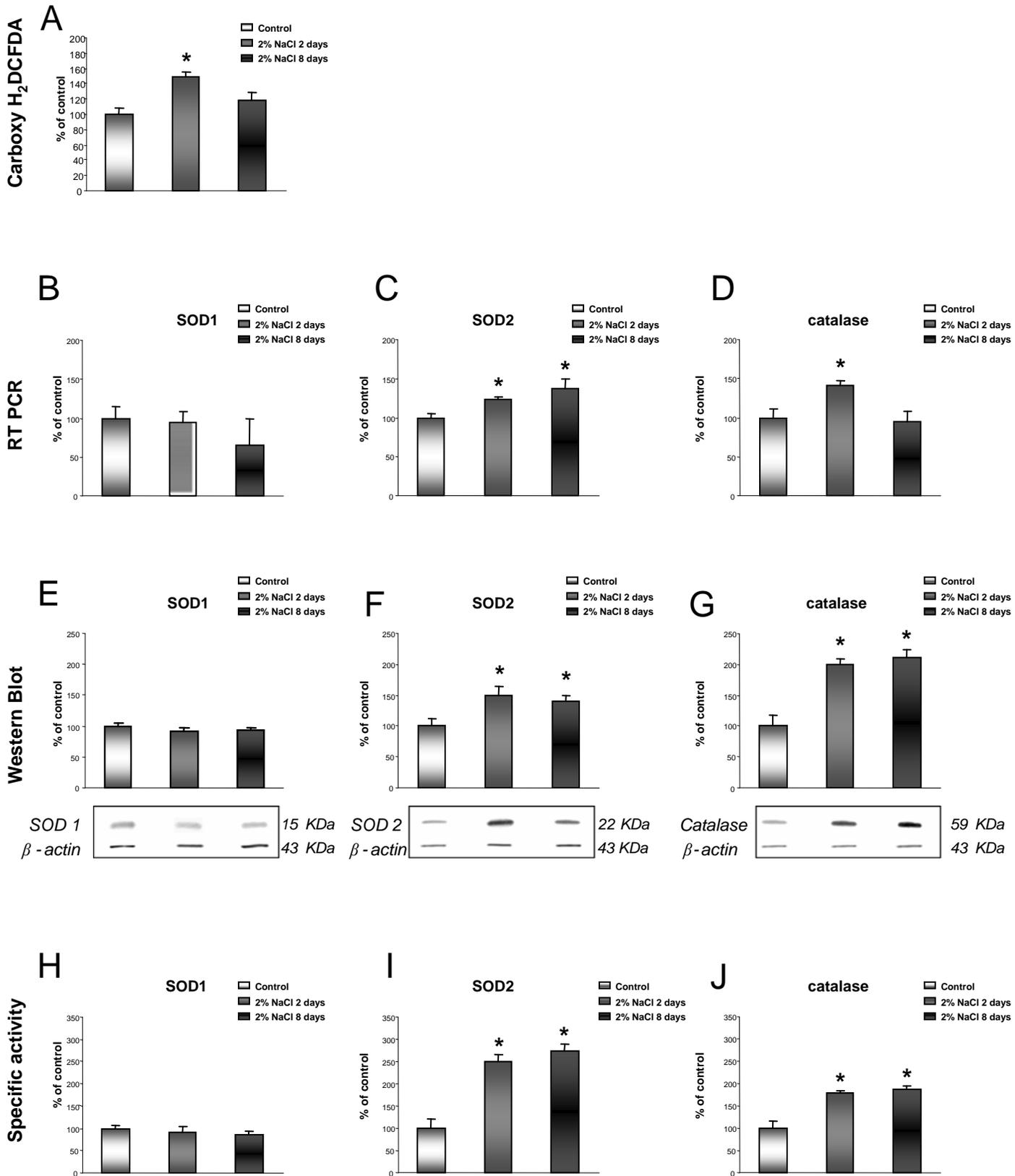


Figure 5

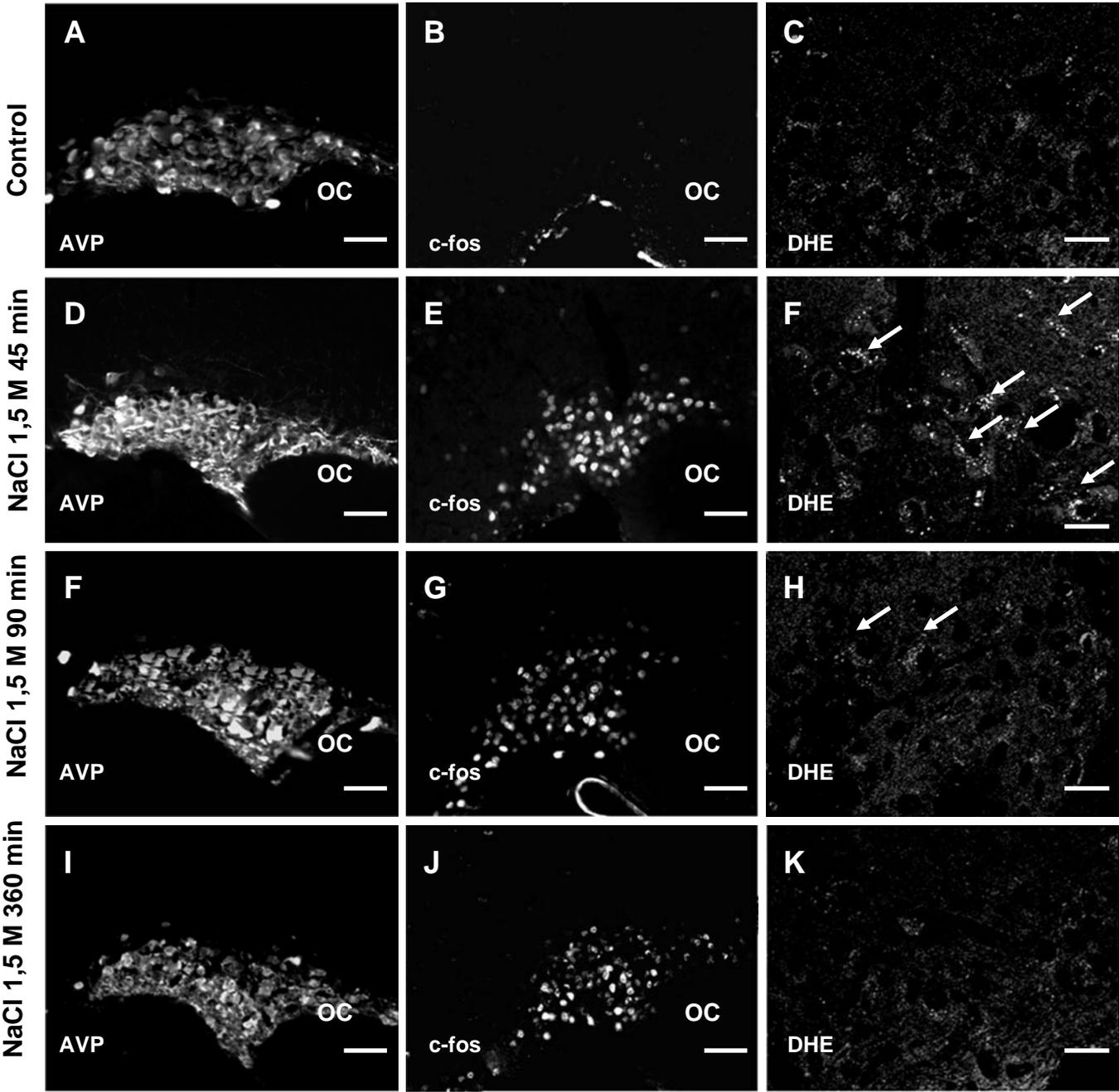


Figure 6

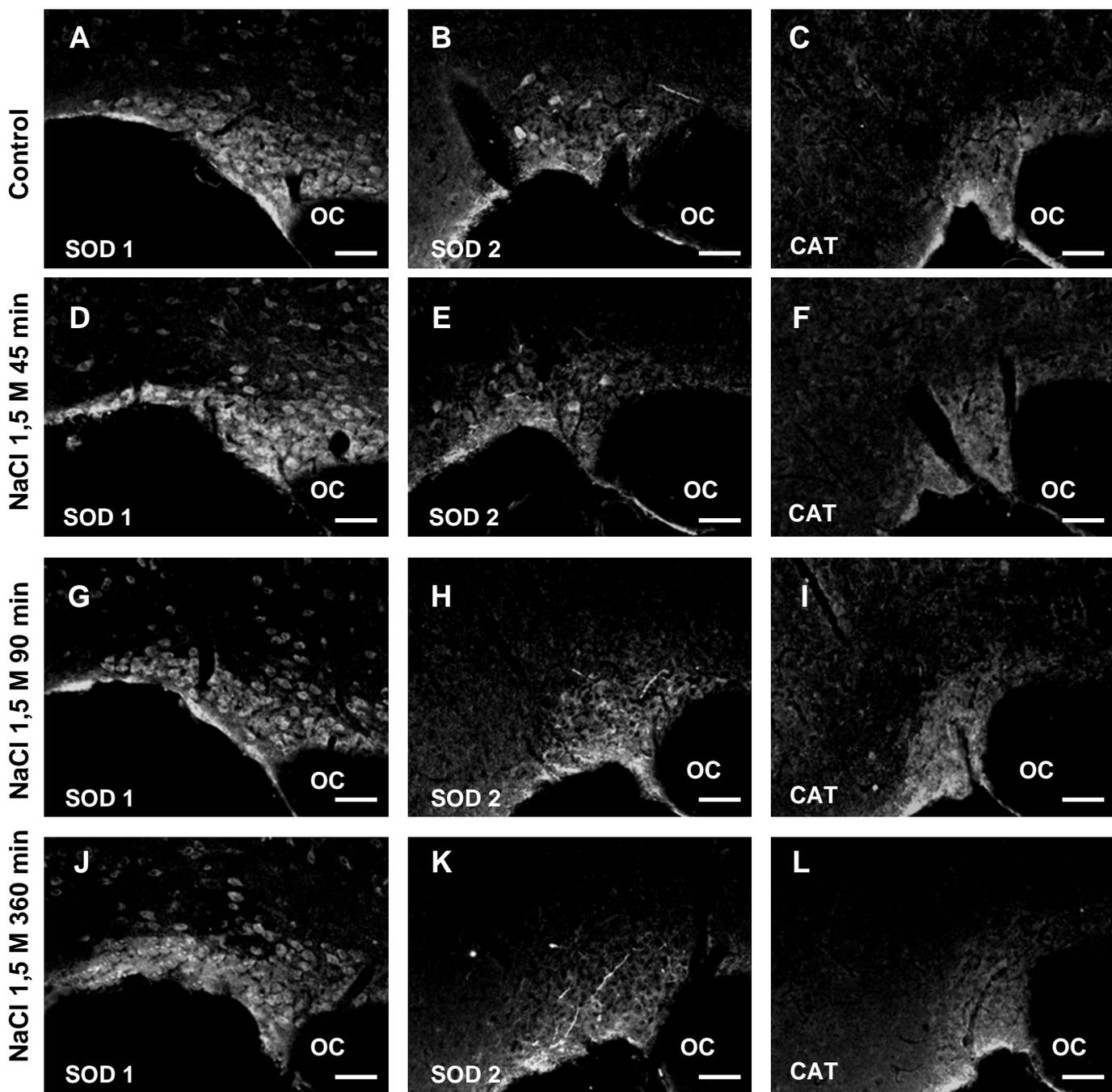


Figure 7

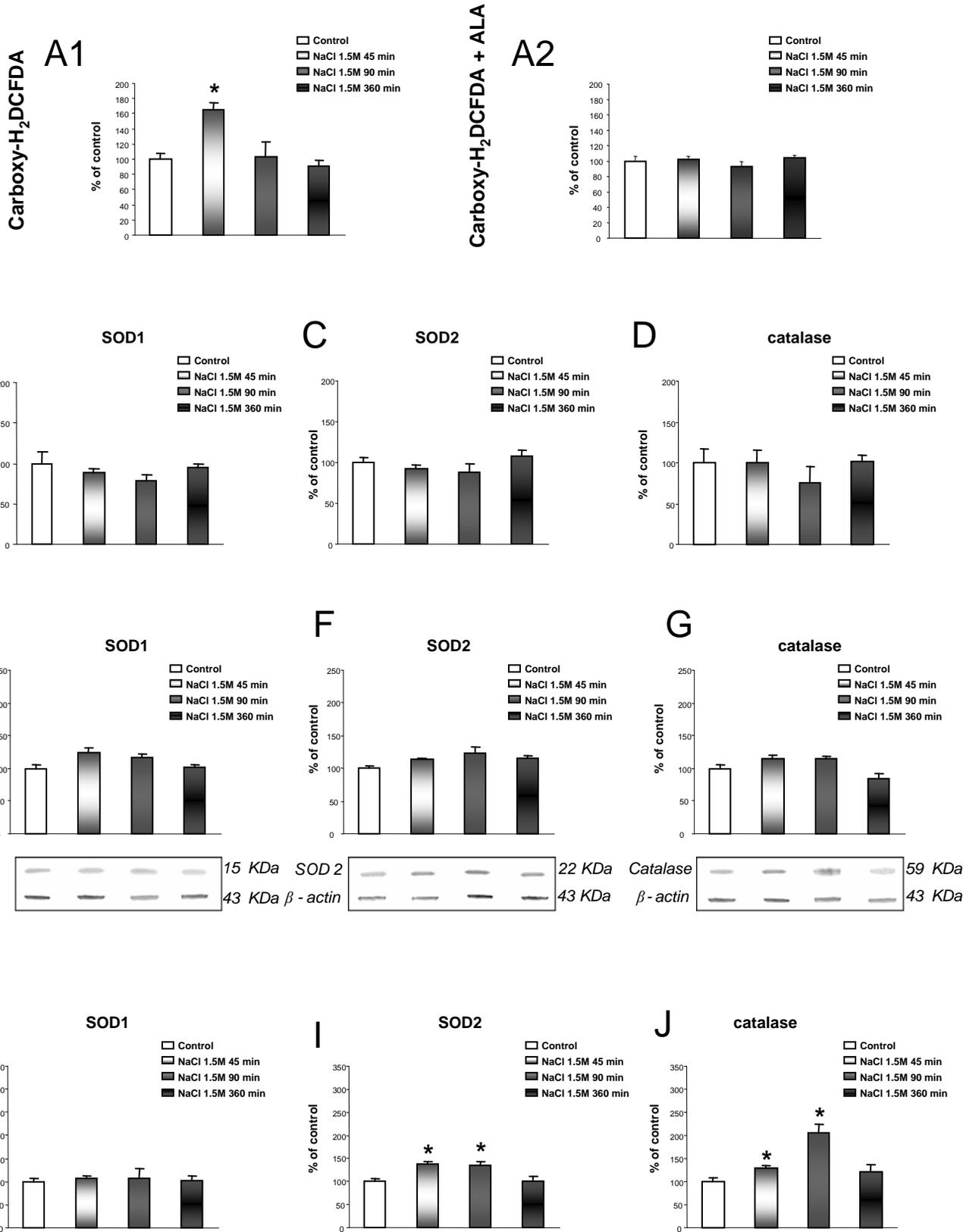
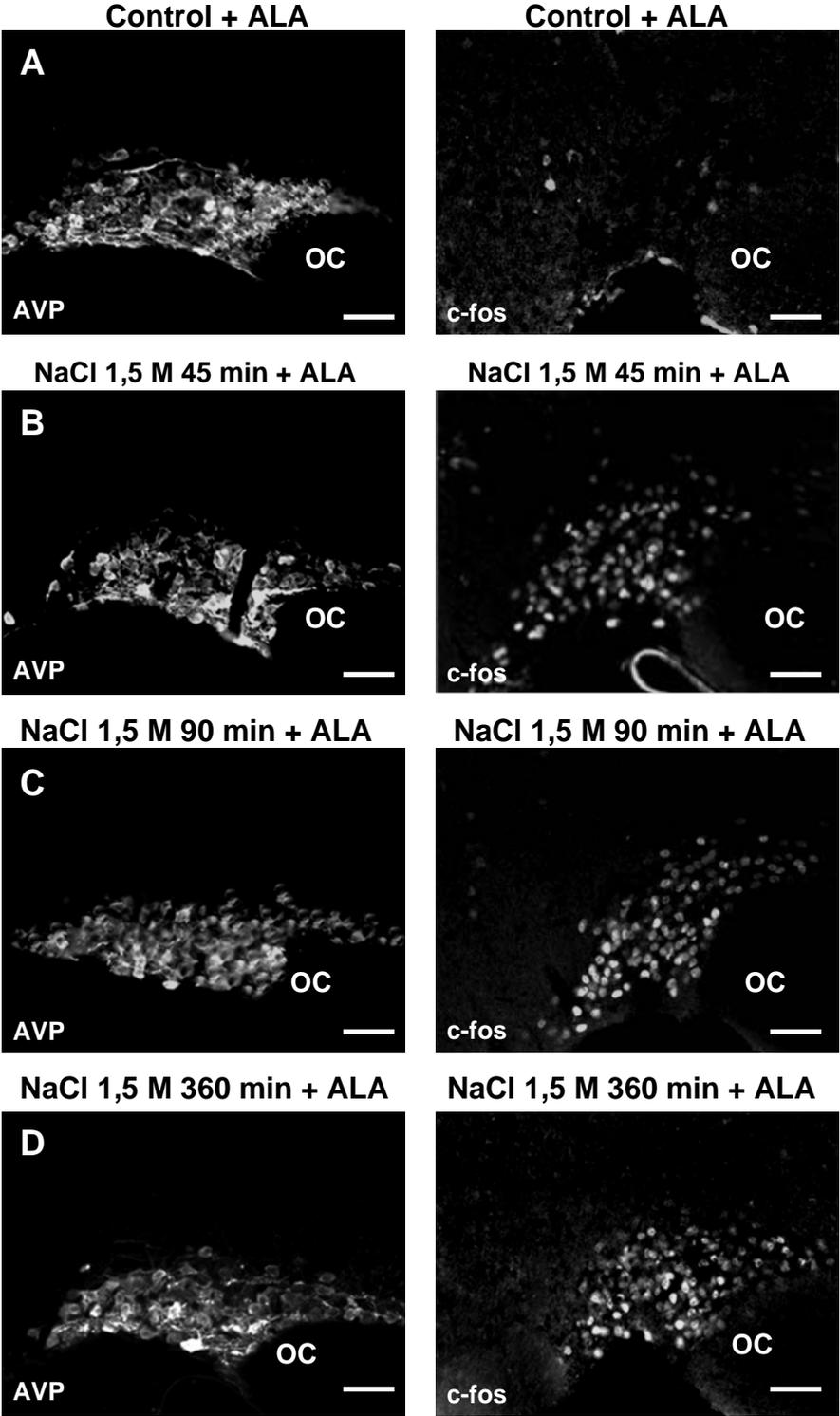


Figure 8



## **PARTIE 2 - Rôle des afférences noradrénergiques (NA) et nitrergiques (NO) dans la régulation de la production des EROs dans le noyau supraoptique (NSO)**

La 1<sup>ère</sup> partie de ma thèse a démontré que les espèces réactives de l'oxygène (EROs), produits du métabolisme de l'oxygène, joue un rôle de molécules « signal » dans la régulation de la réponse osmotique en contrôlant l'expression de la vasopressine (AVP). Par ailleurs, les travaux effectués au sein de notre équipe ont démontré que la noradrénaline (NA) stimule l'expression de l'AVP, et que cette régulation passe en partie au moins par une voie nitrergique (NO) (Vacher et al, 2003; Grange-Messent et al, 2004; Maolood et al, 2007). Ainsi, la 2<sup>e</sup> partie de ma thèse cherche à déterminer la place des EROs dans le contrôle de l'axe osmorégulateur par les afférences noradrénergiques et le monoxyde d'azote (NO).

Ce travail s'appuie sur l'analyse *in vivo* des souris Tg8, utilisées dans les études précédentes de l'équipe. Ces souris sont KO pour la monoamine oxydase A (MAO-A), et présentent des taux élevés de monoamines (surtout la noradrénaline) dans le système nerveux central (Cases et al., 1995). Nous avons à nouveau tiré profit de ce modèle pour déterminer l'implication de la noradrénaline (NA) dans la modulation de synthèse et/ou de la prise en charge des EROs. L'analyse est faite par les mêmes méthodes que celles que nous avons validées dans la 1<sup>ère</sup> partie pour l'analyse de la réponse osmorégulatrice. Les résultats obtenus montrent que les souris transgéniques Tg8, ont des niveaux de production d'EROs dans le NSO plus élevés que leurs contrôles non transgéniques, les souris C3H/HeJ. Ceci suggère fortement que la voie noradrénergique stimule *in vivo* le métabolisme oxydatif. La quantification se fera par les méthodes que nous avons validées pour l'analyse de la réponse osmorégulatrice.

Afin de poursuivre l'étude de la place des EROs dans la voie de signalisation induite par la NA, nous avons analysé *ex vivo* l'effet de la NA sur des tranches d'hypothalamus maintenues en survie. Cette méthode permet de contrôler l'environnement en ions, en neurotransmetteurs ou en hormones des cellules que l'on veut étudier tout en préservant les interactions cellulaires locales (réseaux neuronaux, ou interactions neurones-glie par exemple). Ce modèle nous permet ainsi de disséquer plus avant les mécanismes de régulation de la production et de la prise en charge des radicaux libres dans le NSO, grâce à la combinaison de différents traitements pharmacologiques. Les tranches d'hypothalamus de 400  $\mu$ m d'épaisseur et contenant les NSO sont posées sur un support puis périfusées avec du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCA), maintenues en survie pendant quelques heures. Ces tranches sont

ensuite traitées avec des agents pharmacologiques agissant sur la transmission noradrénergique ou nitrergique. Puis nous avons utilisé les mêmes protocoles expérimentaux que pour l'article 1 pour évaluer la production d'EROs et le niveau de l'AVP.

Les résultats sont présentés dans l'article 2 qui est actuellement en cours de rédaction.

Manuscrit en cours de rédaction

**Reactive oxygen species act as signaling mediators in the noradrenergic control of AVP expression**

**Ronald St-Louis, Caroline Parmentier, Danièle Raison, Valérie Grange-Messent and Hélène Hardin-Pouzet**

## **Introduction**

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ont le plus souvent été décrites comme des molécules impliquées dans des processus pathologiques tels que les cancers et les maladies neurodégénératives (Halliwell, 1994). Des études récentes ont suggéré que les EROs agissent comme des molécules de signalisation dans l'environnement cellulaire normal. En effet, ils sont capables d'induire des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des fonctions cellulaires dans des conditions physiologiques (Abate et al., 1990; Dalton et al., 1999; Morel et Barouki, 1999). Par exemple, nos travaux antérieurs ont démontré que lorsque l'axe osmotique est activé, la production de EROs dans le complexe hypothalamo-neurohypophysaire est nécessaire pour la régulation de l'expression de l'arginine-vasopressine (AVP) dans le noyau supraoptique (NSO) de l'hypothalamus.

L'hypothalamus, et en particulier le NSO, est richement innervé par les afférences noradrénergiques chez le rat et chez la souris. De ce fait, la NA constitue un modulateur important des différentes régulations homéostatiques. La NA, produite principalement au niveau du locus coeruleus, participe à de nombreuses fonctions dans le système nerveux central, y compris la cognition, la motivation, et la mémoire (Foote et al., 1983). Notamment, la NA est fortement impliquée dans le contrôle de l'osmorégulation (Vacher et al., 2002) en exerçant une importante modulation sur les neurones magnocellulaires vasopressinergiques, et en particulier sur la synthèse et la libération de l'AVP (Willoughby et al., 1987; Bealer et Crowley 1998; Vacher et al., 2002 ).

Cependant, le mécanisme exact du contrôle de l'expression de l'AVP par la NA n'est pas encore complètement élucidé. Des études ont démontré que l'effet de la NA passe en partie par le biais des neurones glutamatergiques et l'activation des récepteurs NMDA présents sur les neurones vasopressinergiques (Al-Ghoul et al., 1997; Armstrong et al., 1997; Gribkoff, 1991; Meeker et al., 1994; Daftary et al., 1998; Hattori et al., 1998; Boudaba et Tasker, 2003; Di et Tasker, 2004). De plus, notre équipe a démontré l'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la régulation noradrénergique de l'AVP (Vacher et al, 2003;. Grange-Messent et al, 2004;. Maolood et al, 2007). Dans la mesure où la stimulation des récepteurs NMDA et la production de NO conduisent à la stimulation du métabolisme oxydatif et la génération d'EROs (Zhao et al., 2004; Kishida et al., 2005), cette étude vise à déterminer le rôle des EROs dans les voies noradrénergiques et nitrergiques impliquée dans la régulation de l'expression de l'AVP dans le NSO.

Pour cette étude, nous avons d'abord utilisé le modèle de souris transgénique Tg8, provenant de la souche C3H/HeJ, dont le gène codant pour la MAO-A est inactivé, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de noradrénaline et de sérotonine dans le cerveau (Cases et al., 1995).

Afin de décrypter plus précisément les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués, nous avons ensuite utilisé un modèle *ex vivo*, basé sur des tranches de l'hypothalamus de souris mâles C3H/HeJ traitées par une combinaison d'agents pharmacologiques permettant de discriminer la part du NO et de la NA dans la production de EROs.

## MATERIEL ET METHODES

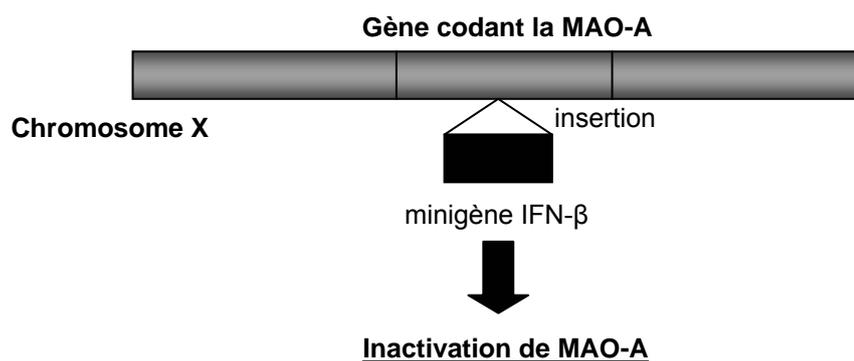
### Méthode *in vivo* : Analyse des souris Tg8

#### Animaux

Des souris mâles C3H/HeJ et Tg8 âgées de six semaines ont été utilisées, avec accès à l'eau et à la nourriture à volonté. Ces souris ont été entretenues dans des conditions contrôlées (cycle lumière-obscurité 12h:12h, température de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Les procédures impliquant les animaux et leur prise en charge ont été effectuées dans le respect de la loi française et de la directive européenne (Décret 87-848, 86/609/ECC).

La lignée Tg8 a été obtenue à partir de la souche C3H/HeJ (Cases et al., 1995). Elle est issue de l'insertion d'un minigène codant pour l'interféron  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) dans le gène de la MAO-A (Monoamine Oxidase A), située sur le chromosome X (**Fig. 20**).

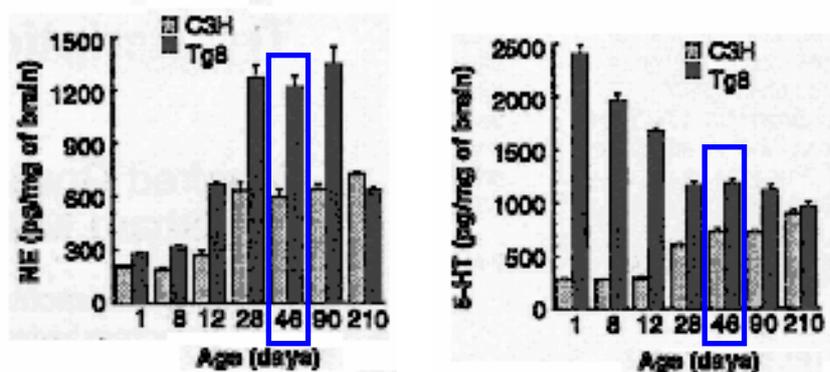
#### Figure 20: Description du modèle Tg8



Le minigène ne s'exprime pas mais la séquence codante de la MAO-A est interrompue conduisant à l'inactivation de cette enzyme. La MAO-A est la principale voie de dégradation des monoamines neuroactives. Il en résulte chez les Tg8, une augmentation des taux cérébraux de noradrénaline et de sérotonine (**Fig. 21**). Nos études se sont placées à 6 semaines, à un moment où le niveau de NA est 2 fois supérieur à la normale (la 5-HT est augmentée de x1,7)

**Figure 21: Taux cérébraux de noradrénaline (NA) et de sérotonine (5-HT) chez les souris C3H et Tg8 (d'après Cases et al., 1995)**

Comparaison entre les quantités de sérotonine (5-HT) et de noradrénaline (NA) dans le cerveau des Tg8 et des C3H. Les résultats montrent une augmentation des deux monoamines chez les Tg8 par rapport aux souris non transgéniques C3H. La quantité de 5-HT atteint un pic maximal chez les Tg8 très tôt post-natal (1 jour post-natal), pour ensuite décroître avec l'âge. Alors que la quantité de NA est maximale chez les Tg8 âgées à partir de 4 semaines jusqu'à 13 semaines post-natal.



Traitements pharmacologiques

Afin de démontrer l'importance du niveau de NA dans les régulations observées, l' $\alpha$ -MPT ( $\alpha$ -méthyl-paratyrosine) (300 mg / kg dans 150  $\mu$ l d'une solution injectable de NaCl ; Sigma, St. Louis, MO), un inhibiteur de la synthèse de la NA a été injecté par voie intrapéritonéale une fois par jour à 11:00 h pendant trois jours consécutifs à des souris à Tg8 (n =12). Les souris contrôles C3H et Tg8 ont été injectées avec un volume similaire de solution saline isoosmotique (150  $\mu$ l d'une solution injectable de NaCl). Tous les animaux ont été sacrifiés 4h après la dernière injection.

Quantification de la production d'EROs

En utilisant des souris mâles Tg8 et comme contrôle des souris C3H, nous avons évalué les niveaux intracellulaires de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec la sonde redox fluorescente carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA selon le protocole décrit par Jaillard (Jaillard et al., 2009). Les NSO ont été disséqués et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les tissus ont été homogénéisés dans 50  $\mu$ l de tampon de EROs (150 mM de KCl, 20 mM Tris, EDTA 0,5 mM, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glucose et 0,5 mM d'acide octanoïque, pH 7,4). Les homogénats ont été exposés pendant 30 min (37 ° C, agitation) à 16  $\mu$ M de carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA et la réaction a été arrêtée avec 70% d'éthanol et 0,1 M de HCl (v/v). Après centrifugation (3000 g, 15 min, 4° C), les surnageants ont été neutralisés avec 35  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 1 M et centrifugé (6000 g, 15 min, 4 ° C). Le niveau de EROs a été évalué en mesurant l'intensité de fluorescence avec un

spectrofluorimètre (Varian Cary Eclipse, d'excitation: 485 nm, émission: 535 nm). L'intensité de la fluorescence a été exprimée en concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (nmol/μg of protein).

#### Immunomarquage des enzymes anti-oxydantes

Les souris ont été anesthésiées avec du pentobarbital (25 mg/kg) et perfusées par le ventricule gauche avec une solution saline (NaCl 0,9%) suivi par du paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M. Les cerveaux ont été prélevés, postfixés (2h), cryoprotégés et sectionnés transversalement (20 μm). Les sections contenant les NSO ont été bloquées avec du tampon PBS 0,05 M de pH 7,4, contenant de l'albumine sérique bovine 1% (BSA; Sigma, USA), et du Triton X-100 0,2% pendant 1 h, puis incubées pendant la nuit avec des anticorps de lapin dirigés contre la Cu/Zn-superoxyde dismutase (SOD1, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), Mn-superoxyde dismutase (SOD2, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), la catalase (1:1000; Rockland), AVP (1:2000, Alonso et al., 1988) dilué dans du tampon PBS/BSA/Triton. Les sections ont ensuite été incubées pendant 2 h avec un anticorps biotinylé anti-IgG de lapin (1:250; Vector Laboratories, USA) et puis 2h avec la streptavidine conjuguée à l'Alexa 488 (1:400; Invitrogen, France). Les lames ont été montées avec du Mowiol et visualisées sous un microscope à fluorescence Zeiss.

#### Méthode *ex vivo* : Analyse de tranches d'hypothalamus

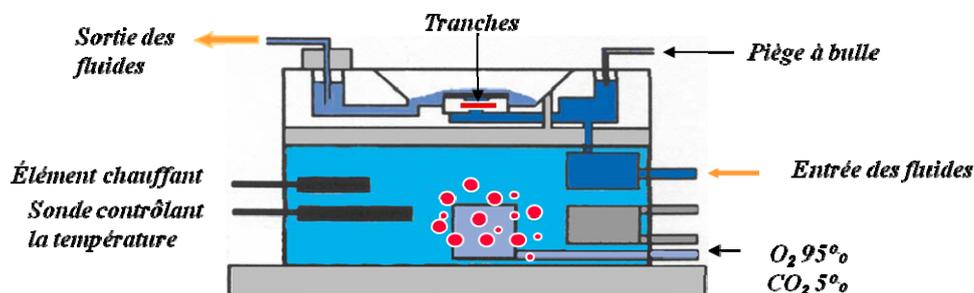
##### Préparation des tranches hypothalamiques

Des souris C3H/HeJ mâles âgées de 6 semaines ont été utilisées pour l'expérience. Après une injection intrapéritonéale de pentobarbital (25 mg/kg), les cerveaux des souris C3H ont été prélevés. Des tranches coronales d'hypothalamus de 400μm d'épaisseur contenant les NSO sont coupées à l'aide d'un vibroslice, puis déposées dans la chambre d'incubation pendant 1h dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCA : NaCl 117 mM; KCl 4,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,5 mM; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,2 mM; glucose, 10 mM). Ces tranches sont ensuite incubées en présence de plusieurs agents pharmacologiques.

Cette méthode permet de contrôler l'environnement en ions, en neurotransmetteurs ou en hormones des cellules étudiées tout en préservant les interactions cellulaires locales (réseaux neuronaux, interactions neurones-glie). Ce procédé permet de s'affranchir de la barrière hémato-encéphalique (BHE), afin de tester directement l'effet de divers agents pharmacologiques.

**Figure 22: Schéma représentatif de la chambre d'incubation pour le maintien des tranches de cerveau en survie**

Les tranches d'hypothalamus sont déposées sur un support, où elles sont périfusées par du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCA), dans une enceinte saturée en O<sub>2</sub> à 95% et en CO<sub>2</sub> à 5%. Un élément chauffant permet d'obtenir une température comprise entre 32° et 34° C.



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

NaCl 117mM; KCl 4,7mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2mM; NaHCO<sub>3</sub> 25mM; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 2,5mM; MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O 1,2mM; glucose 10mM.

Traitements pharmacologiques

La noradrénaline (NA, 10<sup>-4</sup> M), la L-arginine méthyl ester (L-NAME 3μM, inhibiteur de NO), et le nitroprusside de sodium (SNP 0.1 mM, donneur de NO) ont été utilisés. Les tranches sont incubées selon des cinétiques de temps différents (45 min, 1h et 2h) avec la noradrénaline (NA) 10<sup>-4</sup> M (Daftary et al., 1998) (Sigma, St. Louis, MO) dissoute avec de l'acide ascorbique 0,01% dans du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCA). Les tranches correspondant aux souris contrôles sont incubées, avec du LCA contenant uniquement de l'acide ascorbique 0,01%. Pour les traitements SNP et L-NAME (± NA), le temps d'incubation est de 45 min.

Détection ex vivo de EROs

Dihydroéthidine (DHE)

La dihydroéthidine (DHE, 50 mg/ml diluée dans du diméthyl sulfoxyde-DMSO, Invitrogen, France) a été diluée à une concentration de 2 μM dans du LCA, et les tranches ont été incubées à l'obscurité. Après le traitement, des coupes coronales (20 μm d'épaisseur) ont été faites à l'aide d'un cryostat et les sections contenant les NSO ont été sélectionnées.

À la fin des traitements pharmacologiques, les tranches ont été fixées par du paraformaldéhyde à 4% dans 0,1 M de tampon phosphate (pH 7,4), puis cryoprotégées dans du saccharose à 20% pendant 48 heures avant d'être incluses dans du Tissue Teck OTC, puis congelées à -30° C. Des coupes coronales (20 μm d'épaisseur) ont été faites à l'aide d'un

cryostat et les sections contenant les NSO ont été sélectionnées, puis visualisées au microscope à fluorescence Zeiss.

#### Blocage de la voie des EROs : Acide alpha lipoïque (AAL)

Les tranches hypothalamiques ont été pré-traitées avec de l'acide alpha-lipoïque (AAL) (Sigma, USA) pendant 45 minutes. Les tranches sont réparties en groupe contrôle (0,01% d'acide ascorbique-LCA) et en groupes expérimentaux (0,01% d'acide ascorbique-LCA + NA; 0,01% acide ascorbique + NA + AAL; 0,01% acide ascorbique-LCA + AAL). A la fin des traitements pharmacologiques, les tranches sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), puis cryoprotégées par du saccharose 20% pendant 48 heures avant Teck avant d'être incluses dans du Tissue Teck OTC et congelées  $-30^{\circ}$  C. Des coupes coronales (20  $\mu$ m d'épaisseur) ont été faites à l'aide d'un cryostat et les sections contenant les NSO ont été sélectionnés, nous avons procédé à l'immunomarquage de l'AVP.

#### Immunomarquage de l'AVP

Les tranches d'hypothalamus de 400  $\mu$ m sont cryoprotégées, incluses dans du Tissue Teck OTC et congelées à  $-30^{\circ}$  C. Ensuite, des coupes de 20  $\mu$ m sont effectuées au cryostat. Les coupes sont incubées pendant 1h avec du tampon PBS 0.05 M pH 7.4, contenant du BSA 1% (Sigma, USA) et du Triton X-100 0.2%, puis incubées toute la nuit avec un anticorps anti-AVP monoclonal (1 :5 000; Robert et al., 1985).

Les lames sont incubées pendant 2h avec un anticorps secondaire IgG anti-mouse couplé au fluorochrome Alexa 594 (1 :400; Invitrogen, France). La fluorescence a été observée au microscope Zeiss.

#### Analyse statistique

Les données ont été exprimées en pourcentages de la moyenne par rapport au contrôle  $\pm$  l'écart-type (Standard Error of the Mean : SEM). Les moyennes sont comparées en utilisant la méthode ANOVA suivie d'un test de Scheffe et les différences sont considérées comme significativement différentes à  $p < 0.05^*$ .

## **Résultats**

### Analyse *in vivo*

#### Les souris Tg8 ont des niveaux d'expression d'AVP plus élevés que les contrôles C3H *in vivo*

Afin de confirmer les résultats décrits dans la littérature (Vacher et al., 2002), nous avons procédé au marquage immunohistochimique de l'AVP, chez les souris Tg8 traitées par injection intrapéritonéale de  $\alpha$ -MPT, alors que des souris C3H et Tg8 servant de contrôle ont été injectées avec une solution physiologique NaCl 0,9%.

Chez les souris C3H, le marquage AVP est distribué dans la partie ventrale du NSO, dans les neurones magnocellulaires. Chez les souris Tg8, le niveau d'expression de l'AVP est augmenté, à la fois en nombre de neurones marqués et en intensité de marquage pour chaque neurone positif. Le traitement par l' $\alpha$ -MPT des souris Tg8 diminue l'intensité de l'immunomarquage, le ramenant au niveau des souris C3H, voire en dessous.

#### Les souris Tg8 ont des niveaux de production d'EROs plus élevés que ceux des C3H *in vivo*

Les mesures de la production des EROs, en particulier le radical libre  $H_2O_2$  par le carboxy- $H_2DCFDA$ , montrent une augmentation de la production d'EROs chez les Tg8 témoins dans le NSO par rapport aux souris C3H témoins ( $100 \% \pm 12$  vs  $160 \% \pm 3^*$ ,  $P < 0.05$ ). Chez les souris Tg8 injectées avec l' $\alpha$ -MPT, la production d'EROs diminue significativement par rapport aux souris Tg8 témoins ( $60\% \pm 10^{\#}$  vs  $160 \% \pm 3$ ,  $P < 0.05^*$ ) et par rapport aux souris C3H ( $60 \% \pm 10^*$  vs  $100\% \pm 12$ ,  $p < 0.05^*$ ).

#### Les souris Tg8 ont des niveaux d'expression des enzymes anti-oxydants plus élevés que les contrôles C3H *in vivo*

Comme décrit dans l'article 1, au niveau du NSO, les enzymes anti-oxydants sont exprimés dans les neurones magnocellulaires. La SOD1 cytoplasmique est exprimée de façon constitutive dans les cellules. Son niveau d'expression est augmenté dans le NSO chez les Tg8 par rapport aux C3H. Après administration de l' $\alpha$ -MPT, il y a une nette diminution de l'immunomarquage SOD1.

La SOD 2, localisée au niveau mitochondrial, présente un marquage ponctiforme. Les Tg8 contrôles ont un niveau d'expression de la SOD2 plus élevé que les souris C3H. On observe une diminution de l'expression de la SOD2 chez les Tg8 après traitement à l' $\alpha$ -MPT.

La catalase, enzyme ubiquitaire retrouvée surtout au niveau des peroxysomes et prenant le relais de la SOD dans le métabolisme oxydatif, a son niveau d'expression augmenté chez les Tg8 contrôles par rapport aux C3H contrôles. Après traitement à l' $\alpha$ -MPT, le niveau d'expression de la catalase baisse dans le NSO des souris Tg8, par rapport aux Tg8 témoins.

#### Analyse *ex vivo*

##### Effet de la NA sur l'expression de l'AVP et la production d'EROs

L'immunomarquage de l'AVP en absence de NA montre un niveau stable tout au cours du temps d'incubation des tranches de 45 min à 2h. L'ajout de NA dans le milieu stimule la synthèse d'AVP dès 45 min. Cette augmentation est maintenue après 1h et 2h d'incubation avec la NA.

Le marquage par la dihydroéthidine est modulé comme celui de l'AVP, à savoir une augmentation du marquage redox en présence de NA, comparativement au témoin dès 45 min et maintenu ensuite.

Pour la suite des expériences, nous nous sommes placés à 45 min d'incubation.

##### Effet de l'acide $\alpha$ -lipoïque (AAL) *ex vivo* sur la NA

Après équilibration des tranches d'hypothalamus, l'AAL est ajouté dans le milieu pendant 45 min puis les tranches sont incubées 45 minutes en présence ou en absence de NA. L'AAL seul ne modifie pas l'intensité du marquage pour l'AVP. En revanche, le pré-traitement par l'AAL bloque l'augmentation d'AVP induite par la NA.

##### Implication du monoxyde d'azote (NO) *ex vivo* sur la production d'EROs

La présence de SNP pendant 45 minutes (donneur de NO) dans le milieu augmente le niveau d'expression d'AVP comparativement au témoin. L'application de L-NAME seul, un inhibiteur de la NOS, ne modifie pas l'expression de l'AVP dans le NSO. Le fait d'ajouter du L-NAME dans le milieu contenant la NA supprime l'effet stimulateur de la NA sur le niveau de l'AVP.

La dihydroéthidine (DHE) est un marqueur redox qui s'oxyde en présence du radical anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ . Le traitement avec le SNP montre une augmentation de l'intensité du marquage redox par rapport au témoin. L'incubation avec le L-NAME seul ne modifie pas le niveau de production d'EROs. En ajoutant du L-NAME dans le milieu contenant de la NA, il n'y a pas de changement du niveau de production d'EROs.

## **Discussion**

Dans cette étude, nous avons utilisé d'abord comme modèle animal des souris transgéniques Tg8, KO pour la MAO-A, enzyme impliquée dans le catabolisme des catécholamines. Ces souris ont des taux élevés de noradrénaline (NA) et de sérotonine (5-HT) dans le SNC et plus particulièrement dans le NSO (Cases et al., 1995; Vacher et al., 2002). Elles présentent également une augmentation du niveau d'AVP dans le NSO (Vacher et al., 2002). De plus, le traitement par l' $\alpha$ -MPT, un inhibiteur de la synthèse des catécholamines, est associé à une diminution du contenu en AVP dans les NSO des souris Tg8 comparativement aux souris Tg8 non traitées (Vacher et al., 2002), confirmant le contrôle par la NA de l'expression de l'AVP. La quantification de la production d'EROs par la sonde redox fluorescente, le carboxy- $H_2DCFDA$ , montre chez les Tg8 une production accrue d'EROs par rapport aux souris C3H. Après traitement à l' $\alpha$ -MPT, la production de EROs diminue fortement, ce qui démontre que la NA stimule la production d'EROs dans le NSO.

Le fait qu'il n'y ait pas d'altération cellulaire au niveau du NSO, suggère une prise en charge des EROs par le système anti-oxydant cellulaire, afin de maintenir une homéostasie redox et ainsi éviter une toxicité cellulaire (Wilson, 1997). Parmi les systèmes de défense principaux de l'organisme, nous nous sommes focalisés sur le système anti-oxydant superoxyde dismutase/catalase considéré comme le plus important (Filipovic et al., 2009; Jung et al., 2009) et que nous savons être stimulé dans le NSO au cours de l'osmorégulation, situation qui exacerbe la production d'AVP. Chez les Tg8, les SOD1, SOD2 et catalase ont leur niveau d'expression augmenté dans le NSO en comparaison avec les C3H, ce qui est cohérent avec l'augmentation de production d'EROs observée. En traitant les Tg8 avec de l' $\alpha$ -MPT, le niveau des enzymes anti-oxydants est fortement diminué par rapport aux souris Tg8 non traitées, renforçant la démonstration du contrôle par la NA du métabolisme oxydatif dans le NSO.

Pour établir plus précisément ce contrôle noradrénergique, nous avons utilisé un modèle expérimental de tranches aigües d'hypothalamus de souris C3H incluant les NSO maintenues en survie *ex vivo* dans un milieu d'incubation contenant de la noradrénaline (Grange-Messent al., 2004). La concentration de la NA à laquelle nous avons travaillé a été déterminée à partir d'études électrophysiologiques sur des tranches de cerveau, démontrant que l'incubation avec la noradrénaline  $10^{-4}$  M induit une réponse optimale des neurones magnocellulaires (Daftary

et al., 1998). Des études au sein de notre équipe avaient établi précédemment que la noradrénaline (NA) dans ces conditions stimule l'expression de l'AVP, de l'OT, et du NO dans le NSO (Vacher et al., 2002 ; Grange-Messent et al., 2004).

L'immunomarquage de l'AVP sur les tranches d'hypothalamus selon des cinétiques de temps croissants indique qu'en présence de la NA, il y a une synthèse accrue d'AVP dans les NSO dès 45 min et que l'effet de la NA se maintient pendant 2h sans épuisement des neurones AVP. Ces résultats immunohistochimiques confirment que la NA augmente l'expression de l'AVP chez la souris (Willoughby et al., 1987 ; Bealer et Crowley 1998; Vacher et al., 2002).

Le marquage par la DHE montre que la production d'EROs dans les neurones magnocellulaires accompagne cette augmentation de l'expression de l'AVP induite par la NA. Pour démontrer la place des EROs dans la modulation de l'expression de l'AVP par la NA, de l'acide  $\alpha$ -lipoïque (AAL) a été ajouté au milieu. L'AAL est un puissant anti-oxydant qui agit comme piègeur de radicaux libres. Sur les tranches d'hypothalamus traitées à la NA, les niveaux d'expression de l'AVP sont fortement augmentés alors que l'ajout d'AAL bloque cette augmentation. Ces résultats démontrent ainsi que les EROs sont impliqués dans la voie de signalisation noradrénergique contrôlant l'expression de l'AVP.

La voie catécholaminergique est l'afférence monoaminergique principale dans le NSO. Les afférences noradrénergiques composent environ 10% de toutes les synapses des neurones magnocellulaires, mais ils sont également à proximité des interneurons du NSO (Michaloudi et al., 1997). Par conséquent, la NA peut agir directement ou indirectement sur les neurones magnocellulaires (Randle et al., 1986 ; Wang et al., 1998 ; Di et Tasker, 2004). Nous nous sommes proposés d'aller plus loin dans notre analyse en déterminant le rôle du NO sur la production des EROs, sachant que le NO est indispensable à la modulation de l'expression de l'AVP par la NA (Maolood et al., 2007).

Le NO est une molécule de signalisation importante qui régule diverses fonctions physiologiques, y compris le système neuroendocrine (Nelson et al., 1997) et la libération des neuropeptides hypothalamiques dont l'AVP (Kadowaki et al., 1994 ; Srisawat et al., 2000 ; Kadokaro, 2004). L'analyse des cibles cellulaires du NO dans le NSO de souris par Vacher et collaborateurs (2003) démontre que le NO module la libération d'AVP indirectement en modulant l'activité des afférences magnocellulaires. Pour déterminer si le NO est impliqué dans la régulation des EROs, nous avons utilisé un inhibiteur non spécifique de la NOS, la L-NAME et un donneur de NO, le SNP.

Dans une première étape, nous avons confirmé l'effet du SNP sur l'expression de l'AVP. Le traitement par le SNP induit une forte augmentation du marquage AVP, confirmant le rôle du NO dans la stimulation de l'expression de l'AVP. En présence de 3 $\mu$ M de L-NAME, l'augmentation des niveaux d'AVP induits par la NA a été supprimée confirmant que le NO est un maillon indispensable de la chaîne de régulation NA/AVP (Maalood et al., 2007).

Le marquage par la DHE montre une augmentation de l'intensité du marquage lorsqu'on ajoute du SNP au milieu, indiquant que le NO stimule le métabolisme oxydatif dans le NSO. En présence de L-NAME seul, l'intensité du marquage par la DHE est semblable au témoin et l'ajout de L-NAME dans le milieu contenant de la NA ne modifie pas l'intensité du marquage.

Ceci démontre que le NO stimule la production des EROs et qu'il est indispensable pour l'effet de la NA sur le métabolisme oxydatif. Pour confirmer ce rôle, des dosages quantitatifs par le carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA sont actuellement en cours.

Les résultats obtenus avec le modèle *ex vivo* permettent de démontrer, au moins en partie, le mécanisme contrôlant la production d'EROs dans le NSO : la noradrénaline via le NO stimule la production d'EROs qui à son tour stimule l'expression de l'AVP :

**NA  $\longrightarrow$  NO  $\longrightarrow$  EROs  $\longrightarrow$  AVP**

Les résultats obtenus *in vivo* sur la souris Tg8 confirme l'importance de la NA dans le contrôle du métabolisme oxydatif. Le traitement de ces souris par l'AAL et l'analyse de l'expression de l'AVP permet de confirmer l'existence de cette voie de régulation.

## LEGENDE DES FIGURES

### **Figure 1. Effet de l' $\alpha$ -MPT sur l'expression de l'AVP chez les souris Tg8**

Immunomarquage de l'AVP (fluorescence rouge) dans le noyau supraoptique (NSO) chez des souris C3H/HeJ contrôles (A), chez des souris Tg8 contrôles (B), et chez des Tg8 traitées par injection intrapéritonéale d' $\alpha$ -MPT (C). L'expression de l'AVP augmente chez les souris Tg8 contrôles (B) par rapport aux C3H témoins (A). Chez les Tg8 traitées à l' $\alpha$ -MPT, il y a une diminution du niveau d'AVP dans le NSO

CO: chiasma optique, échelle =50  $\mu$ m.

### **Figure 2. Mesure quantitative de la production d'EROs par une sonde redox fluorescente, le carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA**

La production d'EROs est déterminée par le carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA à partir d'homogénats contenant les NSO. L'intensité de la fluorescence est exprimée en concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les niveaux de production d'EROs ont été normalisés en pourcentages de la valeur du contrôle  $\pm$  erreur-type, puis comparés par un test ANOVA suivi d'un test de Scheffe. Les différences sont considérées comme statistiquement différents à  $P<0.05$ . \*significatif par rapport aux C3H, # significatif par rapport aux Tg8.

### **Figure 3. Détection des enzymes anti-oxydants SOD 1 (A, D, G), SOD2 (B, E, H) et catalase (C, F, I) chez les souris C3H (A, B, C) et Tg8 (D, E, F), et les souris Tg8 (G, H, I) traitées par l' $\alpha$ -MPT**

Les enzymes anti-oxydants fluorescent en vert au niveau du NSO

CO: chiasma optique, échelle =50  $\mu$ m.

### **Figure 4. Cinétique de détection de l'AVP et de la production d'EROs sur des tranches d'hypothalamus maintenues en survie.**

L'AVP qui fluoresce en rouge, est immunomarquée au niveau du NSO sur des tranches témoins (A, C, E) et des tranches auxquelles la NA ( $10^{-4}$  M) a été ajoutée (B, D, F). Les tranches sont incubées pendant 45 min, 1h ou 2h.

CO: chiasma optique, échelle = 50  $\mu$ m.

Détection *in situ* de la production d'EROs par la dihydroéthidine (DHE) chez les souris C3H contrôles (G, I, K) ou après ajout de NA ( $10^{-4}$  M) dans le milieu d'incubation (H, J, L). Les détections sont effectuées 45 min, 1h ou 2h après le début du traitement.

CO: chiasma optique, échelle = 20  $\mu$ m.

**Figure 5. Effet *ex vivo* de l'acide  $\alpha$ -lipoïque (AAL) sur la NA**

L'AVP est immunomarquée (fluorescence rouge) sur des tranches témoins+AAL (A), sur des tranches incubées en présence de NA ( $10^{-4}$  M) (B) et de NA ( $10^{-4}$  M) + AAL (C). L'AAL est ajouté directement dans le milieu d'incubation pendant 45 min.

CO: chiasma optique, échelle = 50  $\mu$ m.

**Figure 6. Effet du monoxyde d'azote (NO) sur l'expression de l'AVP et sur la production d'EROs**

L'AVP est immunomarquée et fluoresce en vert, au niveau du NSO chez les souris C3H contrôles (A) ou après ajout de SNP (C), de L-NAME (E), de L-NAME+NA (G) dans le milieu d'incubation pendant 45 min.

CO: chiasma optique, échelle = 50  $\mu$ m.

Détection *in situ* de la production d'EROs par la dihydroéthidine (DHE) chez les souris C3H contrôles (B) ou après ajout de SNP (D), de L-NAME (F), de L-NAME+NA (H) dans le milieu d'incubation pendant 45 min.

CO: chiasma optique, échelle = 20  $\mu$ m.

Figure 1

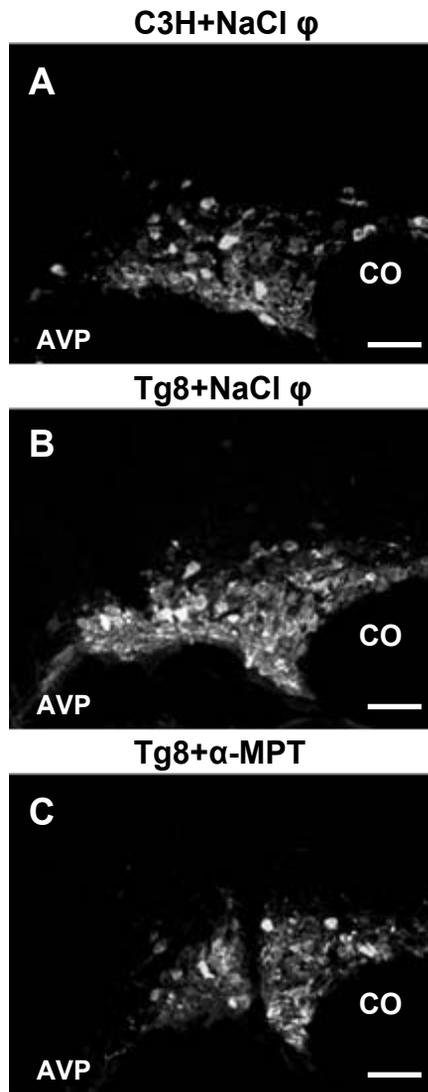


Figure 2

Carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA

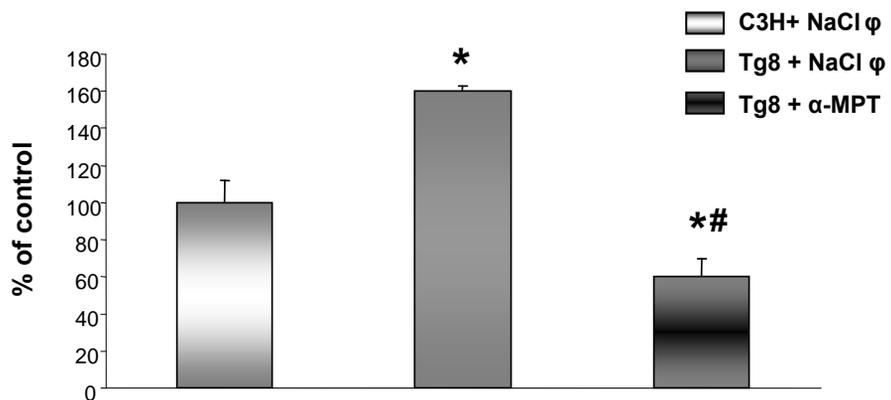


Figure 3

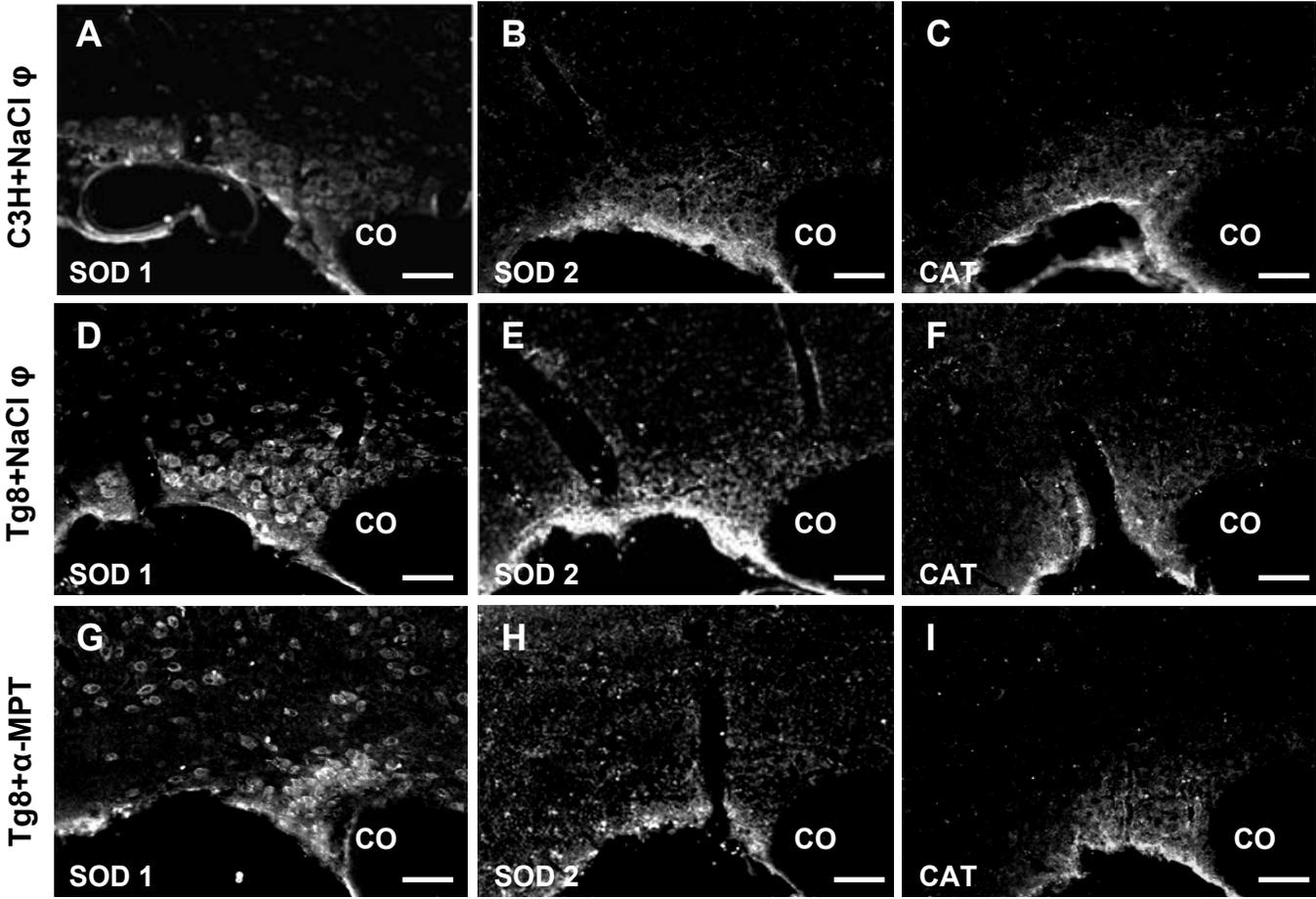


Figure 4

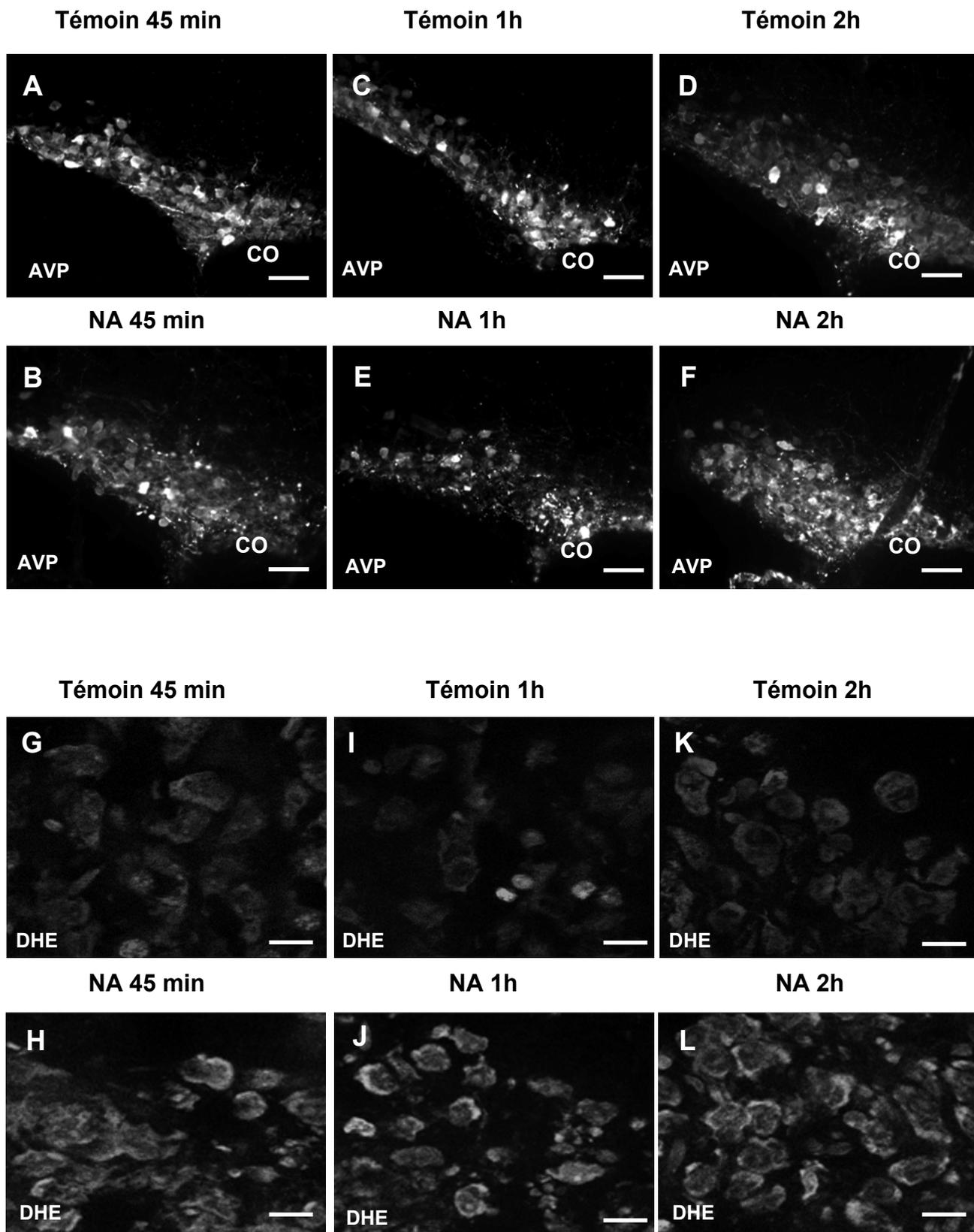
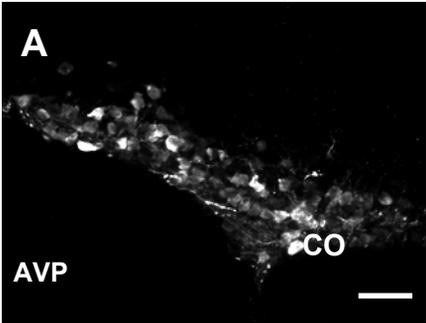
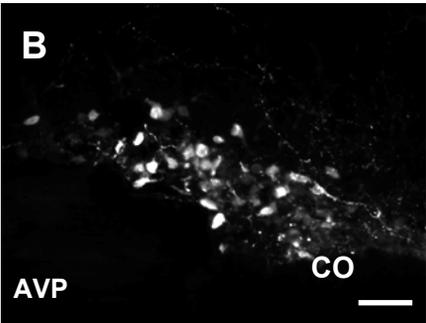


Figure 5

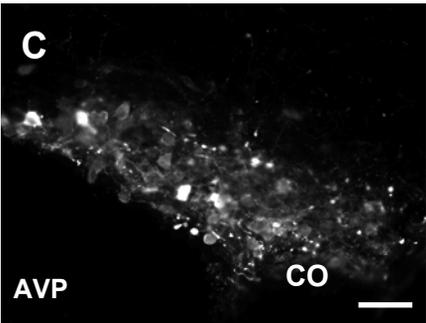
Témoin sans AAL



Témoin + AAL



NA



NA + AAL

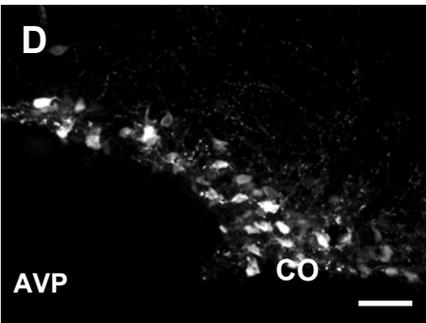
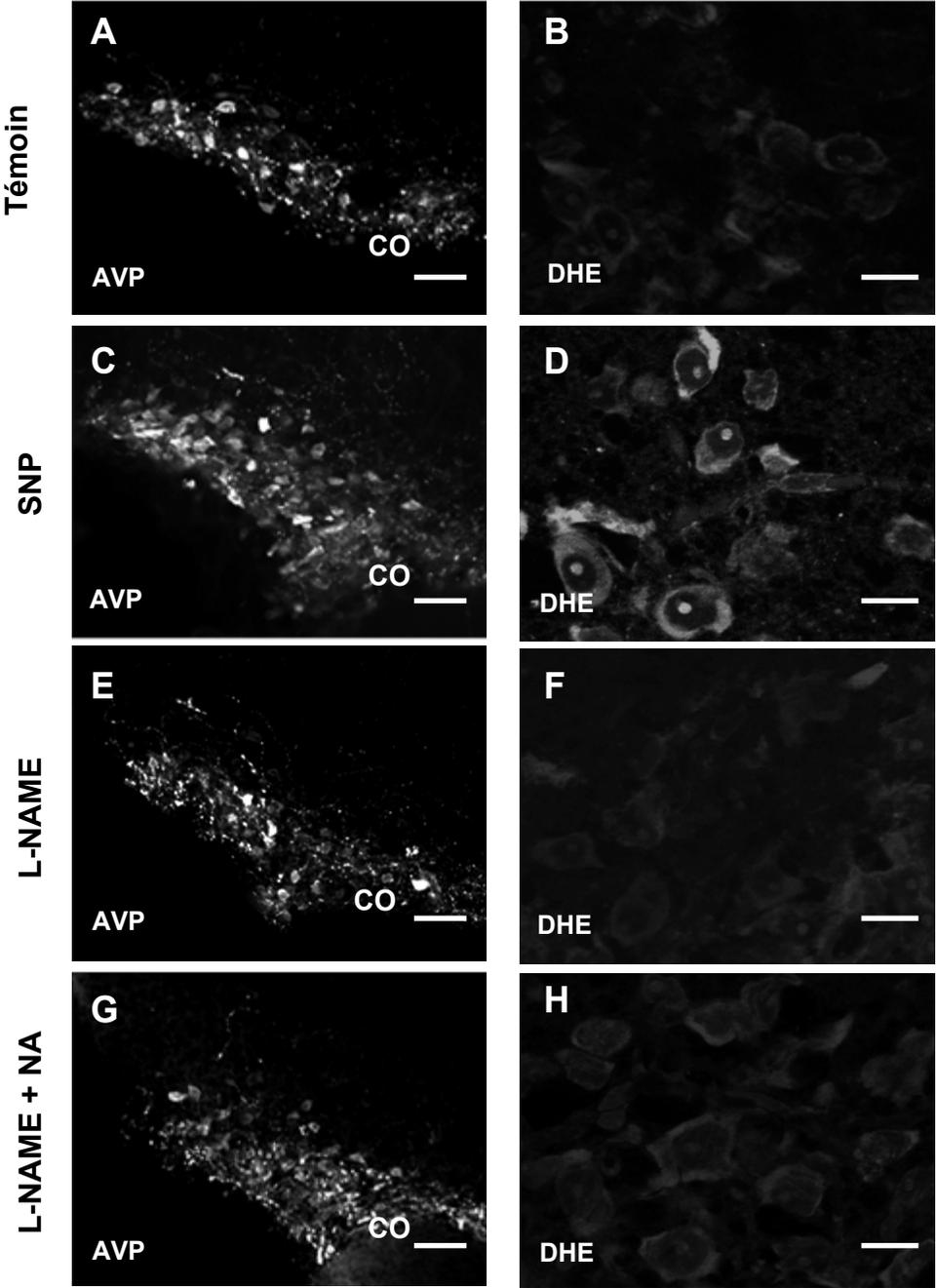


Figure 6



## *Discussion générale*

## **Discussion générale**

Le propos de notre travail était de documenter le concept émergent des radicaux libres en tant que molécules de signalisation physiologiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à leur production au cours d'une réponse physiologique, l'osmorégulation, qui met notamment en jeu la voie vasopressinergique. Ce travail s'est déroulé en plusieurs étapes successives. Nous avons tout d'abord démontré que les EROs sont produits au cours de la réponse osmorégulatrice grâce à un paradigme de stimulation chronique. Nous avons ensuite analysé les phases de la mise en place de la réponse osmorégulatrice en utilisant un protocole de stimulation aiguë, qui nous a également permis de démontrer qu'en l'absence de production d'EROs, la réponse osmorégulatrice est abolie. Enfin, la deuxième partie de notre travail a recherché les mécanismes stimulant la production d'EROs dans l'hypothalamus neuroendocrine et nous nous sommes intéressés à l'implication de la noradrénaline et du monoxyde d'azote dans cette voie de régulation de l'expression de la vasopressine.

### **I. Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans la réponse osmorégulatrice au niveau du noyau supra-optique**

Dans un premier temps, les variations de l'osmolalité plasmatique dues à une stimulation hyperosmotique chronique démontrent que la réponse osmorégulatrice exercée par l'AVP se met en place progressivement pour atteindre un nouvel état d'équilibre du système qui permet de retrouver une osmolalité plasmatique normale grâce à l'augmentation de la synthèse de l'AVP. Ce nouvel état d'équilibre correspond à un état dit « allostatique », c'est-à-dire que le système ne revient pas à l'équilibre préexistant (homéostasie), mais s'adapte aux nouvelles conditions environnementales dans lequel il est placé. En effet, le concept d'allostasie a été développé pour expliquer comment divers paramètres physiologiques, lorsque perturbés par des facteurs environnementaux, sont modifiés de façon durable pour que l'organisme s'adapte à son nouvel environnement et garde ses paramètres vitaux à leur valeur de référence (McEwen et Wingfield, 2003). Dans la situation de stimulation osmotique chronique par prise de boisson d'eau salée, le maintien au cours du temps de l'augmentation de l'expression de l'AVP au niveau du NSO est un exemple d'état allostatique permettant de retrouver une osmolalité plasmatique normale bien que le stimulus perdure. Les conditions d'homéostasie seront, quant à elles, retrouvées lors de la réhydratation de l'organisme.

Dans ces conditions de stimulation osmotique maintenue, l'activité radicalaire a été analysée à l'aide d'un marqueur redox de la production de radicaux libres administré in vivo, la DHE. La courbe de production des EROs suit celle des variations de l'osmolalité plasmatique et de l'expression de l'AVP, confortant ainsi l'hypothèse d'une médiation de la réponse vasopressinergique par les radicaux libres. La production de EROs qui résulte de la stimulation osmotique ne provoque pas d'altération tissulaire au niveau du NSO. Nous avons donc voulu savoir si les neurones AVP et OT étaient capables de faire face à la production d'EROs par une mise en jeu des systèmes anti-oxydants et nous avons choisi de porter notre attention sur le système SOD/catalase, dans la mesure où il est le principal système anti-oxydant dans le système nerveux central (Halliwell et Gutteridge, 1990). Les mesures de l'expression et de l'activité de ces enzymes anti-oxydantes par qRT-PCR et par Western-Blot et par dosages enzymatiques sur des microdissections de NSO démontrent qu'après stimulation hyperosmotique, la SOD 2 et la catalase sont sollicitées pour prendre en charge les radicaux libres produits au cours de la réponse osmorégulatrice alors que la SOD1 ne présente pas de variation de son activité.

Pour mieux comprendre le rôle des EROs dans la réponse osmorégulatrice, nous avons ensuite analysé la cinétique de cette réponse. Pour cela, nous avons développé un protocole d'hyperosmolarité aiguë par injection intrapéritonéale de NaCl 9%. L'osmolalité plasmatique est augmentée 45 min après l'injection puis revient à la normale à 90 min montrant que la réponse osmorégulatrice se met en place rapidement après l'injection de NaCl et permet ainsi d'éliminer rapidement la surcharge salée de l'organisme. Les expressions de c-Fos et d'AVP sont augmentées à 45 min puis reviennent progressivement à la normale témoignant de la normalisation de l'osmolalité.

Les mesures de la production d'EROs montrent également une production précoce dès 45 min après la stimulation hyperosmolaire, attestée par le marquage redox à la DHE et la mesure de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détectée par le H<sub>2</sub>DCFDA. En revanche, à l'inverse de ce que nous avons observé lors de la stimulation osmotique chronique, les niveaux d'expression des enzymes anti-oxydantes ne varient pas et seules les activités enzymatiques de la SOD2 et de la catalase sont augmentées et ceci de façon significative 45 minutes après l'injection hyperosmolaire de NaCl.

En conclusion de cette partie, le modèle d'hyperosmolarité aiguë a permis de montrer que les EROs sont produits dès le début de la réponse osmorégulatrice. Grâce à ce modèle, nous avons ensuite pu revenir à la question de départ. Est ce que les EROs sont indispensables à la

réponse osmorégulatrice ? Pour cela, nous avons pré-traité des animaux par un anti-oxydant avant de les soumettre au protocole d'hyperosmolarité aiguë.

L'acide  $\alpha$ -lipoïque est un acide gras naturel, capable de piéger les radicaux libres et de ce fait possède un fort pouvoir anti-oxydant. Son avantage par rapport aux autres anti-oxydants est qu'il traverse la BHE et peut donc être administré en périphérie (Packer et al., 1997). Cette propriété nous a conduit à privilégier l'utilisation de ce composé car il permet de s'affranchir d'une injection intracérébroventriculaire. Celle-ci en effet engendre une réponse inflammatoire qui aurait pu masquer la production de radicaux libres liée à la réponse osmotique. Nous avons traité pendant 3 jours consécutifs des souris avec 100 mg/kg d'AAL injecté en i.p. Au dernier jour, 4h après injection d'AAL, elles ont été soumises au protocole d'hyperosmolarité aiguë pour ensuite analyser leur réponse osmotique.

Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité du traitement anti-oxydant sur la production d'EROs et effectivement leur production dans le NSO après injection de NaCl 9% i.p. est abolie. L'osmolalité plasmatique chez les souris traitées par l'AAL augmente dès 45 min mais reste élevée au moins jusqu'à 360 min, à la différence de ce que nous avons vu précédemment lors de la seule injection en i.p. de NaCl. Ceci indique que la réponse osmotique ne se met pas en place.

L'analyse de l'expression de c-Fos montre qu'il est induit dans les conditions AAL + NaCl et que son niveau reste élevé jusqu'à 360 min, alors qu'il s'atténue chez les animaux non pré-traités par l'AAL. Ces résultats démontrent donc que l'information d'hyperosmolarité est bien signalée au NSO et que l'effet de l'AAL n'empêche pas l'information d'hyperosmolarité d'arriver au NSO.

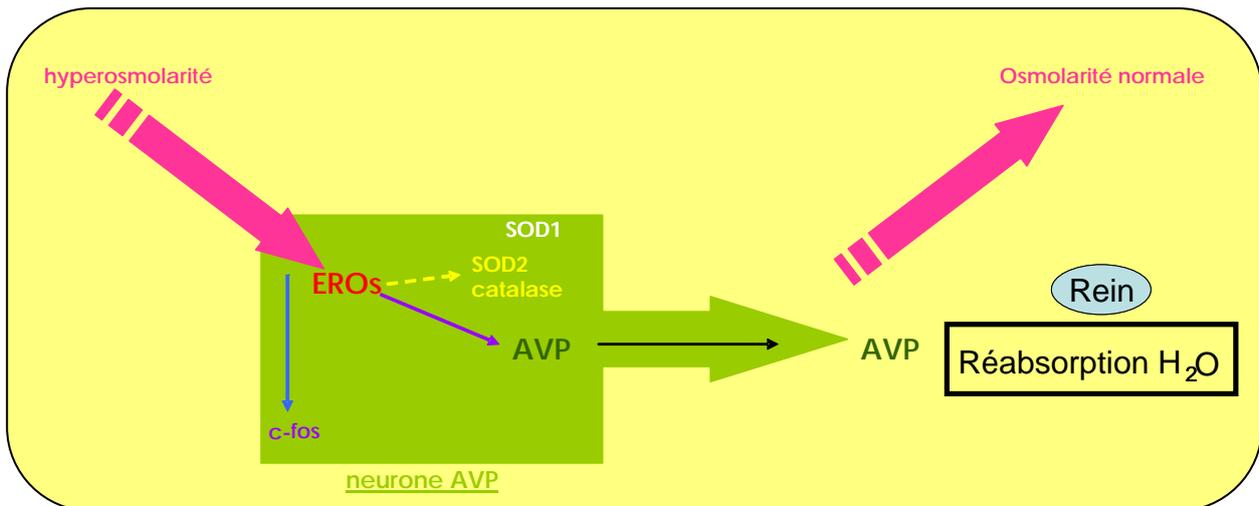
Enfin, en analysant l'expression de l'AVP, on voit que l'administration d'AAL bloque l'augmentation d'expression d'AVP que l'on observe chez les animaux non traités ce qui démontre que les EROs sont indispensables à la voie d'activation de l'expression de l'AVP.

De plus, c-Fos représentant l'activation neuronale induite par l'hyperosmolarité, l'absence d'augmentation de son expression confirme que l'expression de c-Fos n'est pas indispensable à la stimulation de l'expression de l'AVP et que les voies de régulation c-Fos et de l'AVP sont indépendantes (**Fig. 23**).

A l'issue de cette première partie du travail, nous avons donc démontré que lors d'une hyperosmolarité plasmatique, le neurone magnocellulaire vasopressinergique produit de

manière maîtrisée des radicaux libres, pris en charge par les enzymes anti-oxydants endogènes SOD2 et catalase. Ces EROs sont indispensables à l'augmentation de l'expression de l'AVP permettant la mise en jeu de la réponse osmoréglatrice et le retour à une osmolarité normale.

**Figure 23 : Bilan du mécanisme de régulation de l'expression de l'AVP impliquant les EROs**



II. Les espèces réactives de l'oxygène agissent comme médiateurs des voies noradrénergiques et nitrergiques dans le contrôle de l'expression de l'AVP

Afin de décrypter les mécanismes à l'origine de la production d'EROs au cours de la réponse osmoréglatrice, nous avons recherché les mécanismes contrôlant la réponse osmotique et qui pourraient être à l'origine de la production des EROs. Comme les neurones noradrénergiques constituent l'afférence majeure à l'hypothalamus neuroendocrine et la voie principale de mise en jeu de la réponse osmotique, nous nous sommes penchés sur le rôle des afférences noradrénergiques. Cette analyse nous a paru d'autant plus intéressante que nous avons démontré par des travaux précédents de notre équipe que l'effet de la noradrénaline sur l'expression de l'AVP passe par le monoxyde d'azote, qui est connu pour stimuler le métabolisme oxydatif (Maaloud et al., 2007). Nous avons donc étudié l'effet de la noradrénaline et du NO sur la production de radicaux libres dans le NSO et leur interaction avec l'expression de l'AVP.

Dans cette étude, nous avons utilisé d'abord comme modèle *in vivo* des souris transgéniques Tg8, KO pour la MAO-A, enzyme permettant le catabolisme des catécholamines. Ces souris

présentent des niveaux cérébraux de noradrénaline et de sérotonine élevés. Il en résulte des caractéristiques physiologiques et comportementales spécifiques aux Tg8 par rapport à leur souche C3H. En effet, d'un point de vue du développement, la déficience en MAO-A est associée à des perturbations de l'organisation des projections rétinienne et des afférences somatosensorielles thalamo-corticales (Cases et al., 1996 ; Lebrand et al., 1996 ; Upton et al., 1999 ; Vitalis et al., 1998 ; Yang et al., 2001). D'un point de vue comportemental, les souris Tg8 sont plus susceptibles de développer des déficits d'attention et des perturbations des interactions sociales (Cases et al., 1995). Ces souris sont plus agressives que les mâles C3H et ceci se répercute dans la diminution de leur temps d'exploration et dans une tolérance plus grande à l'alcool (Popova et al., 2000). Enfin, notre équipe a démontré que l'absence de MAO-A avait un effet sur certains paramètres de la fonction d'osmorégulation : les souris Tg8 présentent une expression et une libération d'AVP et d'OT supérieures à leur contrôles non-transgéniques et cela est associé à une diminution de leur hémato-crite et à une baisse significative de leur prise de boisson et de leur prise alimentaire (Vacher et al., 2002 et données non publiées de notre équipe).

Le traitement par l' $\alpha$ -MPT, un inhibiteur de la synthèse des catécholamines, est associé à une diminution du contenu en AVP dans les NSO des souris Tg8 comparativement aux souris Tg8 non traitées, en accord avec nos études précédentes (Vacher et al., 2002). La quantification par le carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA montre que la production d'EROs dans les neurones magnocellulaires accompagne cette augmentation de l'expression de l'AVP chez les Tg8, et que le traitement par l' $\alpha$ -MPT induit le retour à la normale des niveaux d'EROs. Ceci démontre que la NA stimule la production d'EROs dans le NSO *in vivo*.

Par la suite, nous avons utilisé une méthode *ex vivo* basée sur le maintien en survie de tranches d'hypothalamus provenant des souris C3H, pour analyser plus précisément le rôle modulateur des EROs dans les voies NA et NO. En effet, cette technique accorde à l'expérimentateur l'avantage de mieux contrôler le milieu environnant. De plus, elle permet de nous affranchir de la barrière hémato-encéphalique, susceptible de freiner, voire de bloquer, le passage des divers agents pharmacologiques que nous voulons tester.

L'usage *ex vivo* de tranches d'hypothalamus de souris C3H permet d'observer une augmentation du niveau d'expression de l'AVP en présence de la NA. Ceci confirme les résultats obtenus *in vivo* où l'augmentation de l'AVP est parallèle à celle de la NA au niveau du NSO. Le marquage redox par la DHE montre une augmentation de la production d'EROs parallèle à l'augmentation du niveau d'AVP, ce qui confirme que les EROs sont produits sous

l'effet de la noradrénaline. Ce contrôle s'exerce avec une cinétique semblable à celui de l'expression de l'AVP.

L'AAL, appliqué directement sur les tranches, bloque l'augmentation du niveau d'expression d'AVP, établissant ainsi que les EROS sont des intermédiaires indispensables dans la voie de régulation de l'AVP par la noradrénaline.

**NA** → **EROS** → **AVP**

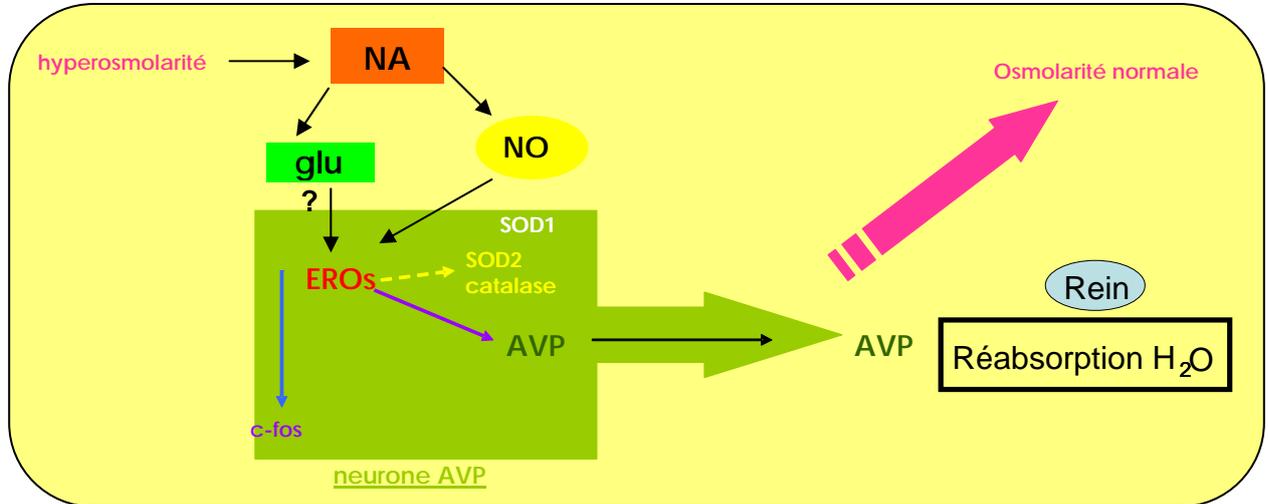
Les effets des afférences noradrénergiques sont modulées entre autres par des voies glutamatergiques (Daftary et al., 1998), et GABAergiques (Poulain et Wakerley, 1982). Dans ce contexte, nous avons porté plus particulièrement également notre attention sur le NO dont la voie d'activation est stimulée par le glutamate, modulée par le GABA et capable d'inhiber les neurones magnocellulaires (Srisawat et al., 2000). En effet, plusieurs travaux ont montré que les neurones peptidergiques du NSO et du NPV produisent du NO (Bredt et al., 1991; Vacher et al., 2003; Grange-Messent et al., 2004; Gonzalez-Hernandez et al., 2006), notamment sous l'influence du glutamate et du GABA environnant. De plus, le NO représente au même titre que la NA, un modulateur important de l'activité des neurones magnocellulaires dans le NSO (Kadowaki et al., 1994 ; Srisawat et al., 2000 ; Kadokaro, 2004). Ainsi, nous avons voulu savoir si le NO est également impliqué dans la production d'EROS.

Pour cela, nous avons traité les tranches d'hypothalamus avec un donneur de NO, le SNP. Ce traitement induit une augmentation de l'AVP dans le NSO, ce qui confirme nos résultats antérieurs (Vacher et al., 2003; Grange-Messent et al., 2004; Maolood et al., 2007) démontrant que le NO stimule l'expression de l'AVP. Le marquage par la DHE en présence de SNP suit en parallèle l'expression de l'AVP, démontrant que les EROS sont produits sous l'effet du NO.

Afin de positionner l'une par rapport à l'autre les deux voies de régulation, noradrénergique et nitreurgique, que nous venons d'établir dans le contrôle de la production d'EROS, les tranches ont été traitées par un inhibiteur de la NOS, le L-NAME combiné avec la NA. Nous avons tout d'abord vérifié que le L-NAME seul n'a aucun effet ni sur l'expression d'AVP, ni sur le niveau d'EROS. En revanche, il empêche l'effet stimulateur de la NA, démontrant que l'effet de la NA sur la production des EROS est médié par la voie nitreurgique qui contrôle également l'expression de l'AVP.

**NA** → **NO** → **EROS** → **AVP**

Figure 24 : Bilan du mécanisme de régulation de l'expression de l'AVP impliquant les EROs, la NA et le NO



## *Conclusion & Perspectives*

## **Conclusion-Perspectives**

Le rôle clé des EROs dans le contrôle nerveux de processus physiologiques commence à émerger. En particulier leur implication a été démontrée dans le contrôle de la prise alimentaire (Leloup et al., 2006; Jaillard et al., 2009), ou encore les phénomènes de potentialisation à long terme (LTP) (Knapp et Klann, 2002 ; Lee et al., 2010). Cependant, leur implication dans le contrôle de l'osmorégulation n'avait pas encore été envisagée. Nos résultats montrent que les EROs font partie intégrante de la signalisation hypothalamique de la vasopressine et sont indispensables au contrôle de la réponse osmorégulatrice. Les résultats que nous avons obtenus dans ce travail de thèse permettent d'élargir le concept des EROs comme molécules de signalisation endogènes intervenant dans divers paramètres physiologiques

Toutefois, quelques points sur la place des EROs dans la signalisation osmorégulatrice méritent d'être soulevés et considérés dans des projets futurs.

1) Les données que nous avons obtenues révèlent une implication des EROs comme molécules de signalisation dans les afférences noradrénergiques et nitrergiques, permettant la régulation de l'expression de la vasopressine. Nous avons évoqué les principales sources endogènes des EROs dans les cellules, à savoir la NADPH oxydase et les mitochondries. Les EROs, à leur tour, agissent comme des messagers secondaires afin de contrôler une variété de réactions physiologiques (pour revue, voir Dröge, 2002). Il serait donc intéressant d'analyser la modulation de la NADPH oxydase lors d'une stimulation osmotique ainsi que le rôle des afférences noradrénergiques sur son expression et son activité. Ceci nous permettrait de mieux comprendre la contribution de la NADPH oxydase à la production d'EROs, cette enzyme jouant un rôle clé dans la production extra- et intracellulaire d'anion superoxyde ainsi que d'autres dérivés réactifs. Cependant, d'autres sources d'EROs sont tout aussi importantes quantitativement et qualitativement, et méritent également qu'on s'y intéresse, puisqu'elles sont à l'origine des régulations fines de l'état redox. En particulier, l'étude de l'activité de la chaîne mitochondriale serait particulièrement intéressante, et ce d'autant plus que la réponse osmorégulatrice induit une augmentation du métabolisme des neurones magnocellulaires indispensable à l'augmentation de la synthèse de vasopressine.

Dans la régulation de l'équilibre hydro-minéral, nous avons également évoqué l'implication du système rénine-angiotensine-aldostérone. Bien que des études aient mis en lumière une

implication des EROs dans le développement et la progression de lésions rénales (Ohashi et al., 2009), leur implication dans la physiologie rénale est peu connue. Il serait donc intéressant d'explorer les effets des EROs sur ce système et de déterminer si les EROs servent de relais entre les systèmes de régulation osmotique centraux et périphériques.

2) Une deuxième question pourrait être abordée pour aller plus loin dans l'analyse de l'implication des EROs dans les régulations physiologiques. Il s'agit de l'action des EROs sur une ou des voies de transduction.

Comme nous l'avons présenté dans la partie bibliographique, les voies de transduction des EROs implique les JNK et les protéines MAPK. Les facteurs de transcription AP-1 et NF-kB sont également particulièrement sensibles à la régulation redox. Ces voies de transduction pourraient donc être modifiées au cours de la réponse osmorégulatrice à la suite de la production accrue d'EROS.

3) Enfin, il faudrait pousser l'étude vers le rôle que pourrait jouer le système glutathion dans la prise en charge des EROs au cours de l'osmorégulation. Les 2 isoformes de la SOD (SOD1 et SOD2) ainsi que la catalase sont présents dans les NSO et sont exprimées dans les neurones à AVP et à OT. De plus, leur activité est augmentée en cas de stimulation osmotique. Cependant, comme nous l'avons évoqué dans la partie bibliographique, ce système n'est pas exclusif. En particulier, la glutathion peroxydase (GPx) (dont on distingue 5 isoenzymes) est une enzyme importante dans la lutte contre le stress oxydant : il a été démontré qu'une altération de cette défense anti-oxydante peut fragiliser les cellules cancéreuses et augmenter spécifiquement l'efficacité des traitements anticancéreux qui génèrent des EROs (Colas et al., 2006). Par ailleurs, les anti-oxydants alimentaires (vitamine C, vitamine E, caroténoïdes...) sont largement utilisés pour améliorer les excès du stress oxydatif, mais la preuve scientifique de leur efficacité reste encore limitée (Frigelius-Flohe et al., 1999, Krinsky, 2001). Nous nous proposons d'analyser l'activité glutathion peroxydase dans notre protocole de stimulation osmotique afin de compléter le panorama des systèmes anti-oxydants mis en jeu au cours de l'osmorégulation.

4) Le dernier point intéressant qui pourrait être abordé est le rôle des EROs dans la chaîne de signalisation des chimiokines impliquées dans l'osmorégulation, puisque les études ont démontré que les chimiokines modulent l'expression de l'AVP (Banisadr et al., 2003; Callawaere et al., 2006; Callawaere et al., 2008). Cette analyse permettrait ainsi de mieux

comprendre comment les chimiokines exercent leur action au sein du système nerveux central et éventuellement d'ouvrir de nouvelles perspectives à propos de leurs rôles autres que ceux déjà connus pour la modulation de la réponse inflammatoire ou l'activation leucocytaire.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence une production d'EROs au niveau du NSO, structure impliquée dans l'équilibre hydro-osmotique. Cette production accrue de EROs est prise en charge par le système anti-oxydant superoxyde dismutase/catalase. De ce point de vue, cette étude apporte de nouveaux éléments quant aux effets d'un traitement anti-oxydant par voie systémique. En effet, l'acide  $\alpha$ -lipoïque est utilisé en thérapie pour prévenir les maladies cardiovasculaires (Lee et al., 2006), l'inflammation rénale (Takaoka et al., 2002; Kang et al., 2009) ou la perte de mémoire durant le vieillissement ou la maladie d'Alzheimer (Cui et al., 2006; pour revue, voir Holmquist et al., 2007). Les effets que nous venons de décrire de l'acide  $\alpha$ -lipoïque sur l'axe osmorégulateur devront être pris en compte, car ce traitement, en bloquant la production physiologique d'EROs, pourrait aggraver le déséquilibre électrolytique, fréquent chez les patients âgés (Allison et al., 2004 ; Hodak et Verbalis, 2005).

*Annexe*

## **Annexe**

Au cours de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de participer aux travaux du Dr. Claire-Marie Vacher pour compléter des expériences sur les souris Tg8 et C3H/HeJ afin de démontrer l'implication des monoamines dans l'architecture du complexe hypothalamo-neurohypophysaire. Les résultats obtenus sont présentés dans un article publié dans *Journal of Neuroscience Research*.

# Architecture of the Hypothalamo–Posthypophyseal Complex Is Controlled by Monoamines

Claire-Marie Vacher,<sup>1</sup> Valérie Grange-Messent,<sup>2,3,4</sup> Ronald St.-Louis,<sup>2,3,4</sup> Danièle Raison,<sup>2,3,4</sup> Jean-Marc Lacorte,<sup>5,6,7</sup> and Hélène Hardin-Pouzet<sup>2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, Centre de Neurosciences Paris-Sud, UMR 8195, Université Paris-Sud, CNRS Orsay, France

<sup>2</sup>UPMC Université Paris 06, Paris, France

<sup>3</sup>INSERM U952, Paris, France

<sup>4</sup>CNRS, UMR 7224, Paris, France

<sup>5</sup>Université Pierre et Marie Curie—Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, France

<sup>6</sup>INSERM U872, Paris, France

<sup>7</sup>Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, France

The hypothalamo–neurohypophyseal system displays significant plasticity when subjected to physiological stimuli, such as dehydration, parturition, or lactation. This plasticity arises at the neurochemical and electrophysiological levels but also at a structural level. Several studies have demonstrated the role of monoaminergic afferents in controlling neurochemical and electrophysiological plasticity of the supraoptic nucleus (SON) and of the neurohypophysis (NH), but little is known about how the changes in structural plasticity are triggered. We used Tg8 mice, disrupted for the monoamine oxidase A gene, to study monamine involvement in the architecture of the SON and of the NH. SON astrocytes in Tg8 mice displayed an active status, characterized by an increase in S100 $\beta$  expression and a significant decrease in vimentin expression, with no modification in glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels. Astrocytes showed a decrease in glutamate dehydrogenase (GDH) levels, whereas glutamine synthetase (GS) levels remained constant, suggesting a reduction in astrocyte glutamate catabolism. Tenascin C and polysialic acid-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) expressions were also elevated in the SON of Tg8 mice, suggesting an increased capacity for structural remodelling in the SON. In the NH, similar data were obtained with a stability in GFAP expression and an increase in PSA-NCAM immunostaining. These results establish monoamine (serotonin and noradrenaline) involvement in SON and NH structural arrangement. Monoamines therefore appear to be crucial for the coordination of the neurochemical and structural aspects of neuroendocrine plasticity, allowing the hypothalamo–neurohypophyseal system to respond appropriately when stimulated. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** supraoptic nucleus; neurohypophysis; PSA-NCAM; tenascin C; vimentin; S100 $\beta$ ; glutamate dehydrogenase

Interactions between astrocytes and neurons are essential for several brain functions, including homeostatic and metabolic signalling and trophic and pathophysiological regulation (Hatton, 2002; Barker and Ullian, 2010). The hypothalamo–neurohypophyseal system clearly demonstrates the importance of these functional interactions. Magnocellular neurons from the supraoptic nucleus (SON) synthesize the neurohormones vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) and release them directly into the general blood circulation from their axon terminals within the neurohypophysis (NH; Armstrong, 1995). AVP is an antidiuretic hormone, promoting water reabsorption in the kidney and contributing to vasoconstriction of the arterioles. In addition to its well-characterized involvement in parturition and lactation, OT also stimulates natriuresis and modulates hypotension-induced responses (Huang et al., 1996, 2001). The most striking aspect of the hypothalamic–neurohypophyseal system response is its immediate response to physiological stimulation, such as dehydration, parturition, or lactation. Indeed, the rapid increases in the synthesis and release of neurohormones are associated with a change in the electrical activity of magnocellular neurons and their afferents, particularly glutamatergic and GABAergic neurons, and with variations in copeptide expression (Tasker et al., 2002; Sharman et al., 2004; Leng et al., 2010). Previous studies have shown that monoamines, especially noradrenaline, stimulate AVP and OT production

\*Correspondence to: Hélène Hardin-Pouzet, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, INSERM UMRS 952, CNRS UMR 7224, UPMC, 7 quai Saint Bernard, B t A, 3 me  tage, 75252 Paris Cedex 05, France. E-mail: helene.pouzet@snv.jussieu.fr

Received 16 February 2011; Revised 24 May 2011; Accepted 31 May 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.22726

(Vacher et al., 2002; Cunningham et al., 2004; Maolood et al., 2007). Furthermore, noradrenaline is also implicated in the increase in galanin and nitric oxide production involved in the neurochemical plasticity accompanying neurohormone regulation (Grange-Messent et al., 2004; Melnikova et al., 2006).

The neurochemical plasticity occurs simultaneously with various structural modifications: an increase in size of the magnocellular soma; apposition of neuronal membranes; changes in connectivity with the emergence of shared synapses, in particular among magnocellular, glutamate, and GABA neurons; and modifications in the glial coverage and composition of the extracellular matrix (Di and Tasker, 2004; Theodosios et al., 2008). The functional consequences of such a structural plasticity of the SON and NH have largely been analyzed, but little is known about the mechanisms that trigger these changes.

We used the Tg8 transgenic mouse line, disrupted for the monoamine oxidase A (MAO-A) gene, to analyze the role of monoaminergic systems in the SON and NH structure *in vivo*. This mutation results in increased amounts of serotonin and noradrenaline in the brain (Cases et al., 1995), notably in the PVN and SON, and leads to an increase in AVP and OT expressions (Vacher et al., 2002). The astrocytic morphology was assessed by analyzing glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and S100 $\beta$  expression. Because astrocytes play a key role in glutamatergic transmission, which is elevated with stimulation of the hypothalamo–neurohypophyseal system, we evaluated glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH) expression, because these two enzymes are expressed specifically by astrocytes and are responsible for glutamate catabolism (McKenna et al., 2000; Vardimon, 2000; Magistretti, 2009). Finally, we evaluated polysialic acid–neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) and tenascin C expression, adhesion and extracellular matrix proteins, respectively, that are particularly involved in hypothalamo–neurohypophyseal plasticity (Nothias et al., 1997; Langle et al., 2002).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All animal experiments were performed in agreement with legal requirements (86/609/EEC) and were approved by the local committee on animal welfare (permission to experiment 75-1650 from the French Department of Veterinary Services). Two mouse strains were used: C3H/HeJ (C3H) and Tg8 mice. Tg8 mice are characterized by inactivation of the MAO-A gene and descend from C3H mice. The 3-month-old male C3H and Tg8 mice used in this study were housed on a 12:12-hr light–dark cycle with free access to food and water.

### Tissue Preparation for Immunohistochemistry

Animals (21 C3H and 21 Tg8 mice) were anesthetized with sodium pentobarbital (25 mg/kg) and perfused through the left ventricle with 50 ml of saline followed by 50 ml of

4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains and hypophysis were removed, postfixed in the same fixative for 4 hr at 4°C, and cryoprotected in 20% sucrose. Serial coronal 20- $\mu$ m-thick sections were cut on a cryostat at –21°C. Twenty sections, divided into two batches, were collected for each animal.

### Immunohistochemistry

Sections were washed in 0.05 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Triton X-100 for 2 hr at room temperature and were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (polyclonal anti-GFAP from Dako France, 1:500; monoclonal antivimentin from Sigma France, 1/80; monoclonal anti-S100 $\beta$  from Sigma, 1:2,000; monoclonal anti-GS from Transduction Laboratories BD-Biosciences France, 1:1,000; polyclonal anti-GDH from Biodesign Germany, 1:500; IgM anti-PSA-NCAM [Rougon et al., 1986], 1:1,000; and monoclonal antitenascin from Sigma, 1:200). Then, the sections were rinsed with PBS/BSA before the detection of bound primary antibody using biotinylated anti-rabbit or mouse IgG antibodies (Vector Laboratories France; 1:250) and then for 2 hr with streptavidin conjugated to Cy3 dye (Vector Laboratories; 1:250). Fluorescence was observed with a Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope, and images were captured with a Zeiss AxioCam HRc digital camera and Axiovision version 4.1 software.

### Quantification

All quantification steps were performed in ImageJ 1.36b software (NIH). The differences in level of expression of S100 $\beta$ , GDH, GS, tenascin C, and PSA-NCAM in the SON between C3H and Tg8 mice were assessed by comparing the integrated density of the fluorescent signal emitted by Cy3 on thresholded sections. The integrated fluorescence density level quantifies the sum of the values of the pixels within the reproductive contours of a whole SON. The differences in GFAP-immunofluorescent coverage in the SON between C3H and Tg8 mice were assessed by comparing the area fractions of fluorescent signals emitted by Cy3 on thresholded sections. All measurements were performed in a defined-size drawn outline, reused for every condition examined and averaged for each animal from five hypothalamus sections homogeneously distributed through the SON.

### Tissue Preparation for qRT-PCR

Brains of eight C3H and eight Tg8 mice were removed immediately after decapitation, and thick (400  $\mu$ m) frontal sections of the hypothalamus were cut with a vibroslicer. The bilateral SONs were punched out and stored at –80°C.

Total cytoplasmic RNA was extracted using the PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus Bioscience USA), and the total RNA content was directly measured in 1  $\mu$ l of the RNA extract at wavelengths of 260 and 280 nm with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. RNA integrity was confirmed by the visualization of 28S and 18S rRNA on a 1% agarose gel.

TABLE I. Primer Characteristics\*

Gene	Primer sequence	Amplified fragment
GFAP	F: AAC CCG TTC TCT GGA AGA CA R: TGC AGC CAG GAA TAG ACC TT	2008–2107 (99 bp)
Vim	F: CGG CTG CGA GAG AAA TTG C R: CCA CTT TCC GTT CAA GGT CA G	550–673 (123 bp)
S100 $\beta$	F: GGT GAC AAG CAC AAG CTG AA R: TTT GTC CAC CAC TTC CTG CT	181–282 (101 bp)
GDH	F: CCC AAA GCC AAG GTC TAT GA R: GAC TCT GGG TGC ATT GGA TT	1160–1264 (104 bp)
GS	F: CTG CCA TAC CAA CTT CAG CA R: TGT GGT ACT GGT GCC TCT TG	881–981 (100 bp)
TenC	F: ACG GCT ACC ACA GAA GCT G R: ATG GCT GTT GTT GCT ATG GCA	4294–4563 (269 bp)
NCAM	F: CAG TGA AGA ACA GGA TCT GGA TG R: TTC CCT TCC CAG GTG TAG ACA	1050–1262 (212 bp)

\*Primers were designed using NCBI primer blast, and their specificity was checked using NCBI GenBank and Fasta.

### Quantitative RT-PCR

Two micrograms of total RNA was converted to single-strand cDNA using reverse transcriptase M-MLV at 200 U/ $\mu$ l (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The reaction was performed in a 30- $\mu$ l mixture containing 2,500 U Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega France), 2.5 mM dNTP mixture, 0.1M dithiothreitol (DTT), 200 U reverse transcriptase, and 100  $\mu$ M oligo pdN6.

Semiquantitative RT-PCR analyses were performed in a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics Meylan France) with 200 ng reverse-transcribed total RNA in 1 $\times$  LC FastStar DNA Master Plus SYBR Green I buffer (Roche Diagnostics Meylan), and 200 nM of each sense and antisense primer in a final volume of 10  $\mu$ l. Quantification of 18S rRNA gene expression was done with Predeveloped Taqman Assay Reagent (Applied Biosystems, Ullis, France) and LC FastStart DNA Master Plus Hybridization probes (Roche Diagnostics France). The specificity of amplification products was verified by making a melting curve at the end of the PCR amplification. For standard curves, cDNA of C3H mice were subjected to serial dilutions, amplified along with samples, and plotted in arbitrary units to acquire quantitative data with the LightCycler software. Expression data for mRNA levels of target genes were normalized compared with 18S rRNA and expressed as arbitrary units. All samples were assayed in duplicate, and the average value of the duplicates was used for quantification. Primers were designed using NCBI primer blast, and their specificity was checked using NCBI GenBank and Fasta. Primers (Table I) were obtained from MWG-Biotech France.

### Statistical Analysis

For analysis of the amount of specific mRNA, the signal was standardized against an 18S mRNA reference inserted in every real-time PCR run. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare Tg8 mice and control C3H mice. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Effects of MAO-A Gene Inactivation on Astrocytic Morphology

Astrocyte morphology in response to MAO-A gene disruption was analyzed via the expression of GFAP, vimentin, and S100 $\beta$ . GFAP and vimentin are intermediate filament proteins that are specific for mature and immature astrocytes, respectively. S100 $\beta$  is a more functional marker of mature astrocytes and is expressed during astrocytosis, when astrocytes turn reactive.

In C3H mice, GFAP was visualized by immunofluorescence all over the SON. Astrocytes exhibited processes spread across the whole SON (Fig. 1A). The ventral glia limitans (VGL) also appeared to be immunopositive. No significant variation in the astrocytic coverage was observed in Tg8 mice (C3H:  $37.88 \pm 3.14$  vs. Tg8:  $34.15 \pm 4.20$ ), except that the astrocyte processes appeared to be thicker than in controls (C3H:  $1.91 \mu\text{m} \pm 0.67$  vs. Tg8:  $3.42 \mu\text{m} \pm 0.97$ ,  $P < 0.1$ ) across the whole SON and that their processes tended to adopt a perpendicular orientation to the VGL (Fig. 1, insets). No difference in GFAP mRNA amounts was measured between C3H and Tg8 mice (C3H:  $100 \pm 26.33$  vs. Tg8:  $147.70 \pm 20.4$ ; see Fig. 5A).

Vimentin was expressed in the cytoplasm of cells distributed in the whole SON from C3H mouse. Thin processes and the VGL also appeared to be immunopositive (Fig. 1C). Vimentin immunoreactivity in Tg8 mice almost completely disappeared (Fig. 1D). Very few cells were stained, with the labelling restricted to the cytoplasm. This strong decrease in vimentin expression was confirmed by analyzing mRNA amounts (C3H:  $100 \pm 8.19$  vs. Tg8:  $26.61 \pm 12.24$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 5B).

S100 $\beta$  exhibited low immunoreactivity in the SON of C3H mice (Fig. 1E). It appeared as a punctate network surrounding negative cells, which were probably magnocellular neurons. The integrated fluorescence density was significantly greater in Tg8 mice (Fig. 1F)

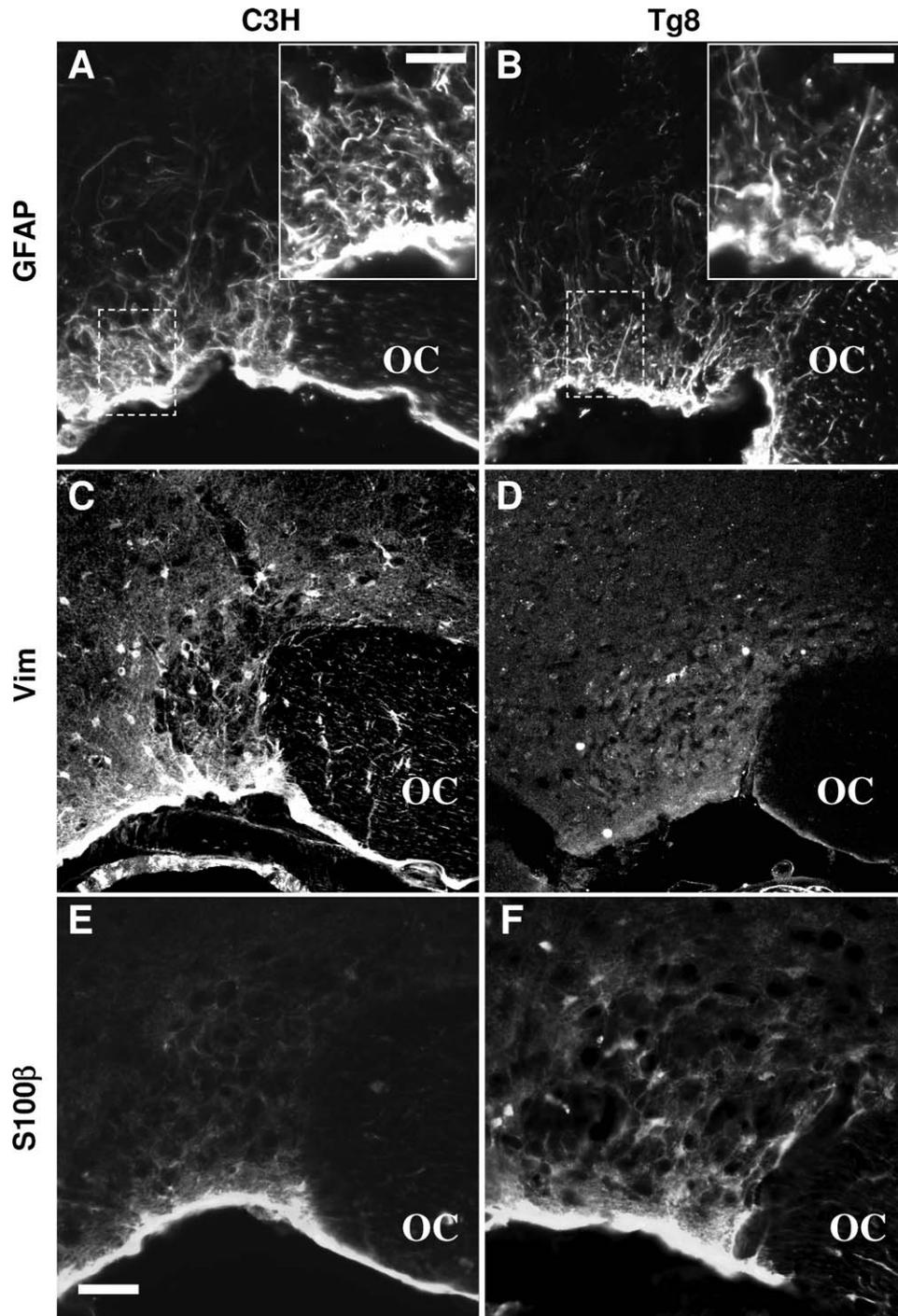


Fig. 1. Effects of monoamine oxidase A gene inactivation on the astrocytic reaction. Immunodetection of GFAP (**A,B**), vimentin (**C,D**), and S100 $\beta$  (**E,F**) in the supraoptic nucleus of C3H (**A,C,E**) and Tg8 (**B,D,F**) mice. GFAP immunoreactivity appeared unchanged, whereas there was less vimentin labeling in Tg8 mice and significantly more S100 $\beta$  staining. Pictures are representative of the SON of three C3H and three Tg8. **Insets**: High magnification of GFAP staining. OC, optic chiasma. Scale bars = 100  $\mu$ m in A–F; 50  $\mu$ m in insets.

than in C3H mice, in both the VGL and the SON (C3H:  $100 \pm 20.11$  vs. Tg8:  $323.48 \pm 70.22$ ,  $P < 0.05$ ), and the mean number of S100 $\beta$ -positive soma in

one SON per 20- $\mu$ m-thick section was estimated at  $4.67 \pm 0.88$  in C3H mice and  $15.33 \pm 1.85$  in Tg8 mice ( $P < 0.01$ ). S100 $\beta$  mRNA amounts were also greater, as

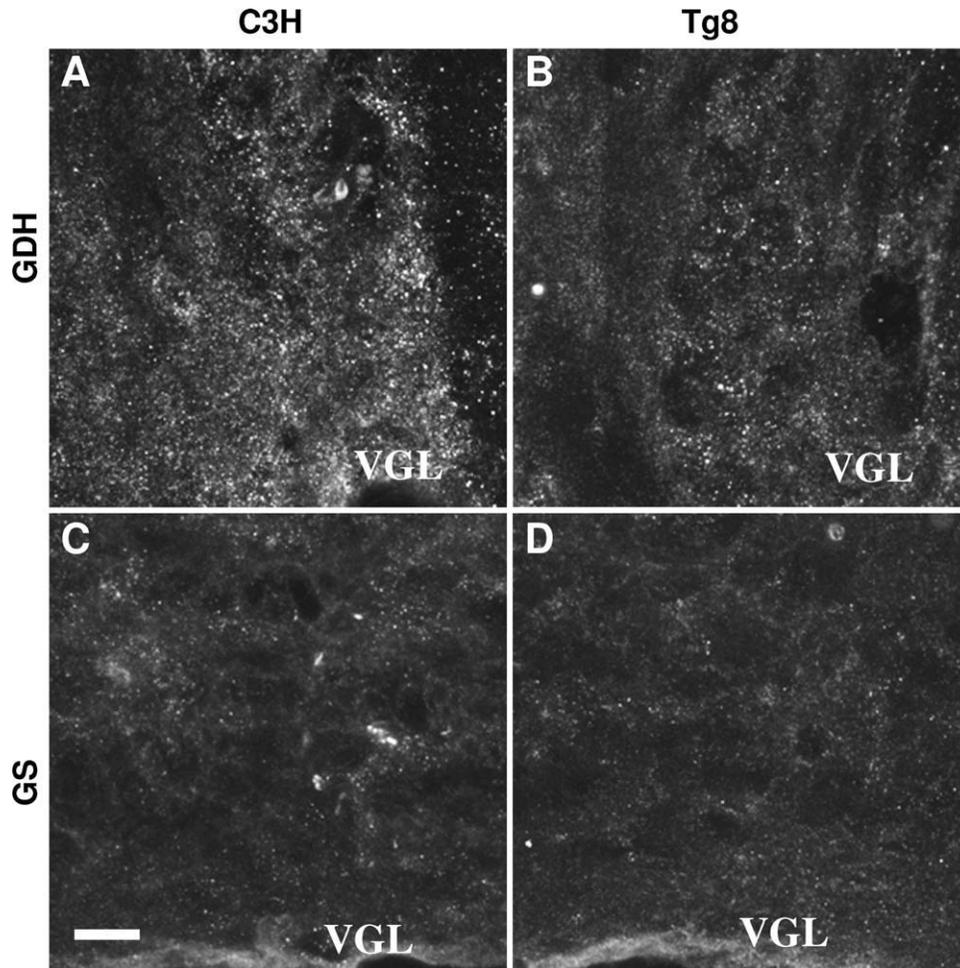


Fig. 2. Effects of monoamine oxidase A gene inactivation on the astrocytic catabolism of glutamate. Immunofluorescence against GDH (A,B) and GS (C,D) in the supraoptic nucleus of C3H (A,C) and Tg8 (B,D) mice. There was less punctate GDH staining in Tg8 mice. The GS labelling was weak and did not change. Pictures are representative of the SON of three C3H and three Tg8. VGL, ventral glia limitans. Scale bar = 20  $\mu$ m.

confirmed by qRT-PCR (C3H:  $100 \pm 4.4$  vs. Tg8:  $141.36 \pm 6.96$ ,  $P < 0.05$ ; see Fig. 5C).

#### Effects of MAO-A Gene Inactivation on the Astrocytic Catabolism of Glutamate

Astrocytes are key cells for the catabolism of glutamate, so we compared the expression of enzymes GDH and GS involved in glutamate detoxification between C3H and Tg8 mice. GDH immunoreactivity in C3H mice appeared punctate, in accordance with the mitochondrial localization of the enzyme (Fig. 2A). The staining surrounded negative areas, which probably corresponds to the magnocellular soma. In Tg8 mice, the distribution of immunostaining was similar but with a 40% decrease in integrated density (C3H:  $100 \pm 4.51$  vs. Tg8:  $60.77 \pm 2.28$ ,  $P < 0.005$ ; Fig. 2B). This decrease in GDH expression was confirmed by mRNA analysis (C3H:  $100 \pm 3.55$  vs. Tg8:  $81.6 \pm 6.12$ ,  $P < 0.05$ ; see Fig. 5D).

GS immunoreactivity was weak in the SON of both C3H and Tg8 mice (Fig. 2C,D). As for GDH, the labelling appeared punctate around the negative areas. Staining intensity was similar between C3H and Tg8 mice (C3H:  $100 \pm 11.95$  vs. Tg8:  $92.31 \pm 7.95$ ). No variation in GS mRNA expression was measured (C3H:  $100 \pm 7.11$  vs. Tg8:  $119.52 \pm 4.91$ ; see Fig. 5E).

#### Effects of MAO-A Gene Inactivation on the Expression of Extracellular Matrix Proteins

Finally, for an overall view of the structural response to MAO-A gene disruption, PSA-NCAM and tenascin C expression were assessed. These two markers were chosen because they are emblematic of the structural plasticity already described for the SON (Langle et al., 2002).

Tenascin C immunoreactivity was cytoplasmic in the SON of C3H mice. There was also some weak

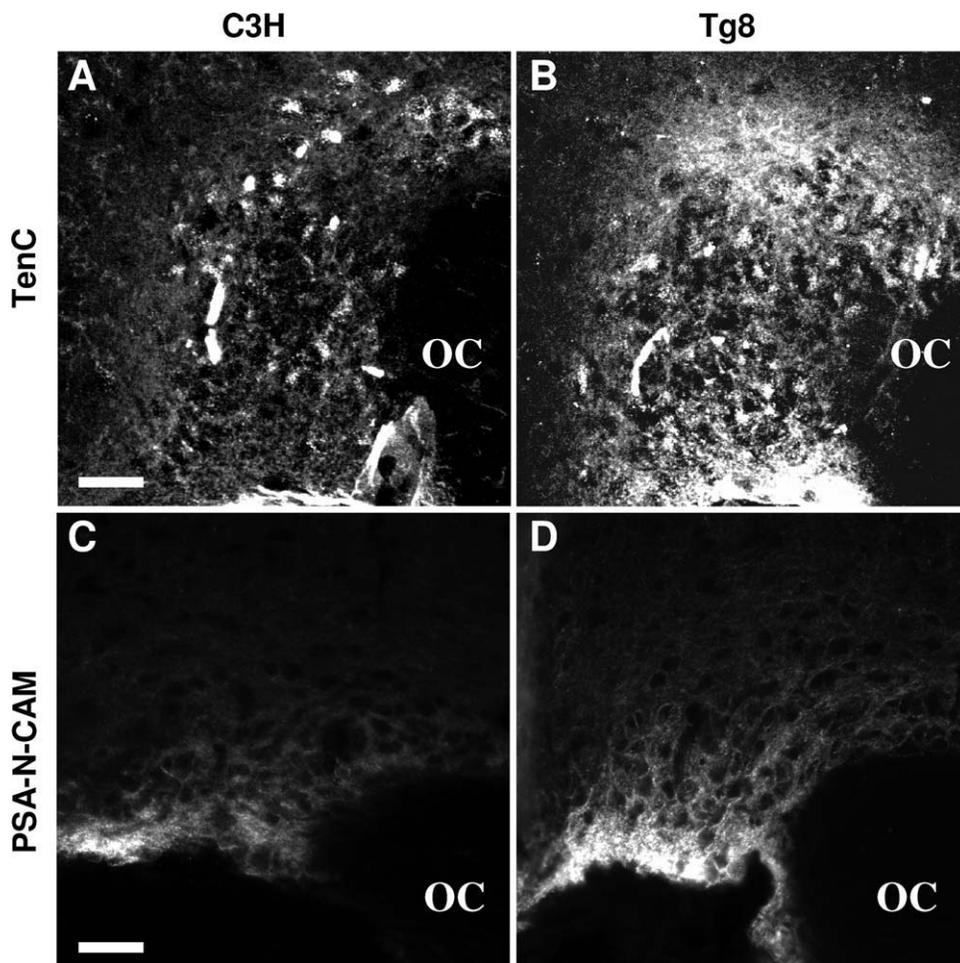


Fig. 3. Effects of monoamine oxidase A gene inactivation on the expression of extracellular matrix proteins. Detection of tenascin C (A,B) and PSA-NCAM (C,D) in the supraoptic nucleus of C3H (A,C) and Tg8 (B,D) mice. In Tg8 mice, tenascin labelling was strongly enhanced, especially in the extracellular compartment. The PSA-NCAM staining was also increased, surrounding the magnocellular cell bodies. Pictures are representative of the SON of three C3H and three Tg8. OC, optic chiasma. Scale bars = 100  $\mu$ m.

staining in the extracellular space, around the negative magnocellular soma (Fig. 3A). Staining was significantly increased threefold in Tg8 mice compared with C3H mice, especially in the extracellular space. The number of immunopositive cells was also greater (Fig. 3B). The strong increase in tenascin expression was confirmed at the mRNA level (C3H:  $100 \pm 8.13$  vs. Tg8:  $205.71 \pm 9.59$ ,  $P < 0.05$ ; see Fig. 5F).

The PSA-NCAM immunoreactivity was preferentially localized around the VGL in the SON of C3H mice (Fig. 3C). The signal was greater in Tg8 mice across the whole SON and was detected in the extracellular space surrounding cell bodies (C3H:  $100 \pm 3.29$  vs. Tg8:  $149.06 \pm 4.31$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 3D). The increase in PSA-NCAM labeling was accompanied by an increase in NCAM expression as demonstrated by qRT-PCR analysis (C3H:  $100 \pm 10.45$  vs. Tg8:  $169.63 \pm 4.73$ ,  $P < 0.05$ ; see Fig. 5G).

### Effects of MAO-A Gene Inactivation on the Expression of GFAP and PSA-NCAM in the Neurohypophysis

In C3H mice, GFAP staining revealed processes of pituicytes spread into the whole neurohypophysis. No strong variation in GFAP immunoreactivity was observed in Tg8 mice (Fig. 4A,B). PSA-NCAM was also expressed in the whole neurohypophysis and distributed in the extracellular space. The immunostaining intensity was increased in Tg8 mice compared with C3H mice (Fig. 4C,D).

### DISCUSSION

The structural plasticity of the hypothalamo–post-hypophyseal complex is a major aspect of the physiological response of the system during dehydration, lactation, or parturition (Leng et al., 2010). These modifications

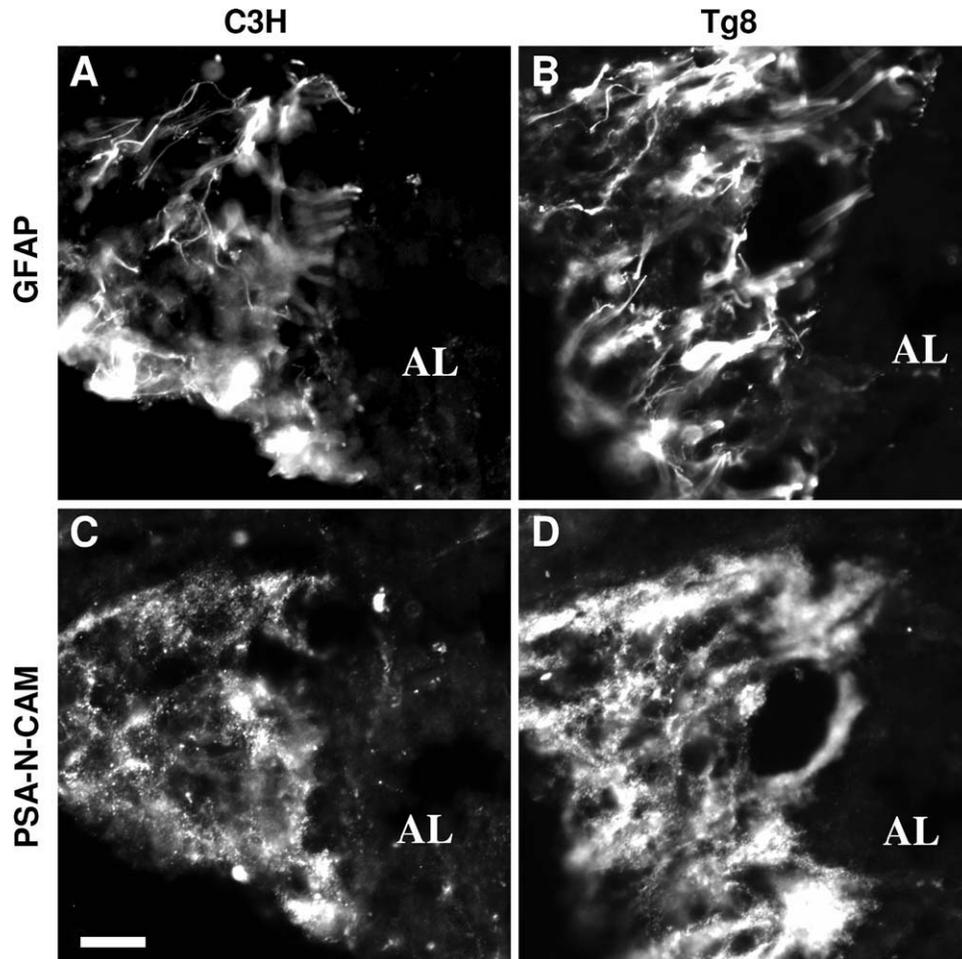


Fig. 4. Effects of monoamine oxidase A gene inactivation on the expression of GFAP and PSA-NCAM in the neurohypophysis. Detection of GFAP (A,B) and PSA-NCAM (C,D) in the neurohypophysis of C3H (A,C) and Tg8 (B,D) mice. In Tg8 mice, GFAP labelling did not change. The PSA-NCAM staining was increased in the extracellular compartment. Pictures are representative of the neurohypophysis of three C3H and three Tg8. AL, anterior lobe of the hypophysis. Scale bar = 100  $\mu$ m.

affect the magnocellular neurons themselves by increasing the size of their soma but also by changes in the connectivity of their afferents, particularly the glutamatergic and GABAergic ones (Tasker et al., 2002; Di and Tasker, 2004). Structural plasticity also occurs in astrocytes via changes in their morphology and retraction of their coverage. This is accompanied by rearrangement in the extracellular matrix and modifications in the expression of adhesion molecules and trophic factors (Theodosis et al., 2008). The structural modifications of the hypothalamo–posthypophyseal system are different, based on the physiological stimuli to which the system is subjected. During lactation, the astrocytic end feet retract and magnocellular soma become apposed, whereas, with dehydration, only a reorientation of astrocytic processes has been described (Hatton, 1997; Salm, 2000). These differences in structural rearrangement have been correlated with the time course of neurohormone release:

during lactation, oxytocin must be released by bursts, whereas, during dehydration, AVP must be continuously released throughout the duration of the stimulus (Leng et al., 2010).

Several studies have analyzed the role of hypothalamic inputs in the control of neuroendocrine plasticity, particularly the importance of monoaminergic afferents. Monoaminergic afferents to SON are dominated by a noradrenergic input (Sawchenko and Swanson, 1982; Ginsberg et al., 1994), but the SON also receives a moderate serotonergic innervation (Sawchenko et al., 1983; Larsen et al., 1996). The two monoamines regulate the synthesis and release of AVP and OT (Theodosis et al., 1998; Vacher et al., 2002) but also regulate other aspects of the SON neurochemical response, such as galanin expression (Melnikova et al., 2006). Monoamines can directly affect SON and NH cells, because noradrenergic and serotonergic receptors are present in this area

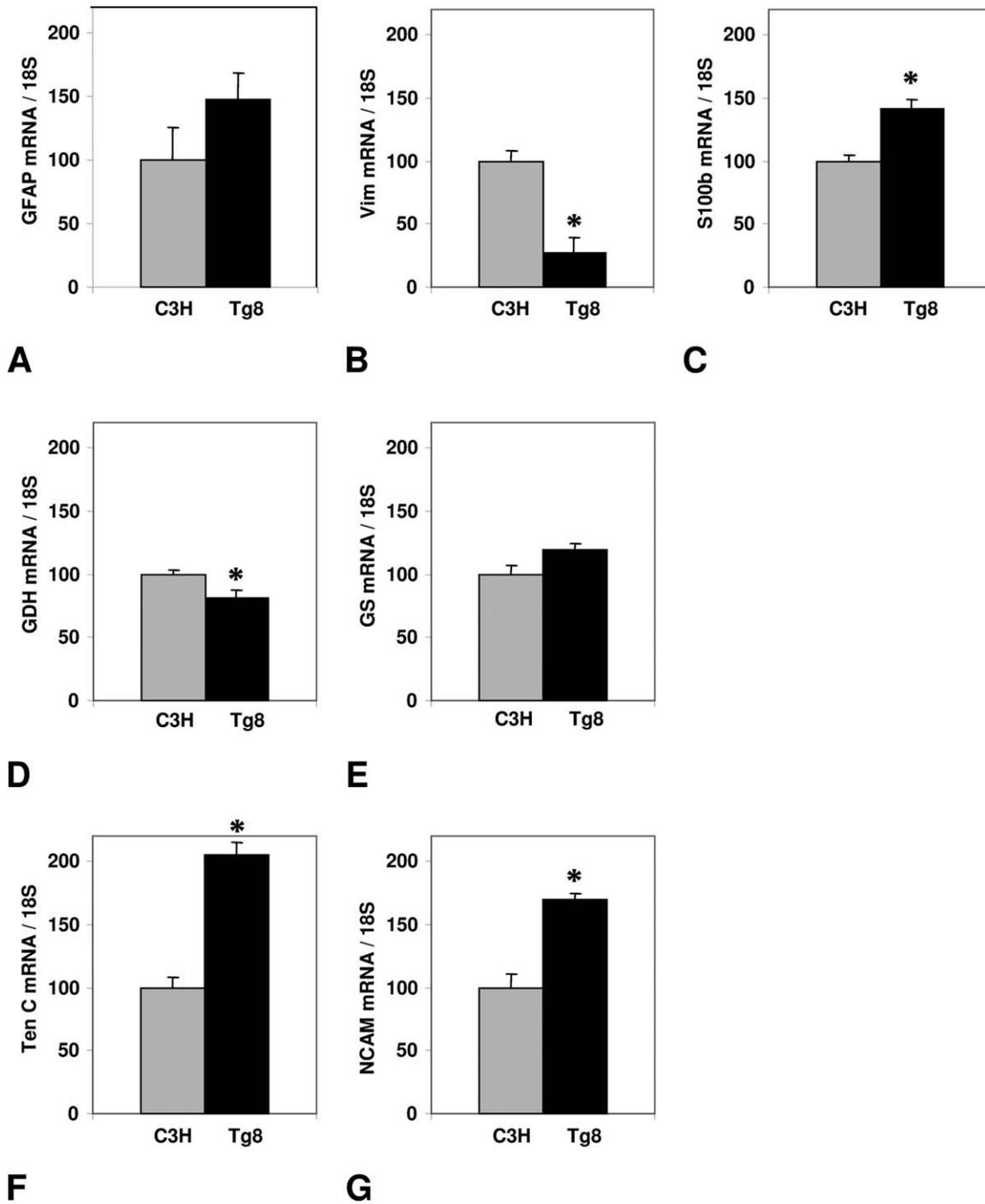


Fig. 5. Levels of GFAP (A), vimentin (B), S100 $\beta$  (C), GDH (D), GS (E), tenascin C (F), and NCAM (G) mRNA measured by qRT-PCR in the supraoptic nucleus of C3H and Tg8 mice ( $n = 8$  in each condition). Data reported are mean percentages of the C3H mice  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with C3H group by one-way ANOVA.

(Saydoff et al., 1996; Vicentic et al., 1998; Espallergues et al., 2007; Bundzikova et al., 2009), but they can also act indirectly via glutamatergic terminals or the release of nitric oxide (Vacher et al., 2003; Grange-Messent

et al., 2004; Ventura et al., 2005; Panatier et al., 2006). However, the mechanisms triggering structural plasticity remain unclear. Here we addressed this question by using the Tg8 transgenic model that we have previously

used to demonstrate monoamine involvement in the control of AVP and OT expression and thus neurochemical plasticity (Vacher et al., 2002).

We first characterized the activation state of Tg8 mice SON astrocytes. GFAP expression in these animals was not modified, and the distribution showed little change. Astrocyte processes were slightly thicker and showed a slight shift in orientation, perpendicular to the VGL. These discrete morphological changes in Tg8 mice are reminiscent of those observed during dehydration (Hatton, 1997; Salm, 2000; Leng et al., 2010). In contrast to the stability of GFAP expression, vimentin, which is used to characterize immature astrocytes, undergoes a dramatic decrease in its expression, demonstrating that monoamines are responsible for significant changes observed in astrocytes. This was confirmed by analyzing S100 $\beta$  expression. This protein is a more functional marker of astrocytic activity; when cytoplasmic, S100 $\beta$  is a calcium-binding protein, and, when secreted, it has a trophic and protective role on the surrounding cells (for review see Donato et al., 2009). Its expression is enhanced during astrocytosis, so S100 $\beta$  is considered as a marker for activated astrocytes (Sofroniew and Vinters, 2010). In Tg8 animals, S100 $\beta$  amounts were greater in both the cytoplasm and the extracellular space. This could be the result of the increase in noradrenergic and/or serotonergic levels or in the production of glutamate and nitric oxide, insofar as these signaling molecules are known to stimulate S100 $\beta$  production and secretion (Whitaker-Azmitia et al., 1990; Tsoporis et al., 1997; Ciccarelli et al., 1999; Donato et al., 2009). Taken together, these results demonstrate that SON astrocytes in Tg8 mice have an increased metabolism. Nevertheless this astrocytic state is different from that observed during responses to a lesion, i.e., the state of “reactive astrocyte” (Pekny and Nilsson, 2005; Correa-Cerro and Mandell, 2007; Sofroniew and Vinters, 2010), because we did not observe greater GFAP expression.

The active state of astrocytes in the SON in Tg8 mice has functional consequences, not only because S100 $\beta$  is upregulated but also at the level of glutamate catabolism, because a decrease in the GDH expression was observed. Glutamate is particularly important in the SON; it is the main excitatory neurotransmitter (Wuarin and Dudek, 1993). Previous studies have shown that glutamatergic inputs play an important role in the regulation of SON neuron excitability (Gribkoff and Dudek, 1988, 1990; Parker and Crowley, 1993; Wuarin and Dudek, 1993), via the induction of LTP and LTD (Panatier et al., 2006). It is thus particularly important to control the extracellular level of glutamate in the synaptic cleft, to preserve neuronal excitability. Astrocytes play a crucial role in this process; they represent the main actors of glutamate uptake and they are able to catabolize it, thanks to the specific expression of two enzymes, GS and GDH (Hertz, 2006; Kimelberg, 2010). Glutamate is either converted by GS into glutamine, which is mainly rejected in the blood (Vardimon, 2000; Magistretti, 2009), or by GDH into  $\alpha$ -ketoglutarate,

which enters the Krebs cycle (McKenna et al., 2000; Mastorodemos et al., 2005). The specific decrease in GDH expression and stability of the GS level in the SON of Tg8 mice, suggesting a reduction in the catabolism of glutamate, may participate in the general increase in glutamate transmission, which has already been demonstrated during the physiological responses of the hypothalamo–posthypophyseal system and also during the activation of this system by noradrenaline (Boudaba et al., 2003; Di and Tasker, 2004; Israel et al., 2010).

To complete the overall picture of SON astrocytes in Tg8 mice, PSA-NCAM and tenascin C were considered, because their levels are modified under stimulation of the hypothalamo–posthypophyseal system (Singleton and Salm, 1996; Nothias et al., 1997; Langle et al., 2002; Theodosis et al., 2004). NCAM is synthesized and secreted mostly by astrocytes in the SON, and its sialylation degree is considered to be a permissive factor for structural plasticity (Theodosis et al., 1999; Soares et al., 2000). NCAM expression and extracellular localization of PSA-NCAM were greater in Tg8 mice, suggesting a greater capacity for the SON to undergo structural modifications. This ability of Tg8 SON was confirmed by the significant increase in tenascin C expression and in its widespread secretion in the extracellular space. Tenascin C is an antiadhesive protein, which interacts with various ligands in the extracellular matrix, including integrins, glycoprotein F3, and phosphocan (Joester and Faissner, 2001). Increased secretion of tenascin C in the extracellular space of Tg8 mice therefore reduces the adhesive properties of the SON cells locally.

This analysis of astrocytes and the extracellular compartment in Tg8 mice SON demonstrates the importance of monoaminergic afferents in the architecture of the hypothalamo–posthypophyseal complex. Similar modifications were observed in the neurohypophysis: no variation in GFAP expression but a strong increase in PSA-NCAM staining. Tg8 mice have been exposed to an increase in monoamines chronically, so this model is particularly useful because it could reveal exacerbated compensatory mechanisms compared with acute physiological changes. In Tg8 mice, the dopamine levels do not vary, and only the noradrenaline and serotonin levels are greater (Cases et al., 1995). Innervation in the SON is mostly noradrenergic, arising mainly from A1 and A2 nuclei. However, the SON is also moderately innervated by serotonergic neurons, and we have previously shown its importance in the regulation of the expression of AVP and OT (Vacher et al., 2002). Noradrenaline afferents partially terminate within the region of AVP neurons (Boudaba et al., 2003; Swanson et al., 1981), and this may explain why the astrocyte characteristics that we observed, with a slight variation of GFAP, are similar to those observed during dehydration (Salm, 2000). In terms of the signalling pathways, several subtypes of receptors for noradrenaline and serotonin are present in the SON, particularly  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 2, 5HT1A, 5HT1C, and 5HT2 subtypes (Lafarga et al., 1992; Wang et al., 1998; Boudaba et al., 2003; Jørgensen, 2007;

Marvin et al., 2010). These receptors are known to be expressed by astrocytes, so monoamines could thus directly affect astrocytes. For example, serotonin, via 5HT<sub>1A</sub> receptors, is known to control the expression of S100 $\beta$  (Whitaker-Azmitia et al., 1990; Eriksen et al., 2002), tenascin C, or PSA-NCAM (Moiseiwitsch et al., 1998; Brezun and Daszuta, 1999). Moreover, sialylation of NCAM is required for the neurohypophysis plasticity triggered by noradrenaline (Monlezun et al., 2005). Nevertheless, it cannot be excluded that monoamines exert their action indirectly, for example, via the increase in glutamatergic transmission, as has been demonstrated for example for PSA-NCAM expression in the supra-chiasmatic nucleus (Prosser et al., 2003). Nitric oxide may also be involved in astrocyte activation, because astrocytes produce cGMP in response to nitric oxide production (Vacher et al., 2003), and nitric oxide amounts increase during dehydration (Kadekaro et al., 1997) or under noradrenaline stimulation (Grange-Messent et al., 2004; Maalood et al., 2007). Moreover, in the SON astrocytes, nitric oxide increases the expression and activity of MMP2 and MMP9, two enzymes controlling the remodelling of the extracellular matrix, and may thereby contribute to the SON structural arrangement (Maalood et al., 2008).

In conclusion, our findings demonstrate that Tg8 mouse astrocytes exhibit an active status, different from the classical “reactive” status. This state was characterized not by a change in the expression of GFAP but by a significant decrease in vimentin expression and increase in S100 $\beta$  expression. This active status could have functional consequences for the extracellular glutamate level, with the decreased expression of GDH, and on the capacity of the SON to undergo structural remodelling, with the elevated expression of PSA-NCAM and tenascin C. Activation of astrocytes is essential to the physiological response of the hypothalamic–neurohypophysial system, particularly during dehydration (Yuan et al., 2010). It is therefore necessary that activation of hypothalamic neurons and astrocytes is coordinated, and our results reveal that monoamines could play a major role in this coordination.

## REFERENCES

- Armstrong WE. 1995. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol* 47:291–339.
- Barker AJ, Ullian EM. 2010. Astrocytes and synaptic plasticity. *Neuroscientist* 16:40–50.
- Boudaba C, Di S, Tasker JG. 2003. Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol* 15:803–810.
- Brezun JM, Daszuta A. 1999. Serotonin depletion in the adult rat produces differential changes in highly polysialylated form of neural cell adhesion molecule and tenascin-C immunoreactivity. *J Neurosci Res* 55:54–70.
- Bundzikova J, Pirmik Z, Zelena D, Mikkelsen JD, Kiss A. 2009. Alpha2-adrenergic impact on hypothalamic magnocellular oxytocinergic neurons in long evans and brattleboro rats: effects of agonist and antagonists. *Cell Mol Neurobiol* 29:1015–1023.
- Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pourmin S, Müller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC, et al. 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763–1766.
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D’Alimonte I, D’Onofrio M, Nicoletti F, Caciagli F. 1999. Activation of A<sub>1</sub> adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* 27:275–281.
- Correa-Cerro LS, Mandell JW. 2007. Molecular mechanisms of astroglialosis: new approaches with mouse genetics. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:169–176.
- Cunningham JT, Penny ML, Murphy D. 2004. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. *Prog Biophys Mol Biol* 84:183–196.
- Di S, Tasker JG. 2004. Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Endocrinology* 145:5141–5149.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. 2009. S100B’s double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008–1022.
- Eriksen JL, Gillespie R, Druse MJ. 2002. Effects of ethanol and 5-HT<sub>1A</sub> agonists on astroglial S100B. *Brain Res Dev Brain Res* 139:97–105.
- Espallergues J, Solovieva O, Técher V, Bauer K, Alonso G, Vincent A, Hussy N. 2007. Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* 148:712–723.
- Ginsberg SD, Hof PR, Young WG, Morrison JH. 1994. Noradrenergic innervation of vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the macaque monkey: quantitative analysis using double-label immunohistochemistry and confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 341:476–491.
- Grange-Messent V, Raison D, Dugas B, Calas A. 2004. Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J Neurosci Res* 78:683–690.
- Gribkoff VK, Dudek FE. 1988. The effects of the excitatory amino acid antagonist kynurenic acid on synaptic transmission to supraoptic neuroendocrine cells. *Brain Res* 442:152–156.
- Gribkoff VK, Dudek FE. 1990. Effects of excitatory amino acid antagonists on synaptic responses of supraoptic neurons in slices of rat hypothalamus. *J Neurophysiol* 63:60–71.
- Hatton GI. 1997. Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci* 20:375–397.
- Hatton GI. 2002. Glial–neuronal interactions in the mammalian brain. *Adv Physiol Educ* 26:225–237.
- Hertz L. 2006. Glutamate, a neurotransmitter—and so much more. A synopsis of Wierzbica III. *Neurochem Int* 48:416–425.
- Huang W, Lee SL, Arason SS, Sjöquist M. 1996. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol* 270:R427–R433.
- Huang W, Sjöquist M, Skott O, Stricker EM, Sved AF. 2001. Oxytocin antagonist disrupts hypotension-evoked renin secretion and other responses in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R760–R765.
- Israel J, Poulain DA, Oliet SHR. 2010. Glutamatergic inputs contribute to phasic activity in vasopressin neurons. *J Neurosci* 30:1221–1232.
- Joester A, Faissner A. 2001. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* 20:13–22.
- Jørgensen HS. 2007. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull* 54:266–288.
- Kadekaro M, Liu H, Terrell ML, Gestl S, Bui V, Summy-Long JY. 1997. Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol* 273:R1024–R1030.

- Kimelberg HK. 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* 16:79–106.
- Lafarga M, Berciano MT, Del Olmo E, Andres MA, Pazos A. 1992. Osmotic stimulation induces changes in the expression of beta-adrenergic receptors and nuclear volume of astrocytes in supraoptic nucleus of the rat. *Brain Res* 588:311–316.
- Langle SL, Poulain DA, Theodosis DT. 2002. Neuronal–glial remodeling: a structural basis for neuronal–glial interactions in the adult hypothalamus. *J Physiol Paris* 96:169–175.
- Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD. 1996. Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience* 70:963–988.
- Leng G, Moos FC, Armstrong WE. 2010. The adaptive brain: Glenn Hatton and the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 22:318–329.
- Magistretti PJ. 2009. Role of glutamate in neuron–glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 90:875S–880S.
- Maolood N, Grange-Messent V, Raison D, Hardin-Pouzet H. 2007. Noradrenergic regulation in mouse supraoptic nucleus involves a nitric oxide pathway only to regulate arginine-vasopressin expression and not oxytocin expression. *J Neurosci Res* 85:2991–2999.
- Maolood N, Hardin-Pouzet H, Grange-Messent V. 2008. Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are upregulated by noradrenaline in the mouse neuroendocrine hypothalamus. *Eur J Neurosci* 27:1143–1152.
- Marvin E, Scrogin K, Dudás B. 2010. Morphology and distribution of neurons expressing serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat hypothalamus and the surrounding diencephalic and telencephalic areas. *J Chem Neuroanat* 39:235–241.
- Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. 2005. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res* 79:65–73.
- McKenna MC, Stevenson JH, Huang X, Hopkins IB. 2000. Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. *Neurochem Int* 37:229–241.
- Melnikova VI, Raison D, Hardin-Pouzet H, Ugrumov MV, Calas A, Grange-Messent V. 2006. Noradrenergic regulation of galanin expression in the supraoptic nucleus in the rat hypothalamus. An *ex vivo* study. *J Neurosci Res* 83:857–863.
- Moiseiwitsch JR, Raymond JR, Tamir H, Lauder JM. 1998. Regulation by serotonin of tooth-germ morphogenesis and gene expression in mouse mandibular explant cultures. *Arch Oral Biol* 43:789–800.
- Monlezun S, Ouali S, Poulain DA, Theodosis DT. 2005. Polysialic acid is required for active phases of morphological plasticity of neurosecretory axons and their glia. *Mol Cell Neurosci* 29:516–524.
- Nothias F, Vernier P, von Boxberg Y, Mirman S, Vincent JD. 1997. Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo–neurohypophysial system during lactation. *Eur J Neurosci* 9:1553–1565.
- Panatier A, Gentles SJ, Bourque CW, Oliet SHR. 2006. Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol* 573:711–721.
- Parker SL, Crowley WR. 1993. Stimulation of oxytocin release in the lactating rat by a central interaction of alpha 1-adrenergic and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-sensitive excitatory amino acid mechanisms. *Endocrinology* 133:2855–2860.
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427–434.
- Prosser RA, Rutishauser U, Ungers G, Fedorkova L, Glass JD. 2003. Intrinsic role of polysialylated neural cell adhesion molecule in photic phase resetting of the Mammalian circadian clock. *J Neurosci* 23:652–658.
- Rougon G, Dubois C, Buckley N, Magnani JL, Zollinger W. 1986. A monoclonal antibody against meningococcus group B polysaccharides distinguishes embryonic from adult NCAM. *J Cell Biol* 103:2429–2437.
- Salm AK. 2000. Mechanisms of glial retraction in the hypothalamo–neurohypophysial system of the rat. *Exp Physiol* 85:197S–202S.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 257:275–325.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. 1983. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 277:355–360.
- Saydoff JA, Rittenhouse PA, Carnes M, Armstrong J, Van De Kar LD, Brownfield MS. 1996. Neuroendocrine and cardiovascular effects of serotonin: selective role of brain angiotensin on vasopressin. *Am J Physiol* 270:E513–E521.
- Sharman G, Ghorbel M, Leroux M, Beaucourt S, Wong L, Murphy D. 2004. Deciphering the mechanisms of homeostatic plasticity in the hypothalamo–neurohypophysial system—genomic and gene transfer strategies. *Prog Biophys Mol Biol* 84:151–182.
- Singleton PA, Salm AK. 1996. Differential expression of tenascin by astrocytes associated with the supraoptic nucleus (SON) of hydrated and dehydrated adult rats. *J Comp Neurol* 373:186–199.
- Soares S, von Boxberg Y, Ravaille-Veron M, Vincent JD, Nothias F. 2000. Morphofunctional plasticity in the adult hypothalamus induces regulation of polysialic acid–neural cell adhesion molecule through changing activity and expression levels of polysialyltransferases. *J Neurosci* 20:2551–2557.
- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7–35.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Bérød A, Hartman BK, Helle KB, Vanorden DE. 1981. An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 196:271–285.
- Tasker JG, Di S, Boudaba C. 2002. Functional synaptic plasticity in hypothalamic magnocellular neurons. *Prog Brain Res* 139:113–119.
- Theodosis DT, El Majdoubi M, Pierre K, Poulain DA. 1998. Factors governing activity-dependent structural plasticity of the hypothalamo–neurohypophysial system. *Cell Mol Neurobiol* 18:285–298.
- Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA. 1999. Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci* 19:10228–10236.
- Theodosis DT, Piet R, Poulain DA, Oliet SHR. 2004. Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem Int* 45:491–501.
- Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SHR. 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte–neuron interactions. *Physiol Rev* 88:983–1008.
- Tsoporis JN, Marks A, Kahn HJ, Butany JW, Liu PP, O’Hanlon D, Parker TG. 1997. S100beta inhibits alpha1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:31915–31921.
- Vacher C, Frérier P, Créminon C, Calas A, Hardin-Pouzet H. 2002. Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci* 22:1513–1522.
- Vacher CM, Hardin-Pouzet H, Steinbusch HWM, Calas A, De Vente J. 2003. The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur J Neurosci* 17:455–466.
- Vardimon L. 2000. Neuroprotection by glutamine synthetase. *Isr Med Assoc J* 2(Suppl):46–51.

- Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. 2005. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett* 379:75–80.
- Vicentic A, Li Q, Battaglia G, Van de Kar LD. 1998. WAY-100635 inhibits 8-OH-DPAT-stimulated oxytocin, ACTH and corticosterone, but not prolactin secretion. *Eur J Pharmacol* 346:261–266.
- Wang YF, Shibuya I, Kabashima N, Setiadji VS, Isse T, Ueta Y, Yamashita H. 1998. Inhibition of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) by noradrenaline in rat supraoptic neurons through pre-synaptic alpha2-adrenoceptors. *Brain Res* 807:61–69.
- Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. 1990. Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528:155–158.
- Wuarin JP, Dudek FE. 1993. Patch-clamp analysis of spontaneous synaptic currents in supraoptic neuroendocrine cells of the rat hypothalamus. *J Neurosci* 13:2323–2331.
- Yuan H, Gao B, Duan L, Jiang S, Cao R, Xiong Y, Rao Z. 2010. Acute hyperosmotic stimulus-induced Fos expression in neurons depends on activation of astrocytes in the supraoptic nucleus of rats. *J Neurosci Res* 88:1364–1373.

## *Références bibliographiques*

## **Références bibliographiques**

### **A**

Abate, C., Patel, L, Rauscher, F.J.3 Curran, T (1990) Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249:1157-1161.

Adler, M.W. Rogers, T.J (2005) Are chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol* 78:1204-1209.

Akpınar D, Yargıçođlu P, Derin N, Alicigüzel Y, Ađar A (2008) The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Physiol Res* 57: 893-901.

Al-Ghoul, W.M., Meeker, R.B Greenwood, R.S (1997) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in vasopressin and oxytocin neuroendocrine cells. *Brain Res Mol Brain Res* 44:262-272.

Allison SP, Lobo DN. (2004) Fluid and electrolytes in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 7:27-33.

Alonso, G. Assenmacher, I (1981) Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. *Cell Tissue Res* 219:525-534.

Alonso G (1988) Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res* 453: 191-203.

Amaya, F., Tanaka, M, Tamada, Y, Tanaka, Y, Nilaver, G Ibata, Y (1999) The influence of salt loading on vasopressin gene expression in magno- and parvocellular hypothalamic neurons: an immunocytochemical and in situ hybridization analysis. *Neuroscience* 89:515-523.

Antunes-Rodrigues, J., de Castro, M, Elias, L.L.K, Valenęa, M.M McCann, S.M (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84:169-208.

Arima H, Baler R, Aguilera G 2010 Fos proteins are not prerequisite for osmotic induction of vasopressin transcription in supraoptic nucleus of rats. *Neurosci Lett* 486: 5-9.

Armstrong, R.C. Swallow, A.J (1969) Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiat Res* 40:563-579.

Armstrong, W.E. Stern, J.E (1997) Electrophysiological and morphological characteristics of neurons in perinuclear zone of supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 78:2427-2437.

**B**

Babior, B.M. (2002) The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal* 4:35-38.

Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16: 42-47

Baeuerle, P.A. Baltimore, D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20.

Banisadr, G; Skrzydelski, D; Kitabgi, P; Rostène, W; Parsadaniantz, SM (2003) Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur J Neurosci.* 18: 1593-606

Barhoumi, R;Bowen, J A;Stein, L S;Echols, J;Burghardt, R C (1993) Concurrent analysis of intracellular glutathione content and gap junctional intercellular communication. *Cytometry.* 14: 747-56

Barja, G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 31: 347-66

Bashan, N., Kovsan, J, Kachko, I, Ovadia, H Rudich, A (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev* 89:27-71.

Bayir, H., Kochanek, P.M Kagan, V.E (2006) Oxidative stress in immature brain after traumatic brain injury. *Dev Neurosci* 28:420-431.

Bealer, S.L. Crowley, W.R (1998) Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol* 274:E453-8.

Beckman, K.B. Ames, B.N (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581.

Benani, A., Troy, S, Carmona, M.C, Fioramonti, X, Lorsignol, A, Leloup, C, Casteilla, L Pénicaud, L (2007) Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56:152-160.

Bergendi, L., Benes, L, Duracková, Z Ferencik, M (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874.

Beverly, J.L., De Vries, M.G, Bouman, S.D Arseneau, L.M (2001) Noradrenergic and GABAergic systems in the medial hypothalamus are activated during hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R563-9.

Bindokas VP, Jordán J, Lee CC, Miller RJ (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-1336.

Bist R, Bhatt DK (2009) The evaluation of effect of alpha-lipoic acid and vitamin e on the lipid peroxidation, gamma-amino butyric acid and serotonin level in the brain of mice (mus musculus) acutely intoxicated with lindane. *J Neurol Sci* 276: 99-102.

Boudaba, C., Di, S Tasker, J.G (2003) Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol* 15:803-810.

Bourque, C.W., Oliet, S.H, Kirkpatrick, K, Richard, D Fisher, T.E (1993) Extrinsic and intrinsic modulatory mechanisms involved in regulating the electrical activity of supraoptic neurons. *Ann N Y Acad Sci* 689:512-519.

Bourque, C.W., Oliet, S.H Richard, D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15:231-274.

Bourque CW (2008) Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9: 519-531.

Brann, D.W. Mahesh, V.B (1995) Glutamate: a major neuroendocrine excitatory signal mediating steroid effects on gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:325-329.

Bredt, D S;Glatt, C E;Hwang, P M;Fotuhi, M;Dawson, T M;Snyder, S H (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*. 7: 615-24

Bredt, D.S. Snyder, S.H (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.

Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA 2009 NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by nmda receptor activation. *Nat Neurosci* 12: 857-863.

Brigelius-Flohé, R;Traber, M G (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. 13: 1145-55

Brot, N. Weissbach, H (2000) Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers* 55:288-296.

Burrows, C.J. Muller, J.G (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev* 98:1109-1152.

## C

Cadenas, E. Davies, K.J (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.

Cadet, J., Delatour, T, Douki, T, Gasparutto, D, Pouget, J.P, Ravanat, J.L Sauvaigo, S (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424:9-21.

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

Callewaere, C., Banisadr, G, Desarménien, M.G, Mechighel, P, Kitabgi, P, Rostène, W.H Mélik Parsadaniantz, S (2006) The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8221-8226.

Callewaere, C., Fernette, B, Raison, D, Mechighel, P, Burlet, A, Calas, A, Kitabgi, P, Parsadaniantz, S.M Rostène, W (2008) Cellular and subcellular evidence for neuronal interaction between the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL 12 and vasopressin: regulation in the hypothalamo-neurohypophysial system of the Brattleboro rats. *Endocrinology* 149:310-319.

Carrazana, E.J., Pasieka, K.B Majzoub, J.A (1988) The vasopressin mRNA poly(A) tract is unusually long and increases during stimulation of vasopressin gene expression in vivo. *Mol Cell Biol* 8:2267-2274.

Carrière, A., Galinier, A, Fernandez, Y, Carmona, M, Pénicaud, L Casteilla, L (2006) [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris)* 22:47-53.

Cases, O., Seif, I, Grimsby, J, Gaspar, P, Chen, K, Pournin, S, Müller, U, Aguet, M, Babinet, C, Shih, J.C et al. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763-1766.

Cases, O;Vitalis, T;Seif, I;De Maeyer, E;Sotelo, C;Gaspar, P (1996) Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron*. 16: 297-307

Cerruti, P (1985) Prooxidant state and tumor promotion. *Science* 227: 375-381

Chaudière, J. Ferrari-Iliou, R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37:949-962.

Colas S, Mahéo K, Denis F, Goupille C, Hoinard C, Champeroux P, Tranquart F, Bougnoux P. (2006) Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res*. 2:5879-86.

Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. (2006) Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J Neurosci Res*. 3:1584-90.

## D

den Ouden, D.T. Meinders, A.E (2005) Vasopressin: physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: a review. *Neth J Med* 63:4-13.

Daftary, S.S., Boudaba, C, Szabó, K Tasker, J.G (1998) Noradrenergic excitation of magnocellular neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus via intranuclear glutamatergic circuits. *J Neurosci* 18:10619-10628.

Dalton, T P;Shertzer, H G;Puga, A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 67-101

Dawson, T.L., Gores, G.J, Nieminen, A.L, Herman, B Lemasters, J.J (1993) Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 264:C961-7.

Denton, D.A., McKinley, M.J Weisinger, R.S (1996) Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7397-7404.

Di, S. Tasker, J.G (2004) Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Endocrinology* 145:5141-5149.

Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

## E

Edwards, G.L., Cunningham, J.T, Beltz, T.G Johnson, A.K (1989) Neuropeptide Y-immunoreactive cells in the caudal medulla project to the median preoptic nucleus. *Neurosci Lett* 105:19-26.

Egan, G., Silk, T, Zamarripa, F, Williams, J, Federico, P, Cunnington, R, Carabott, L, Blair-West, J, Shade, R, McKinley, M, Farrell, M, Lancaster, J, Jackson, G, Fox, P Denton, D (2003) Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15241-15246.

El Majdoubi, M., Poulain, D.A Theodosis, D.T (1996) The glutamatergic innervation of oxytocin- and vasopressin-secreting neurons in the rat supraoptic nucleus and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 8:1377-1389.

El Majdoubi, M., Poulain, D.A Theodosis, D.T (1997) Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. *Neuroscience* 80:1137-1147.

El Majdoubi, M., Poulain, D.A Theodosis, D.T (2000) Activity-dependent morphological synaptic plasticity in an adult neurosecretory system: magnocellular oxytocin neurons of the hypothalamus. *Biochem Cell Biol* 78:317-327.

## F

Fenelon, V.S., Sieghart, W Herbison, A.E (1995) Cellular localization and differential distribution of GABAA receptor subunit proteins and messenger RNAs within hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* 64:1129-1143.

Fernández-Checa JC, Fernández A, Morales A, Marí M, García-Ruiz C, Colell A 2010 Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9: 439-454.

Filipović D, Pajović SB 2009 Differential regulation of cuznsod expression in rat brain by acute and/or chronic stress. *Cell Mol Neurobiol* 29: 673-681.

Finkel, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett* 476:52-54.

Foote, S L; Bloom, F E; Aston-Jones, G (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev.* 63: 844-914

## G

Gerschman, R., Gilbert, D.L, Nye, S.W, Dwyer, P, Fenn, W.O (1954) Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119:623-626.

Gharbi, N., Mornagui, B, El-Fazaâ, S, Kamoun, A Gharib, C (2004) Effect of dehydration on nitric oxide, corticotropic and vasopressinergic axis in rat. *C R Biol* 327:12-20.

Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L 2009 Antioxidant properties of an endogenous thiol: alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 391-398.

Girouard H, Wang G, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Pickel VM, Iadecola C 2009 NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and nox2. *J Neurosci* 29: 2545-2552.

Goldsmith S.R., Gheorghiadu M. (2005) Vasopressin antagonism in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 46:1785-91.

González-Hernández, Tomás; Afonso-Oramas, Domingo; Cruz-Muros, Ignacio; Barroso-Chinea, Pedro; Abreu, Pedro; del Mar Pérez-Delgado, María; Rancel-Torres, Nélida; del Carmen González, María (2006) Interleukin-6 and nitric oxide synthase expression in the vasopressin and corticotrophin-releasing factor systems of the rat hypothalamus. *J Histochem Cytochem.* 54: 427-41

Grange-Messent, V., Raison, D, Dugas, B Calas, A (2004) Noradrenaline up-regulates the neuronal and the inducible nitric oxide synthase isoforms in magnocellular neurons of rat brain slices. *J Neurosci Res* 78:683-690.

Gribkoff, V.K. (1991) Electrophysiological evidence for N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 131:260-262.

Griendling, K.K. (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 90:491-493.

Gutteridge, J.M. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91:133-140.

## H

Halliwell, B;Gutteridge, J M (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85

Halliwell, B;Gutteridge, J M (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280: 1-8

Halliwell, B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31: 261-72

Hanna, P.M. Mason, R.P (1992) Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch Biochem Biophys* 295:205-213.

Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.

Harman, D. (1993) Free radical involvement in aging. *Pathophysiology and therapeutic implications.* *Drugs Aging* 3:60-80.

Hatton, G.I. (1997) Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci* 20:375-397.

Hatton, G.I. Yang, Q.Z (1994) Incidence of neuronal coupling in supraoptic nuclei of virgin and lactating rats: estimation by neurobiotin and lucifer yellow. *Brain Res* 650:63-69.

Hattori, Y., Shibuya, I, Tanaka, K, Kabashima, N, Ueta, Y Yamashita, H (1998) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor agonist-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in isolated rat supraoptic neurons. *J Neuroendocrinol* 10:383-389.

Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P 2010 Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S453-73.

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

Hirsch, A.T., Majzoub, J.A, Ren, C.J, Scales, K.M Creager, M.A (1993) Contribution of vasopressin to blood pressure regulation during hypovolemic hypotension in humans. *J Appl Physiol* 75:1984-1988.

Ho, Y.S., Magnenat, J.L, Gargano, M Cao, J (1998) The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 5:1219-1228.

Hodak SP, Verbalis JG. (2005) Abnormalities of water homeostasis in aging. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 34:1031-46.

Holmes, C L;Patel, B M;Russell, J A;Walley, K R (2001) Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest.* 120: 989-1002

Holmquist L, Stuchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, Engel J, Münch G. (2007) Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias *Pharmacol Ther.* Jan;113(1):154-64.

Hsu, J.L., Hsieh, Y, Tu, C, O'Connor, D, Nick, H.S Silverman, D.N (1996) Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 271:17687-17691.

Huggins, T.G., Wells-Knecht, M.C, Detorie, N.A, Baynes, J.W Thorpe, S.R (1993) Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *J Biol Chem* 268:12341-12347.

Hussy, N., Deleuze, C, Pantaloni, A, Desarménien, M.G Moos, F (1997) Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502 ( Pt 3):609-621.

Hussy, N. (2002) Glial cells in the hypothalamo-neurohypophysial system: key elements of the regulation of neuronal electrical and secretory activity. *Prog Brain Res* 139:95-112.

## I

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

Indo, H.P., Davidson, M, Yen, H, Suenaga, S, Tomita, K, Nishii, T, Higuchi, M, Koga, Y, Ozawa, T Majima, H.J (2007) Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 7:106-118.

Infanger, D.W., Sharma, R.V Davisson, R.L (2006) NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 8:1583-1596.

## J

Jaillard, T., Roger, M, Galinier, A, Guillou, P, Benani, A, Leloup, C, Casteilla, L, Pénicaud, L Lorsignol, A (2009) Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58:1544-1549.

Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH (2009) Regulation of mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by stat3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29: 7003-7014.

**K**

Kadokaro, M., Liu, H, Terrell, M.L, Gestl, S, Bui, V Summy-Long, J.Y (1997) Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol* 273:R1024-30.

Kadokaro, M. Summy-Long, J.Y (2000) Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:450-459.

Kadokaro, M. (2004) Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Braz J Med Biol Res* 37:441-450.

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

Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W (2009) Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 24: 3012-3020.

Kang KP, Kim DH, Jung YJ, Lee AS, Lee S, Lee SY, Jang KY, Sung MJ, Park SK, Kim W. (2009) Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by suppressing renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 24:3012-20.

Kannan, H., Yagi, K Sawaki, Y (1981) Pontine neurones: electrophysiological evidence of mediating carotid baroreceptor inputs to supraoptic neurones in rats. *Exp Brain Res* 42:362-370.

Kehrer, J.P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23:21-48.

Kishida, K.T. Klann, E (2007) Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9:233-244.

Kishida, K.T., Pao, M, Holland, S.M Klann, E (2005) NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1. *J Neurochem* 94:299-306.

Knapp, L.T. Klann, E (2002) Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory?. *J Neurosci Res* 70:1-7.

Knigge, U., Willems, E, Kjaer, A, Jørgensen, H Warberg, J (1999) Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 140:3713-3719.

Knowles, R.G. Moncada, S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298 ( Pt 2):249-258.

Ko, T.P., Safo, M.K, Musayev, F.N, Di Salvo, M.L, Wang, C, Wu, S.H Abraham, D.J (2000) Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56:241-245.

Kombian, S.B., Zidichouski, J.A Pittman, Q.J (1996) GABAB receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro. *J Neurophysiol* 76:1166-1179.

Krinsky, N I (2001) Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*. 17: 815-7

Kröncke, K.D., Suschek, C.V Kolb-Bachofen, V (2000) Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* 2:585-605.

Kuppusamy, P. Zweier, J.L (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264:9880-9884.

Kwong, L.K. Sohal, R.S (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 350:118-126.

## L

Landry, M., Trembleau, A, Arai, R Calas, A (1991) Evidence for a colocalization of oxytocin mRNA and galanin in magnocellular hypothalamic neurons: a study combining in situ hybridization and immunohistochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 10:91-95.

Lebrand, C;Cases, O;Adelbrecht, C;Doye, A;Alvarez, C;El Mestikawy, S;Seif, I;Gaspar, P (1996) Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron*. 17: 823-35

Le Douarin, N. (1980) Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol* 16:31-85.

Lee, E.Y., Lee, C, Lee, K, Park, J.Y, Cho, K, Cho, Y.S, Lee, H.R, Moon, S.H, Moon, H Yoo, B (2007) Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen-induced arthritis and protects against bone destruction in mice. *Rheumatol Int* 27:225-233.

Lee, KY; Chung, K; Chung, JM (2010) Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol*. 103: 382-91

Lee Y., Naseem Haris R., Park B.-H., Garry D. J., Richardson J.A., Schaffer J.E., Unger R.H. (2006) Alpha-lipoic acid prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA-synthase transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 344:446-52.

Leloup, C., Magnan, C, Benani, A, Bonnet, E, Alquier, T, Offer, G, Carriere, A, Périquet, A, Fernandez, Y, Ktorza, A, Casteilla, L Pénicaud, L (2006) Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55:2084-2090.

Leloup C, Casteilla L, Carrière A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Pénicaud L (2011) Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519-530.

Liu, H., Terrell, M.L, Bui, V, Summy-Long, J.Y Kadekaro, M (1998) Nitric oxide control of drinking, vasopressin and oxytocin release and blood pressure in dehydrated rats. *Physiol Behav* 63:763-769.

Liu, H., Terrell, M.L, Summy-Long, J.Y Kadekaro, M (1996) Drinking and blood pressure responses to central injection of L-NAME in conscious rats. *Physiol Behav* 59:1137-1145.

Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN (1996) Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and dna in the brain of rats. *FASEB J* 10: 1532-1538.

Lowenstein, C.J. Snyder, S.H (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70:705-707.

Luckman, S.M. Bicknell, R.J (1990) Morphological plasticity that occurs in the neurohypophysis following activation of the magnocellular neurosecretory system can be mimicked in vitro by beta-adrenergic stimulation. *Neuroscience* 39:701-709.

## M

MacFarlane PM, Mitchell GS (2008) Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience* 152: 189-197.

Maczurek A, Hager K, Kenklies M, Sharman M, Martins R, Engel J, Carlson DA, Münch G (2008) Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1463-1470.

Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24: 420-429.

Mancuso A, Sacchetta S, Saletti PC, Tronconi C, Milesi L, Garassino M, Martelli O, Leone A, Zivi A, Cerbone L, Recine F, Sollami R, Labianca R, Cavalli F, Sternberg CN (2010) Clinical and molecular determinants of survival in pancreatic cancer patients treated with second-line chemotherapy: results of an italian/swiss multicenter survey. *Anticancer Res* 30: 4289-4295.

Maalood, N., Grange-Messent, V, Raison, D Hardin-Pouzet, H (2007) Noradrenergic regulation in mouse supraoptic nucleus involves a nitric oxide pathway only to regulate arginine-vasopressin expression and not oxytocin expression. *J Neurosci Res* 85:2991-2999.

Marzban, F., Tweedle, C.D Hatton, G.I (1992) Reevaluation of the plasticity in the rat supraoptic nucleus after chronic dehydration using immunogold for oxytocin and vasopressin at the ultrastructural level. *Brain Res Bull* 28:757-766.

Masella, R., Di Benedetto, R, Vari, R, Filesi, C Giovannini, C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16:577-586.

Mason, W.T. (1980) Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature* 287:154-157.

McEwen BS, Wingfield JC 2003 The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15.

Meeker, R.B., Swanson, D.J, Greenwood, R.S Hayward, J.N (1993) Quantitative mapping of glutamate presynaptic terminals in the supraoptic nucleus and surrounding hypothalamus. *Brain Res* 600:112-122.

Meeker, R.B., McGinnis, S, Greenwood, R.S Hayward, J.N (1994) Increased hypothalamic glutamate receptors induced by water deprivation. *Neuroendocrinology* 60:477-485.

Melnikova, V.I., Raison, D, Hardin-Pouzet, H, Ugrumov, M.V, Calas, A Grange-Messent, V (2006) Noradrenergic regulation of galanin expression in the supraoptic nucleus in the rat hypothalamus. An ex vivo study. *J Neurosci Res* 83:857-863.

Meneton, P., Ichikawa, I, Inagami, T Schnermann, J (2000) Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F339-51.

Michaloudi, H C;el Majdoubi, M;Poulain, D A;Papadopoulos, G C;Theodosis, D T (1997) The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *J Neuroendocrinol.* 9: 17-23

Miyata, S., Matsushima, O Hatton, G.I (1997) Taurine in rat posterior pituitary: localization in astrocytes and selective release by hypoosmotic stimulation. *J Comp Neurol* 381:513-523.

Miyata, S., Nakashima, T Kiyohara, T (1994) Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett* 175:63-66.

Moncada, S. Higgs, A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.

Moos, F.C. (1995) GABA-induced facilitation of the periodic bursting activity of oxytocin neurones in suckled rats. *J Physiol* 488 ( Pt 1):103-114.

Morel, Y. Barouki, R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 Pt 3:481-496.

Muller, F.L., Lustgarten, M.S, Jang, Y, Richardson, A Van Remmen, H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 43:477-503.

## N

Nelson, R J;Kriegsfeld, L J;Dawson, V L;Dawson, T M (1997) Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behaviour. *Front Neuroendocrinol.* 18: 463-91

## O

Ohashi, Naro;Katsurada, Akemi;Miyata, Kayoko;Satou, Ryoussuke;Saito, Toshie;Urushihara, Maki;Kobori, Hiroyuki (2009) Activation of reactive oxygen species and the renin-angiotensin system in IgA nephropathy model mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36: 509-15

Oliet, S.H. Bourque, C.W (1993) Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 364:341-343.

Oliet, S.H.R. Piet, R (2004) Anatomical remodelling of the supraoptic nucleus: changes in synaptic and extrasynaptic transmission. *J Neuroendocrinol* 16:303-307.

Ozaki, Y., Nomura, M, Saito, J, Luedke, C.E, Muglia, L.J, Matsumoto, T, Ogawa, S, Ueta, Y Pfaff, D.W (2004) Expression of the arginine vasopressin gene in response to salt loading in oxytocin gene knockout mice. *J Neuroendocrinol* 16:39-44.

## P

Packer L, Roy S, Sen CK (1997) Alpha-lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol* 38:79–101

Panatier, A., Gentles, S.J, Bourque, C.W Oliet, S.H.R (2006) Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol* 573:711-721.

Pande, V. Ramos, M.J (2005) NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr Med Chem* 12:357-374.

Penny, M.L; Bruno, S.B; Cornelius, J.; Higgs, K.A.N; Cunningham, J.T (2005) The effects of osmotic stimulation and water availability on c-Fos and FosB staining in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Exp Neurol* 194: 191-202

Pirnik Z, Mravec B, Kiss A (2004) Fos protein expression in mouse hypothalamic paraventricular (pvn) and supraoptic (son) nuclei upon osmotic stimulus: colocalization with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Neurochem Int* 45: 597-607.

Popova, N K;Vishnivetskaya, G B;Ivanova, E A;Skrinskaya, J A;Seif, I (2000) Altered behavior and alcohol tolerance in transgenic mice lacking MAO A: a comparison with effects of MAO A inhibitor clorgyline. *Pharmacol Biochem Behav.* 67: 719-27

Poulain, D.A. Wakerley, J.B (1982) Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808.

Przedborski, S.; Jackson-Lewis, V.; Vila, M.; Wu, Du C.; Teismann, P.; Tieu, K.; Choi, D-K; Cohen, O. (2003) Free radical and nitric oxide toxicity in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91: 83-94

## R

Randle, J C;Day, T A;Jhamandas, J H;Bourque, C W;Renaud, L P (1986) Neuropharmacology of supraoptic nucleus neurons: norepinephrine and gamma-aminobutyric acid receptors. *Fed Proc.* 45: 2312-7

Renaud, L.P. Bourque, C.W (1991) Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Prog Neurobiol* 36:131-169.

Robert FR, Léon-Henri BP, Chapleur-Chateau MM, Girr MN, Burlet AJ (1985) Comparison of three immunoassays in the screening and characterization of monoclonal antibodies against arginine-vasopressin. *J Neuroimmunol* 9: 205-220.

Robert, J. Clauser, E.R (2005) [Vasopressin receptors: structure/function relationships and signal transduction in target cells]. *J Soc Biol* 199:351-359.

Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M, Pardo, C.A, Bristol, L.A, Jin, L, Kuncl, R.W, Kanai, Y, Hediger, M.A, Wang, Y, Schielke, J.P Welty, D.F (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.

## S

Saper, C.B. Levisohn, D (1983) Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res* 288:21-31.

Sawchenko, P.E. Swanson, L.W (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218:121-144.

Schapira, A H;Gu, M;Taanman, J W;Tabrizi, S J;Seaton, T;Cleeter, M;Cooper, J M (1998) Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44: S89-98

Scharrer E at Scharrer B (1940) Secretory cells within the hypothalamus. In : *The hypothalamus and central levels of autonomic function.* Williams and Wilkins Eds, Baltimore, p 170-174

Schrader, L.A. Tasker, J.G (1997) Modulation of multiple potassium currents by metabotropic glutamate receptors in neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. *J Neurophysiol* 78:3428-3437.

Schreibelt, G., Musters, R.J.P, Reijerkerk, A, de Groot, L.R, van der Pol, S.M.A, Hendriks, E.M.L, Döpp, E.D, Dijkstra, C.D, Drukarch, B de Vries, H.E (2006) Lipoic acid affects cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity. *J Immunol* 177:2630-2637.

Sherman, T G;Civelli, O;Douglass, J;Herbert, E;Watson, S J (1986) Coordinate expression of hypothalamic pro-dynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. *Neuroendocrinology*. 44: 222-8

Sherman, T.G., McKelvy, J.F Watson, S.J (1986) Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a northern and in situ hybridization analysis. *J Neurosci* 6:1685-1694.

Shiromani, P.J., Magner, M, Winston, S Charness, M.E (1995) Time course of phosphorylated CREB and Fos-like immunoreactivity in the hypothalamic supraoptic nucleus after salt loading. *Brain Res Mol Brain Res* 29:163-171.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C, de Andrade, A, Santos, M, Hagen, M, Bello-Klein, A Netto, C.A (2005) Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci* 23:663-671.

Sohal, R.S. Weindruch, R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273:59-63.

Souza, H.P., Laurindo, F.R, Ziegelstein, R.C, Berlowitz, C.O Zweier, J.L (2001) Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H658-67.

Srisawat, R., Ludwig, M, Bull, P.M, Douglas, A.J, Russell, J.A Leng, G (2000) Nitric oxide and the oxytocin system in pregnancy. *J Neurosci* 20:6721-6727.

Stern, J.E., Hestrin, S Armstrong, W.E (2000) Enhanced neurotransmitter release at glutamatergic synapses on oxytocin neurones during lactation in the rat. *J Physiol* 526 Pt 1:109-114.

Storz, P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 10: 1881-96

Summy-Long, J.Y., Bui, V, Mantz, S, Koehler, E, Weisz, J Kadekaro, M (1993) Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. *Neurosci Lett* 152:190-193.

Sun, C.;Sellers, K.W.; Sumners, C; Raizada, M.K. (2005) NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res*. 96: 659-66

## T

Takahashi, A., Ishimaru, H, Ikarashi, Y, Kishi, E Maruyama, Y (1997) Hypothalamic cholinergic activity and 2-deoxyglucose-induced hyperglycemia. *Brain Res Bull* 43:65-68.

Takahashi, A., Ishimaru, H, Ikarashi, Y, Kishi, E Maruyama, Y (2001) Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Res* 909:102-111.

Takaoka, M. Ohkita, M., Kobayashi, Y., Yuba, M.,; Matsumura, Y. (2002) Protective effect of alpha-lipoic acid against ischaemic acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:189-194

Tasker, J.G., Di, S Boudaba, C (2002) Functional synaptic plasticity in hypothalamic magnocellular neurons. *Prog Brain Res* 139:113-119.

Thannickal, V.J. Fanburg, B.L (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-28.

Theulier, D., Moos, F, Richard, P Stoeckel, M.E (1994) Evidence for connections between a discrete hypothalamic dorsochiasmatic area and the supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res Bull* 34:261-274.

Theodosis, D.T. Poulain, D.A (1993) Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501-535.

Theodosis, D.T. (2002) Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 23:101-135

Theodosis, D.T., Piet, R, Poulain, D.A Oliet, S.H.R (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem Int* 45:491-501.

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

Thiels, E., Urban, N.N, Gonzalez-Burgos, G.R, Kanterewicz, B.I, Barrionuevo, G, Chu, C.T, Oury, T.D Klann, E (2000) Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci* 20:7631-7639.

Tribollet, E., Armstrong, W.E, Dubois-Dauphin, M Dreifuss, J.J (1985) Extra-hypothalamic afferent inputs to the supraoptic nucleus area of the rat as determined by retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience* 15:135-148.

Turrens, J.F. Boveris, A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427.

## U

Upton, A L;Salichon, N;Lebrand, C;Ravary, A;Blakely, R;Seif, I;Gaspar, P (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J Neurosci.* 19: 7007-24

Urano, A., Hyodo, S Suzuki, M (1992) Molecular evolution of neurohypophysial hormone precursors. *Prog Brain Res* 92:39-46.

Ursini, F., Maiorino, M, Brigelius-Flohé, R, Aumann, K.D, Roveri, A, Schomburg, D Flohé, L (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252:38-53.

## V

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

van den Pol, A.N., Wuarin, J.P Dudek, F.E (1990) Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276-1278.

Vacher, C., Frétier, P, Créminon, C, Calas, A Hardin-Pouzet, H (2002) Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J Neurosci* 22:1513-1522.

Vacher, C.M., Hardin-Pouzet, H, Steinbusch, H.W.M, Calas, A De Vente, J (2003) The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. *Eur J Neurosci* 17:455-466.

Valko, M., Leibfritz, D, Moncol, J, Cronin, M.T.D, Mazur, M Telser, J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

Van Tol, H.H., Voorhuis, D.T Burbach, J.P (1987) Oxytocin gene expression in discrete hypothalamic magnocellular cell groups is stimulated by prolonged salt loading. *Endocrinology* 120:71-76.

Ventura, R.R., Gomes, D.A, Reis, W.L, Elias, L.L.K, Castro, M, Valença, M.M, Carnio, E.C, Rettori, V, McCann, S.M Antunes-Rodrigues, J (2002) Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz J Med Biol Res* 35:1101-1109.

Ventura RR, Giusti-Paiva A, Gomes DA, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J (2005) Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett* 379: 75-80.

Verbalis, J.G., Mangione, M.P Stricker, E.M (1991) Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* 128:1317-1322.

Vitalis, T;Cases, O;Callebert, J;Launay, J M;Price, D J;Seif, I;Gaspar, P (1998) Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. *J Comp Neurol.* 393: 169-84

Vogt, W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 18:93-105.

Voisin, D.L., Herbison, A.E Poulain, D.A (1995) Central inhibitory effects of muscimol and bicuculline on the milk ejection reflex in the anaesthetized rat. *J Physiol* 483 ( Pt 1):211-224.

## W

Wang J, Tsirka SE 2005 Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 36: 613-618.

Wang, K., Guldenaar, S.E McCabe, J.T (1997) Fos and Jun expression in rat supraoptic nucleus neurons after acute vs. repeated osmotic stimulation. *Brain Res* 746:117-125.

Wang, Y.F., Shibuya, I, Kabashima, N, Setiadji, V.S, Isse, T, Ueta, Y Yamashita, H (1998) Inhibition of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSC) by noradrenaline in rat supraoptic neurons through presynaptic alpha2-adrenoceptors. *Brain Res* 807:61-69.

Willoughby, J.O., Jervois, P.M, Menadue, M.F Blessing, W.W (1987) Noradrenaline, by activation of alpha-1-adrenoceptors in the region of the supraoptic nucleus, causes secretion of vasopressin in the unanaesthetized rat. *Neuroendocrinology* 45:219-226.

Wilson, J.X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-1163.

Windle, R.J., Luckman, S.M, Stoughton, R.P Forsling, M.L (1996) The effect of pinealectomy on osmotically stimulated vasopressin and oxytocin release and Fos protein production within the hypothalamus of the rat. *J Neuroendocrinol* 8:747-753.

## Y

Yang, Z;Seif, I;Armstrong-James, M (2001) Differences in somatosensory processing in S1 barrel cortex between normal and monoamine oxidase A knockout (Tg8) adult mice. *Cereb Cortex*. 11: 26-36

## Z

Zardetto-Smith, A.M. Gray, T.S (1987) A direct neural projection from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Neurosci Lett* 80:163-166.

Zhang, H.Y. (2005). One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 579 : 5260-5264

Zhang, Z. Bourque, C.W (2003) Osmometry in osmosensory neurons. *Nat Neurosci* 6:1021-1022.

Zhao, M., Wimmer, A, Trieu, K, Discipio, R.G Schraufstatter, I.U (2004) Arrestin regulates MAPK activation and prevents NADPH oxidase-dependent death of cells expressing CXCR2. *J Biol Chem* 279:49259-49267.

## Résumé

Parmi les différentes fonctions du système hypothalamo-neurohypophysaire, il est notamment mis en jeu dans les voies de contrôle de l'osmolalité plasmatique et il est en particulier stimulé lors d'une déshydratation de l'organisme. Ce système reçoit des afférences provenant de la périphérie, telles que celles issues du sinus carotidien, mais aussi des informations intrinsèques au système nerveux central (SNC) en provenance de certains organes circumventriculaires. Le système de contrôle de l'osmorégulation passe par ces structures et des informations telles que l'osmolalité plasmatique peuvent être rapidement intégrées pour adapter le niveau de libération de l'arginine-vasopressine (AVP), hormone anti-diurétique qui contrôle la réabsorption de l'eau au niveau du néphron. Le noyau supraoptique (NSO), où siègent les neurones magnocellulaires synthétisant l'AVP, reçoit donc de nombreuses afférences qui modulent son activité, telles que des afférences impliquant la noradrénaline (NA), majoritaires, ainsi que des afférences aminocidergiques qui libèrent le glutamate, l'aspartate et le GABA. Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de régulation de l'expression et de libération d'AVP par les afférences noradrénergiques. L'effet de la noradrénaline passe par une voie nitreurgique (NO) pour le contrôle de l'expression de l'AVP (Grange-Messent et al, 2004). Par ailleurs, les travaux de S. Mélik-Parsadaniantz et de son équipe ont démontré que l'expression des chimiokines, notamment la chimiokine SDF1 ainsi que son récepteur CXCR4, augmentait au cours de la déshydratation (Callewaere et al., 2006). La démonstration de la présence de chimiokines dans les neurones magnocellulaires et de leur implication au cours de la déshydratation ainsi que les résultats que nous avons obtenus sur le NO suggèrent que les médiateurs inflammatoires sont des molécules de signalisation endogènes qui participent à la chaîne de signalisation mise en jeu lors de l'osmorégulation. L'objectif de la thèse est de s'intéresser au métabolisme oxydatif dans les noyaux magnocellulaires puisque, dans les processus de plasticité post-lésionnels, les modifications de l'expression des médiateurs inflammatoires sont accompagnées de modifications de ce métabolisme et de la production de radicaux libres qualifiés d'espèces réactives de l'oxygène (EROs).

Notre modèle d'étude est la souris C3H/HeJ adulte soumise à une hyperosmolarité plasmatique. Ce paradigme est connu pour stimuler l'axe osmorégulateur et pour causer une augmentation de l'AVP sans provoquer de stress. Dans le cas d'une stimulation hyperosmolaire chronique, les résultats obtenus montrent que lors de l'activation de l'axe osmorégulateur, démontrée par l'expression de la protéine c-Fos, la synthèse d'AVP est accompagnée d'une production d'EROs, prise en charge par la superoxyde dismutase de type 2 (SOD 2) et la catalase. Les mesures de l'osmolalité plasmatique montrent que la réponse osmorégulatrice exercée par l'AVP se met en place progressivement et qu'après 8 jours de stimulation osmotique, le système retourne au niveau contrôle montrant un nouvel équilibre allostatique. Dans le cas d'une stimulation hyperosmolaire aiguë, les EROs sont produits dès la phase précoce de l'hyperosmolarité démontrée par l'expression de c-Fos, et sont pris en charge par la SOD 2 et la catalase. De plus, cette production d'EROs est indispensable à l'augmentation de synthèse d'AVP en réponse à une hyperosmolarité plasmatique, puisqu'en présence d'un antioxydant, l'acide  $\alpha$ -lipoïque (AAL) administré avant la stimulation osmotique, il y a une inhibition de la synthèse *de novo* d'AVP.

La deuxième partie de ma thèse cherche à déterminer la place des EROs dans le contrôle exercé par les afférences noradrénergiques via le monoxyde d'azote (NO). Les résultats obtenus montrent que les souris transgéniques Tg8, qui présentent des taux élevés en NA dans le SNC, ont des niveaux de production d'EROs dans le NSO plus élevés que leurs contrôles non transgéniques, les souris C3H/HeJ, donnant une indication que la voie noradrénergique est impliquée *in vivo*. Afin de confirmer la place des EROs dans la voie de signalisation noradrénergique, nous avons analysé *ex vivo* l'effet de la NA sur des tranches d'hypothalamus maintenues en survie. Ceci nous a permis également de préciser plus avant les contributions respectives du NO et des EROs dans la voie de régulation noradrénergique de l'expression de l'AVP.

Ces résultats démontrent pour la première fois l'importance des EROs comme signaux endogènes dans la voie de régulation osmotique. Il permet de faire émerger un rôle nouveau et original des EROs en tant que médiateurs physiologiques des voies de signalisation intracellulaires.

**Mots clés :** espèces réactives de l'oxygène, noyau supraoptique, arginine-vasopressine, osmorégulation, superoxyde dismutase, catalase, noradrénaline, monoxyde d'azote