



HAL
open science

Vasopressine et contrôle hydrique : contribution de la jonction neuroendocrine-vasculaire neurohypophysaire

Cassandre Bignaud

► **To cite this version:**

Cassandre Bignaud. Vasopressine et contrôle hydrique : contribution de la jonction neuroendocrine-vasculaire neurohypophysaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT064 . tel-04088025

HAL Id: tel-04088025

<https://theses.hal.science/tel-04088025v1>

Submitted on 3 May 2023

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En **PHYSIOLOGIE**

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé CBS2

Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle

Vasopressine et contrôle hydrique : contribution de la jonction neuroendocrine-vasculaire neurohypophysaire

Présentée par **Cassandra Bignaud**
Le 30 Novembre 2022

Sous la direction de **Patrice MOLLARD**

Devant le jury composé de

Sylvain RICHARD, DR, PhyMedExp, Montpellier

Anne DUITTOZ, Pr, INRAE Val de Loire, Tours

Tatiana FIORDELISIO, Pr, UNAM, Mexico

Bernard MOUILLAC, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Patrice MOLLARD, DR, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier

Président

Rapporteuse

Rapporteuse

Invité

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

*« On ne va jamais aussi loin que
Lorsqu'on ne sait pas où on va »*
Christophe Colomb

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir pris le temps de lire et de juger mon travail. Sylvain Richard pour être président de mon jury et de m'avoir suivi pendant les deux comités de suivi de thèse. Anne Duittoz, pour ses qualités de rapportrice de ma thèse. Tatiana Fiordelasio, pour les mêmes raisons. Bernard Mouillac, de m'avoir suivi pendant les comités de suivi de thèse mais également pour le travail que nous avons fait ensemble et l'aide que tu m'as apporté.

Je souhaite également remercier Patrice Mollard pour avoir accepté de me suivre pendant ces trois longues années. Je n'aurais pas encore eu le recul ni l'avancée que j'ai fait sur moi-même sans ça.

Je souhaite remercier mon équipe et particulièrement Chrystel pour m'avoir guidée dans mes manip, pour m'avoir aidée dans mes longues et pénibles analyses et pour les moments sympas passés ensemble. Merci également à Hélène Orcel, pour m'avoir appris de nouvelles techniques et m'avoir suivi pour une partie de ma thèse.

Je souhaite remercier le COVID, pour m'avoir empêché de voyager et de profiter de collaboration lors de ma thèse.

Je souhaite remercier ma famille, ma mère, mon père, ma belle-mère, mes grands-parents et mes deux sœurs pour m'avoir soutenu tout au long de ce périple. Vous avez tous, chacun à votre manière, pris le temps de m'orienter dans mes doutes et dans les décisions que j'ai dû prendre. Vous m'avez fait voir la vie d'une autre manière au moment où j'en avais le plus besoin et sans ça, je pense que je n'écrirais pas ces remerciements aujourd'hui.

Je souhaite remercier Roxane, pour m'avoir soutenue pendant 2 ans et m'avoir fait prendre conscience qu'on vit sa vie pour soi et qu'il est important de vivre le moment présent. Merci également à Antoine et Laurence qui m'ont offert un endroit sympa pour écrire cette thèse et pour l'ouverture spirituelle qui me permet aujourd'hui de commencer à voir le monde autrement.

Je souhaite également remercier tous mes amis, et je sais que j'en oublierai certains. Merci à Margaux et Léa, pour être présentes depuis maintenant 18 ans. Même si la distance nous sépare depuis maintenant de nombreuses années, je sais que je pourrais toujours compter sur vous, que ce soit dans les bons comme dans les mauvais moments.

Merci aux trois zigottos, Vincent, Florent et Maxime, que j'ai rencontré en licence et avec qui j'ai passé de merveilleux moments. Vincent pour avoir passé de nombreuses heures à m'écouter et à m'aider comme tu pouvais, pour me faire comprendre aussi que si on le souhaite, on peut réussir. Flo et Max, parce que vous êtes insupportables mais c'est pour ça que je vous aime aussi.

Merci à celles que j'ai rencontré en Master, Pola, Eloïse, Morgane, Lucie. Pola parce que tu es la personne la plus gentille que je connaisse et que tu as toujours trouvé les bons mots. Eloïse, si tu n'étais plus perdue, je ne sais pas ce que je ferais. Morgane, pour tous les bons moments que j'ai passé avec toi. Lucie, parce qu'on a vécu beaucoup de choses et pour toutes nos conversations.

Merci à celles que j'ai rencontré pendant mes stages, Juri et Clémentine. Juri, parce que je sais que je peux compter sur toi peu importe la situation. Clem, pour tous les moments passés à refaire le monde et à se perdre sur un coup de tête dans un escape game.

Un grand merci à toi Alex pour avoir pris le temps de corriger ma thèse, tes petites blagues n'ont rendu cette correction que plus qu'agréable. Tu seras récompensée comme il se le doit !

Je souhaite également remercier ceux que j'oublie, ceux qui ont été importants à un moment de ma vie, ceux qui ont croisé mon chemin que ce soit le temps d'attendre un bus, un train, le temps d'un chemin, le temps d'un verre, le temps d'une soirée, le temps d'un moment, le temps d'une année, le temps de plusieurs années, le temps d'une vie. Si vous avez croisé ma route, que ce soit ici ou ailleurs, vous avez tous contribué à votre manière à m'épanouir et à me forger. Je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui si je ne vous avais jamais rencontré. Et s'il y a une chose que je sais, c'est que peu importe si nos chemins se séparent, vous resterez à jamais avec moi. Comme le dit le proverbe Touareg : "*Le voyage c'est aller de soi à soi en passant par les autres*"

Merci.

Résumé

L'axe hypothalamo-hypophysaire est composé de deux structures du cerveau, l'hypothalamus et l'hypophyse, reliées par la tige pituitaire. Cet axe possède un rôle majeur physiologique puisqu'il va permettre la libération d'hormones dans l'organisme et réguler des processus tels que la croissance, le développement, la reproduction ou encore le maintien homéostatique du corps. L'hypophyse est constituée de deux parties majeures distinctes : l'adénohypophyse et la neurohypophyse. La première possède des cellules endocrines qui vont permettre la libération d'hormones sous le contrôle de neurones parvocellulaires hypothalamiques tandis que la seconde va recevoir directement les terminaisons neuronales des neurones magnocellulaires hypothalamiques, permettant la sécrétion de deux neurohormones : l'ocytocine et la vasopressine. L'ocytocine sécrétée va jouer un rôle lors de la parturition, dans la production et l'éjection de lait ou encore lors d'un choc osmotique hypertonique. Quant à la vasopressine, ses deux rôles majeurs sont la réabsorption de l'eau au niveau du canal collecteur des reins et la vasoconstriction lors d'une déshydratation.

La circulation sanguine est en lien direct avec l'axe hypothalamo-hypophysaire et va jouer un rôle majeur dans la capture et la distribution des hormones dans l'organisme. En effet, il existe deux plexus de réseaux denses de capillaires fenêtrés au niveau de la face externe de l'éminence médiane et du parenchyme adénohypophysaire connectés par les vaisseaux de la tige hypophysaire. De plus, au niveau de la neurohypophyse, on retrouve un plexus de capillaires fenêtrés qui vont former, avec les terminaisons neuronales, une jonction neuro-hémale, permettant ainsi la capture des neurohormones afin de les déverser dans la circulation systémique.

Ma thèse a consisté à appréhender de manière générale le lien entre un système neuroendocrinien et le système vasculaire fenêtré au sein de la neurohypophyse sur un modèle de mammifère murin. En effet, j'ai cherché à savoir si et comment la sécrétion d'une hormone neurohypophysaire, comme la vasopressine, s'accompagnait de modifications au niveau de la microcirculation. J'ai donc cherché à étudier trois différents points au sein de cette jonction neuro-hémale. Premièrement, j'ai étudié l'activité basale des terminaisons à vasopressine et si la vasopressine exerçait un effet local sur ces terminaisons. Deuxièmement, j'ai étudié si une stimulation des neurones à vasopressine, par une déshydratation, avait la capacité de moduler le flux sanguin neurohypophysaire et si, des péricytes – cellules murales contractiles – intervenaient dans cette régulation du débit sanguin. Troisièmement, j'ai entrepris de

développer un biosenseur fluorescent sensible à la vasopressine permettant de suivre en temps réel la sécrétion de vasopressine.

Mes résultats ont montré que l'activité des terminaisons à vasopressine dans la neurohypophyse était modulée par la vasopressine elle-même, créant un rétrocontrôle positif médié par le récepteur à la vasopressine V1a et le récepteur à l'ocytocine. De plus, lors d'une déshydratation, bien qu'il n'y ait pas de différence dans la vitesse du flux des capillaires fenêtrés neurohypophysaire de manière globale, des différences au sein des vaisseaux pris indépendamment ont été détectées. Certains avaient leur vitesse ralentie tandis que d'autres avaient leur vitesse augmentée, le tout en ayant un flux moyen stable au sein du réseau de capillaires dans la neurohypophyse. Ces changements de vitesse étaient probablement médiés par des péricytes puisque, lors d'une stimulation de vasopressine, l'activité calcique de ces cellules augmentait, suggérant leur contraction et possiblement une vasoconstriction des capillaires. Quant au biosenseur développé, celui-ci a permis de détecter en temps réel la vasopressine *in vitro*, et ce dans une gamme de concentrations de neurohormones compatibles avec les valeurs estimées *in vivo* dans la neurohypophyse.

Abstract

The hypothalamus-pituitary axis consists of two brain structures, the hypothalamus and the pituitary gland, connected by the pituitary stalk. This axis has a major physiological role since it allows the release of hormones in the body and regulates processes such as growth, development, reproduction and body homeostasis.

The pituitary gland consists of two distinct major parts: the adenohypophysis and the neurohypophysis. The former possesses networks of endocrine cells that allow the release of hormones under the control of hypothalamic parvocellular neurons, while the latter directly receives neuronal terminals from hypothalamic magnocellular neurons, allowing the secretion of two neurohormones: oxytocin and vasopressin. The secreted oxytocin will play a role during parturition, in the production and ejection of milk or during a hypertonic osmotic shock. Regarding vasopressin, its two major roles are water reabsorption in kidney collecting ducts and vasoconstriction during dehydration.

Bloodstream is directly linked to the hypothalamic-pituitary axis and plays a major role in the capture and distribution of hormones in the body. Indeed, there are two plexuses of dense networks of fenestrated capillaries at the level of the external face of the median eminence and the adenohypophyseal parenchyma connected by the vessels of the pituitary stalk. In addition, at the level of the neurohypophysis, there is a plexus of fenestrated capillaries which, together with hypothalamic neuronal endings, form neurohemal junctions, thus allowing the capture of neurohormones to release them into the systemic circulation.

My thesis consisted in exploring the link between a neuroendocrine system and the fenestrated vascular system within the neurohypophysis in mouse models. I studied whether the secretion of a neurohypophyseal hormone, vasopressin, leads to changes in the neurohypophyseal microcirculation. To do so, I focused on three features of this neuro-hemal junction. Firstly, I studied the basal activity of the vasopressin terminals both *in vivo* and *ex vivo*, and whether vasopressin has a local effect on these terminals. Secondly, I investigated whether stimulation of vasopressin neurons by dehydration has the capability to modulate neurohypophyseal capillary blood flow and whether pericytes - contractile mural cells - are involved in this blood flow regulation. Thirdly, I developed a fluorescent vasopressin-sensitive biosensor to monitor vasopressin levels in real time.

My results unveiled that the activity of vasopressin terminals in the neurohypophysis was modulated by vasopressin itself, due to a positive feedback control mediated by both vasopressin V1a and oxytocin receptors. During dehydration, although there was no difference in the overall velocity of neurohypophyseal fenestrated capillaries, there were differences within individual capillaries. Some vessels displayed decreases in red blood cell (RBC) velocities while others showed RBC velocity increases, thus leading to a stable average flow within the capillary network in the neurohypophysis. These changes in RBC velocities were most likely mediated by pericytes since upon stimulation with vasopressin, cytosolic calcium increased in pericytes, indicating their contraction and possibly vasoconstriction of the capillaries. Our developed biosensor allowed real-time detection of vasopressin *in vitro*, thus within a range of neurohormone concentrations compatible with the values estimated *in vivo* in the neurohypophysis.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Table des illustrations	12
Liste des abréviations	16
Introduction	20
I. Le système hypothalamo-hypophysaire	21
A. Description de l'axe	21
1. L'hypothalamus : chef d'orchestre endocrinien	21
2. Histoire de l'hypophyse	22
3. L'hypophyse : glande endocrine	24
a) Adénohypophyse	25
b) La pars intermedia	25
c) La neurohypophyse	25
4. L'axe hypothalamo-hypophysaire : un système conservé	27
B. L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulateur de la réponse osmotique	29
1. L'ocytocine	29
a) Structure et synthèse	29
b) Récepteur de l'ocytocine	29
c) Facteurs de régulation et fonctions physiologiques de l'ocytocine	30
2. La Vasopressine	30
a) Structure et synthèse	31
b) Récepteurs sensibles à la vasopressine	32
c) Facteurs de régulation et de sécrétion de la vasopressine	33
d) Fonctions physiologiques de la vasopressine	34

(1) La réabsorption de l'eau	34
(2) La vasoconstriction	34
(3) La régulation corticotrope	35
(4) Régulation des rythmes circadiens	35
(5) Activité des neurones à vasopressine lors d'une réponse osmotique	35
C. L'axe hypothalamo-hypophysaire : une vascularisation particulière	37
1. Généralités	37
2. Le système vasculaire neurohypophysaire	39
3. Les péricytes	41
a) Morphologie.....	41
b) Contractibilité et régulation du flux sanguin.....	43
II. Techniques d'étude de la neurohypophyse.....	45
A. Etude des zones profondes du cerveau <i>in-vivo</i> : GRIN Lenses	46
B. Enregistrement de l'activité calcique	48
1. Indicateurs génétiquement modifiés	48
a) Le calcium.....	48
b) Les indicateurs de calcium génétiquement encodés	48
c) Les protéines fluorescentes	49
d) Les GCaMP.....	50
e) Approche virale.....	51
2. Souris transgéniques	52
C. Le flux sanguin	54
D. Suivi des neuropeptides : biosenseurs	56
III. Hypothèses et objectifs	58
IV. Resultats.....	61
A. Article	62
B. Senseur sensible à la vasopressine : V2R-cpFP	85

1. Matériels et méthodes	85
a) Création du gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine.....	85
b) Création d'un plasmide AAV contenant le gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine.....	87
(1) Transformations bactériennes	87
(a) Transformation bactérienne de pEX-V2R-cpGFP dans des bactéries DH5 α	87
(b) Transformation bactérienne de pAAV-CAG-V2R-cpGFP dans des bactéries NEB Stable.....	88
(c) Clivage des ADN plasmidiques pAAV-CAG-GFP et pEX-V2R-cpGFP ..	89
(d) Ligation du vecteur pAAV-CAG et de l'insert V2R-cpGFP	90
(2) Détection de la sécrétion de vasopressine in-vitro	91
(a) Culture cellulaire de HEK293 et transfection	91
(b) Observation de la détection de vasopressine <i>in-vitro</i>	91
(3) Analyse et statistiques	93
2. Resultats.....	94
a) Développement du biosenseur sensible à la vasopressine	94
b) Caractérisation du senseur sensible à la vasopressine	95
c) Essais d'expression du biosenseur sensible à la vasopressine dans la neurohypophyse	97
V. Discussion.....	99
Neurones à vasopressine : de l'hypothalamus à la neurohypophyse	100
La vasopressine : régulateur de la dynamique de son microenvironnement vasculaire au sein de la neurohypophyse	102
Biosenseur : Rapporteur de sécrétion.....	103
Perspectives cliniques : le diabète insipide	106
VI. Bibliographie	108

Table des illustrations

Figure 1 : Axe hypothalamo-hypophysaire. Connexions neurohémales entre l'hypothalamus et la neurohypophyse. (Extrait de Anatomy and Physiology, Benjamin Cummings, 2008)	22
Figure 2 : Anatomie de l'hypophyse, de l'infundibulum hypothalamique, du chiasma et de la selle turcique. Gravures extraites du septième livre de la première édition du De humani corporis fabrica, Vésale, 1543.....	23
Figure 3 : Représentation schématique de l'hypophyse de souris constituée de ces trois parties : l'adénohypophyse (pd), la pars intermedia (pi) et la neurohypophyse (pn), reposant sur l'os sphénoïde (sb) (Extrait de Hoa et al., 2019).....	24
Figure 4 : Illustration schématique de la localisation des organes circumventriculaires sensoriels et sécrétoires dans le cerveau adulte murin. OVLT : Organe vasculaire de la lame terminale. SFO : Organe subfornical. AP : Area postrema. ME : Eminence médiane. NH : Neurohypophyse. (Extrait de Miyata, 2015).....	27
Figure 5 : Schéma de la Pré-pro-vasopressine et de ses produits sécrétés. (Extrait de Kanbay et al., 2019).....	31
Figure 6 : Lieu d'expression, voies de signalisation et actions physiologiques des récepteurs vasopressinergiques. DAG : diacylglycérol. IP3 : inositol triphosphate. AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique. ACTH : hormone adrénocorticotropine. (Extrait de Robert and Clauser, 2005)	33
Figure 7 : Schéma représentant une partie des mécanismes mis en place lors d'une déshydratation. (Extrait de Thornton et Norgren, 2016).....	34
Figure 8 : Représentation de la décharge phasique des terminaisons à vasopressine. (Extrait de Leng et al., 2008).....	36

Figure 9 : Schéma représentant un capillaire fenêtré.	38
Figure 10 : Schéma représentant les connections neurovasculaire hypothalamo-hypophysaire par une sécrétion locale d'ocytocine. CaDI : division caudale de la carotide interne. CrDI : division crânienne de l'artère carotide interne. OA : Artère optique. PHS : Sinus primaire de la tête. PLA : Artère palatocérébral. (Extrait de Gutnick et al., 2011).....	39
Figure 11 : Représentation schématique du développement d'un capillaire fenêtré par la régulation des pituicytes. (Extrait de Anbalagan et al., 2018)	40
Figure 12 : Représentation des relations cellulaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique. P : péricytes. E : Cellule endothéliale. BM : lame basale. A : pieds astrocytaires. (Extrait de Allt et Lawrenson, 2001).....	42
Figure 13 : Schéma représentant les différentes morphologies des péricytes sur les capillaires. Extrait de (Dore-duffy, 2008).....	43
Figure 14 : Schéma représentatif du chemin de réfraction de la lumière dans une GRIN lens (adaptée de GRINtech).....	46
Figure 15 : Représentation du miniscope et de la condition tête-fixée pour l'imagerie in-vivo	47
Figure 16 : Représentation des indicateurs de calcium génétiquement encodés. (A) FRET : La liaison du calcium permet d'approcher le donneur et l'accepteur pour induire le FRET. (B) GECI à un fluorophore : La liaison du calcium à l'indicateur fluorescent va changer sa conformation et conduire à une augmentation de la fluorescence émise. CaM : Calmoduline. (Extrait de Oh et al., 2019).....	50

Figure 17 : Réponses des différentes sondes GCaMP pour 1 (gauche) ou 3 (droite) potentiels d'action. (Extrait de Zhang et al., 2021) 51

Figure 18 : Gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine. Bleu : enzymes de restriction. Rose : Séquence Kosak. Jaune : Récepteur V2Rh. Gris : Linker. Vert : cpGFP ... 86

Figure 19 : Schéma représentant le protocole de perfusion d'AVP sur les cellules HEK pour une concentration d'AVP. t=0 : départ d'AVP. t=4min30 : arrivée d'AVP dans la chambre de perfusion. t=6min : Chambre remplie d'AVP. T=10min : départ du milieu KREBS. t=16min : Chambre remplie de Milieu KREBS. T=20min : fin d'acquisition. 92

Figure 20 : Schéma représentant le protocole de perfusion d'AVP sur les cellules HEK pour différentes concentrations d'AVP. T=0 : départ d'AVP 1nM. T=4min30 : arrivée d'AVP dans la chambre de perfusion. T=6min : Chambre remplie d'AVP. T=10min : départ de 10nM AVP. T=16min : Chambre remplie 10nM AVP. T=20min : départ 100nM AVP. T=26min : Chambre remplie 100nM AVP. T=30 min : départ 1µM AVP. T=36min : chambre remplie 1µM AVP. T=40 min : départ milieu KREBS. T=50 min : fin d'acquisition. 93

Figure 21 : Construction du biosenseur. A. Site d'insertion de la cpGFP dans le récepteur V2Rh. B. Schéma représentant le vecteur viral du biosenseur, avant et après insertion de la construction V2R-cpGFP 94

Figure 22 : Caractérisation du senseur AVP. A. Expression et réponse du senseur V2R-cpGFP à la membrane des cellules HEK en condition basal (milieu KREBS), avec application de 1nM à 1µM d'AVP et après rinçage. B. Réponse d'intensité de fluorescence des cellules HEK lors d'une perfusion de différentes concentrations d'AVP. C. Réponse d'intensité de fluorescence moyenne des cellules HEK. D. Profil de réponse d'intensité de fluorescence de 6 cellules lors d'une perfusion d'AVP. E. Réponse d'intensité de fluorescence des cellules lors d'une perfusion à 10nM ou 1µM d'AVP, (n= 434 cellules ; p < 0.0001, t-test)..... 96

Figure 23 : Expression du senseur dans la neurohypophyse. A. Image représentant une hypophyse entière. Le site d'injection du senseur V2R-cpGFP est présent dans la neurohypophyse (délimité en pointillé rouge). B. Infection de la neurohypophyse avec le senseur V2R-cpGFP dilué au 1/10°. C. Réponse d'intensité de fluorescence F/F0 lors d'une stimulation d'1µM d'AVP sur hypophyse entière. 98

Figure 24 : Schéma récapitulatif de l'action de l'AVP et d'acteurs du microenvironnement de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire lors d'une demande hydrique avec un focus sur la jonction neuro-hémale neurohypophysaire. Adapté de Roy et al., 2021 ; Anbagalan et al., 2018 ; Chen et al., 2020 et de mes travaux de thèse. 107

Liste des abréviations

A

AAV	Adenovirus associés
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
alpha-SMA	Actine des muscles lisses alpha
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP	Area postrema
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine Vasopressine
AVPI	Arginine-vasotocine

C

CAG	Chicken beta actin
Cp	Circulairement permutée
cPGFP	Protéine fluorescente verte circulairement permutée
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
CRF	Corticolibérine
CVO	Organe circumventriculaire

D

DAG	1,2 diacylglycérol
-----	--------------------

F

FRET	Förster Resonance Energy Transfer
FSCV	Fast-scan cyclic voltometry

G

GABA	Acide g-aminobutyrique
GECI	Indicateurs de calcium génétiquement encodé
GFP	Protéine fluorescente verte
GRIN	Lentille à gradient d'indice

H

HEK	Lignée cellulaire issue de rein embryonnaire humain
-----	---

I

ICL3	Troisième boucle intracellulaire (ICL3)
IP3	Inositol 1,4,5 trisphosphate

K

kDA	Kilo Dalton
-----	-------------

L

LB Milieu Luria-Bertani

M

ME Eminence médiane

N

NaCl Chlorure de sodium

NH Neurohypophyse

NSO Noyau supra-optique

O

OT Ocytocine

OTI Isotocine

OTR Récepteur à l'ocytocine

OVLTO Organe vasculaire de la lame terminale

P

pH Potentiel hydrogène

PVN Noyau Paraventriculaire

S

SFO Organe subfornical

V

V1 Vasopressine 1

V2 Vasopressine 2

V2Rh Récepteur humain de la vasopressine 2

W

WPRE Elément régulateur post-transcriptionnel du virus de l'hépatite

Woodchuck

WT Wild-type

Introduction

I. Le système hypothalamo-hypophysaire

A. Description de l'axe

Le système hypothalamo-hypophysaire comporte deux structures majeures du cerveau, l'hypothalamus et l'hypophyse, reliées par la tige pituitaire ou infundibulum. Ce système endocrinien, qui va permettre la libération d'hormone dans l'organisme, est finement contrôlé et va permettre des processus tels que la croissance, le développement, la reproduction, ou encore le maintien homéostasique du corps.

1. L'hypothalamus : chef d'orchestre endocrinien

L'hypothalamus est une structure cérébrale située dans le diencephale, sous le thalamus et au-dessus de l'hypophyse. Il est organisé en plusieurs noyaux, ce qui va lui permettre d'être impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques vitaux tels que la prise de nourriture, la reproduction, la régulation de la balance osmotique et bien d'autres. Bien qu'il ait été décrit anatomiquement dès le XVI^{ème} siècle par Vésale, il faudra attendre Ernst et Berta Scharer en 1936, deux physiologistes allemands, pour en comprendre ses fonctions (Scharer and Scharer, 1936).

L'hypothalamus des vertébrés est divisé en trois grandes régions : la région périventriculaire, mamillaire et tubérale. La région périventriculaire contient des noyaux parvocellulaires, localisés antérieurement au chiasma optique et des noyaux magnocellulaires, plus postérieurs. Les noyaux magnocellulaires sont le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau supraoptique (NSO) et le noyau neurosécrétoire magnocellulaire accessoire. Ces noyaux vont former un complexe neurosécrétoire (Braak and Braak, 1987). En effet, ils sont le lieu de synthèse de deux neurohormones, l'arginine vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT). Ces hormones sont ensuite transportées vers la neurohypophyse par le tractus hypothalamo-hypophysaire dans la tige pituitaire. Ce tractus est composé des axones des neurones hypothalamiques et leurs terminaisons neurosécrétrices vont permettre le relargage des neurohormones dans les capillaires sanguins neurohypophysaires afin qu'elles puissent effectuer leurs fonctions.

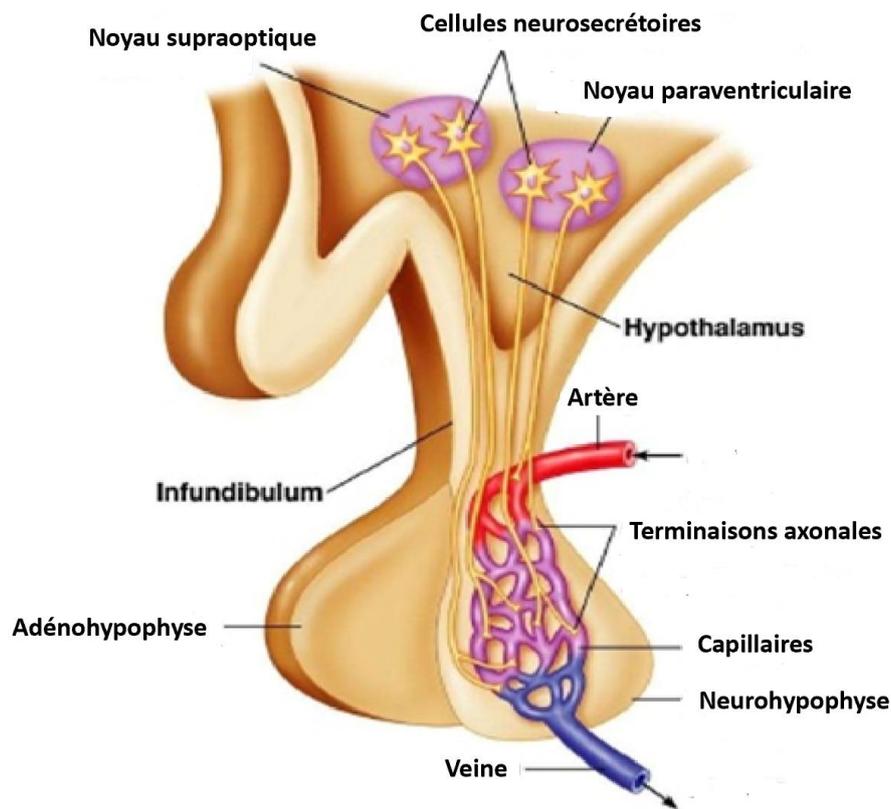


Figure 1 : Axe hypothalamo-hypophysaire. Connexions neurohémales entre l'hypothalamus et la neurohypophyse. (Extrait de *Anatomy and Physiology*, Benjamin Cummings, 2008)

2. Histoire de l'hypophyse

L'hypophyse ou glande pituitaire est une structure endocrine majeure. Malgré son rôle physiologique important, cet organe a longtemps été ignoré ou mal compris par les physiologistes des siècles passés.

L'hypophyse provient du grec *υποφυσις*, *hypofusis*, « excroissance par-dessous », dérivé de *hypo*, « en dessous » et *fusis* « formation, processus ». L'adjectif pituitaire vient quant à lui du latin *pituita*, « mucus, humeur, gomme, pus, sanie ». Ces étymologies proviennent des croyances des fonctions de la glande hypophysaire ayant persisté jusqu'au XIX^{ème} siècle.

Claude Galien (130-201), grand médecin de l'Antiquité greco-romaine dont les travaux ont influencé le monde médical pendant de nombreux siècles, est l'un des premiers à décrire de

manière précise l'anatomie de l'hypophyse au sein de la selle turcique et son réseau vasculaire qu'il nomme *rete mirabile*. Suivant les pensées d'Hippocrate de Kos (460-377 av JC), qui localise l'intelligence dans le cerveau car il reçoit en premier le souffle inspiratoire (pneuma), et d'Aristote (384-322 av JC), pour qui le cœur est le centre de l'intelligence et des émotions tandis que le cerveau et ses subdivisions ne servent que d'organe de refroidissement, Galien théorise que l'âme siège au sein de la substance cérébrale et anime le corps à travers les nerfs via le pneuma animal (Rocca 1997). Cependant, pour lui, l'hypophyse ne possède qu'un rôle de conduit servant à évacuer l'excès de mucosité vers les fosses nasales.

A la renaissance, André Vésale (1514-1564), décrit l'hypophyse et son anatomie de manière très précise dans son traité *De humani corporis fabrica* (1543), dans lequel on trouve les plus vieilles représentations de l'hypophyse.

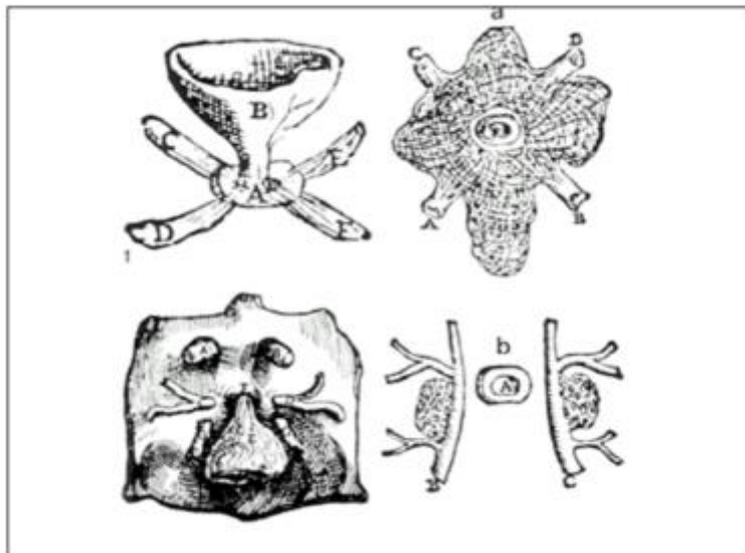


Figure 2 : Anatomie de l'hypophyse, de l'infundibulum hypothalamique, du chiasma et de la selle turcique. Gravures extraites du septième livre de la première édition du *De humani corporis fabrica*, Vésale, 1543.

Il faudra attendre le 18^{ème} siècle pour qu'un philosophe et scientifique suédois, Emanuel Swedenborg (1688-1772), décrive le rôle de l'hypophyse dans le maintien des fonctions physiologiques (Jedidi *et al.*, 2014).

A la fin du XIX^{ème} siècle, Pierre Marie (1853-1940) montre l'importance de l'hypophyse d'un point de vue physiopathologique en se basant sur l'observation de deux cas cliniques d'acromégalie, associant la maladie avec l'hypertrophie de la glande pituitaire (Kaplan 2007).

C'est au XX^{ème} siècle, en 1902 précisément, qu'apparaît la notion de système endocrinien. En effet William Bayliss (1860-1924) et Ernest Starling (1866-1927) découvrent qu'une réponse physiologique peut être induite à distance, sans stimulation nerveuse directe en constatant que l'injection veineuse d'extraits de muqueuse intestinale pouvait stimuler la sécrétion pancréatique chez le chien (Kaplan 2007). En 1905, le mot hormone provenant du grec *ορμαιεν*, *hormaien*, « exciter » est proposé pour la première fois. Lors de la première moitié de ce siècle, le rôle de l'hypophyse comme glande endocrine commence à être de mieux en mieux comprise, notamment grâce aux travaux de Williams Harvey Cushing (1869-1939) sur l'hormone de croissance (Kaplan 2007).

3. L'hypophyse : glande endocrine

La glande pituitaire, ou hypophyse, est située sous l'hypothalamus et repose au niveau de la selle turcique de l'os sphénoïde. Il s'agit d'une glande endocrine puisqu'elle va sécréter différentes hormones dans la circulation sanguine. L'hypophyse est constituée de trois parties distinctes : la *pars distalis* (ou adénohypophyse), la *pars intermedia* et la *pars nervosa* (ou neurohypophyse).

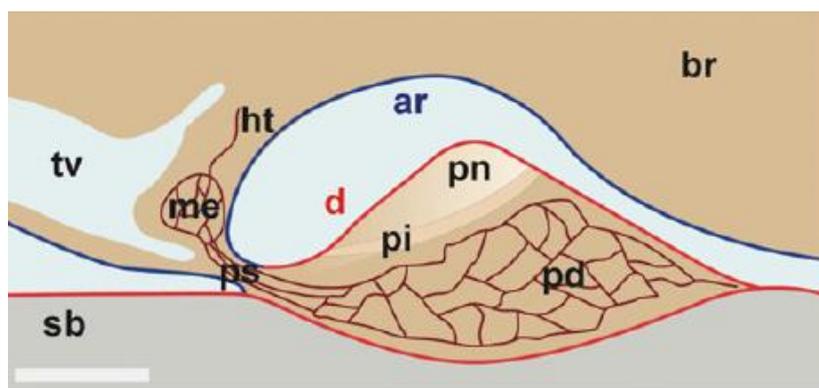


Figure 3 : Représentation schématique de l'hypophyse de souris constituée de ces trois parties : l'adénohypophyse (pd), la *pars intermedia* (pi) et la neurohypophyse (pn), reposant sur l'os sphénoïde (sb) (Extrait de Hoa *et al.*, 2019)

a) Adénohypophyse

L'adénohypophyse constitue la plus grande partie de la glande pituitaire. Elle contient un large réseau de capillaires ainsi que des cellules endocrines. Ces cellules endocrines sont multiples et vont être stimulées par des hormones hypothalamiques hypophysiotropes, secrétées par des neurones parvocellulaires hypothalamiques au niveau de l'éminence médiane. L'éminence médiane est située dans la tige pituitaire et appartient au système porte hypothalamo-hypophysaire. Ce système vasculaire particulier, permet d'acheminer les hormones hypothalamiques, secrétées dans l'espace périvasculaire des capillaires fenêtrés de l'éminence médiane, à l'adénohypophyse où elles vont pouvoir exercer un rôle inhibiteur ou excitateur sur les cellules endocrines de l'hypophyse (Cummins, 1982). Le produit de sécrétion de ces cellules est ensuite relargué dans les capillaires de l'hypophyse puis dans la circulation sanguine générale où les hormones libérées vont pouvoir mener leurs différentes actions : réguler la fonction d'organes à distance de l'hypophyse. Parmi les hormones adénohypophysaires on retrouve la prolactine (Prl) – rôle dans la lactation – (Grattan, 2015), l'hormone lutéinisante (LH) – rôle dans les fonctions reproductrices – (Antunes *et al.*, 1978), l'hormone folliculo-stimulante (FSH) – rôle dans les fonctions reproductrices – (Padmanabhan *et al.*, 1997), l'hormone de croissance (GH) – rôle dans la croissance – (Kostyo, 1999), l'hormone thyroïdostimuline (TRH) – rôle sur le développement d'organes et sur le métabolisme – (Koenig *et al.*, 1996) et l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) – rôle dans le stress (Varga, 1979).

b) *La pars intermedia*

La pars intermedia est une zone de l'hypophyse qui appartient à l'adénohypophyse. Cette zone contient l'hormone stimulant les mélanocytes, qui provoque la synthèse de mélanine, permettant la pigmentation de la peau. Elle est peu développée chez les mammifères, vestigiale chez l'Homme, mais elle joue un rôle majeur de protection chez les poissons ou amphibiens, leur conférant des capacités de camouflage (Baker, 1981).

c) La neurohypophyse

La neurohypophyse (NH) est localisée sur la partie postérieure de l'hypophyse. Elle contient principalement les terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires provenant du PVN et du NSO de l'hypothalamus. Ces neurones vont libérer deux neurohormones, l'ocytocine (OT) et l'arginine vasopressine (AVP) dans la circulation sanguine (Swaab *et al.*, 1975). En effet,

une jonction neuro-hémale est établie entre les terminaisons neuronales et les capillaires fenêtrés de la neurohypophyse, permettant ainsi de conduire les deux hormones vers leurs lieux d'action respectifs.

Contrairement aux deux autres parties de l'hypophyse, la neurohypophyse ne possède pas la capacité de synthétiser des hormones (Burford *et al.* 1974). Cependant, elle possède un rôle endocrinien important puisqu'elle va servir de lieu de sécrétion des hormones neuro-sécrétoires du PVN et du NSO de l'hypothalamus avant d'acheminer l'OT et l'AVP par la circulation systémique dans leurs tissus cibles.

La neurohypophyse est un organe circumventriculaire (CVO) tout comme l'éminence médiane (ME), la glande pinéale, l'organe subfornical (SFO), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), l'*area postrema* ou centre du vomissement (AP). Ces structures sont toutes situées proches des ventricules cérébraux (Hofer, 1958). Ces organes sont classés en deux catégories : les organes circumventriculaires sensoriels et sécrétoires. Dans la première, on retrouve le SFO, l'OVLT et l'AP. Ces structures vont permettre de transmettre des informations provenant du sang et du liquide céphalo-rachidien aux autres structures cérébrales (Johnson and Gross, 1993 ; Sisó *et al.*, 2010). La deuxième catégorie, qui contient la NH, la ME et la glande pinéale vont quant à elles relarguer des hormones neuronales dans la circulation sanguine (Miyata *et al.*, 2001 ; Miyata and Hatton, 2002 ; Ciofi *et al.*, 2009).

Les organes circumventriculaires présentent une vascularisation particulière. En effet, leurs capillaires sont fenêtrés et possèdent de larges espaces périvasculaires (Weindl, 1973 ; Gross and Weindl, 1987). Il a également été montré que dans les CVO sécrétoires, notamment dans la NH, la perméabilité vasculaire est plus élevée, principalement pour les molécules de faibles poids moléculaire (Morita and Miyata, 2012). Cette particularité s'explique par l'action sécrétrice d'hormones hypothalamiques dans la circulation sanguine.

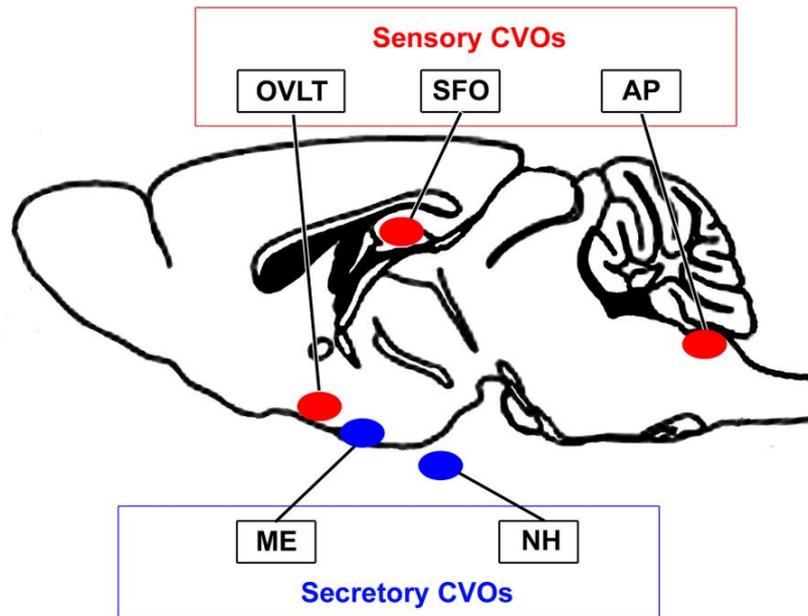


Figure 4 : Illustration schématique de la localisation des organes circumventriculaires sensoriels et sécrétoires dans le cerveau adulte murin. OVLT : Organe vasculaire de la lame terminale. SFO : Organe subfornical. AP : Area postrema. ME : Eminence médiane. NH : Neurohypophyse. (Extrait de Miyata, 2015)

La neurohypophyse possède également des cellules gliales, des cellules immunitaires du système nerveux, particulières appelées pituicytes. Les pituicytes vont former des contacts directs avec les terminaisons neuronales des neurones sécrétoires hypothalamiques. Ils ont également des interactions avec les terminaisons et les capillaires lors d'une réponse osmotique (Hatton *et al.*, 1984 ; Wittkowski and Brinkmann, 1974), suggérant un rôle facilitateur de ces cellules dans le relargage des neurohormones (Theodosis *et al.*, 2008).

4. L'axe hypothalamo-hypophysaire : un système conservé

Le système hypothalamo-hypophysaire est conservé, pour la neurohypophyse, anatomiquement et au niveau des activités chez tous les vertébrés. En effet, il a été montré que les neurones hypothalamiques sécrètent l'OT et l'AVP dans la neurohypophyse chez tous les modèles de mammifères et de poissons (Bargmann, 1949 ; Harris, 1948 ; Scharrer, 1927). De plus, l'activité de ces neuropeptides est conservée. Chez les mammifères, l'AVP va réguler l'homéostasie hydrique en augmentant la perméabilité du tube collecteur du rein. Chez les poissons, l'Arginine-vasotocine ou AVP-like (AVPl) va réguler la balance hydrique en jouant sur la filtration du rein (Macfarlane, 1974 ; Amer and Brown, 1995 ; Peter and Fryer, 1983). De même,

l'OT chez les mammifères va réguler la parturition et l'éjection du lait en contractant les cellules musculaires lisses de l'utérus et les cellules myoépithéliales des canaux mammaires. Chez les poissons, l'isotocine ou OT-like (OTI) va réguler la contraction des cellules musculaires lisses de l'ovaire et de l'oviducte lors de la parturition ou de la ponte des poissons (Pointe, 1977 ; Peter and Fryer, 1983).

B. L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulateur de la réponse osmotique

L'hypothalamus est considéré comme le centre régulateur du maintien de l'homéostasie, notamment des différents fluides du corps. En effet, les neurones magnocellulaires du PVN et du SON de l'hypothalamus vont projeter leurs axones dans la neurohypophyse et sécréter deux neurohormones, l'AVP et l'OT. Il a été montré en 1982, par Poulain et Wakerley, qu'une stimulation osmotique, comme la déshydratation, est en capacité d'activer à la fois les neurones à vasopressine et les neurones à ocytocine (Poulain and Wakerley, 1982).

1. L'ocytocine

a) Structure et synthèse

L'ocytocine est un neuropeptide de 9 acides aminés dont la structure peptidique est très semblable à celle de la vasopressine puisqu'elle ne diffère que de deux acides aminés (Du Vigneaud, 1953). L'OT est produite à partir d'une pré-pro-hormone contenant un peptide signal, l'OT et la neurophysine I. Après des étapes de modifications post-traductionnelles et de maturation dans des granules de sécrétion appelés vésicules à cœurs denses, le peptide signal est clivé, donnant la pro-hormone contenant l'OT et la neurophysine I. Après des clivages protéolytiques, l'OT et la neurophysine I sont dissociées pour former deux peptides distincts. La neurophysine I et l'OT, une fois créées sont stockées dans les terminaisons au sein des neurones magnocellulaires de la neurohypophyse où elles seront par la suite sécrétées après dépolarisation membranaire (Burbach *et al.*, 2001; Lipschitz *et al.*, 2005).

b) Récepteur de l'ocytocine

Les nombreuses fonctions de l'ocytocine sont prises en charge par un unique récepteur : le récepteur à l'ocytocine OTR. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Barberis *et al.*, 1998). Ce récepteur n'est pas spécifique à l'ocytocine puisqu'il présente également une affinité à la vasopressine (Kiss and Mikkelsen, 2005). L'OTR est présent dans l'utérus, les glandes mammaires, les reins, le cœur, le pancréas, et dans quelques structures du système nerveux central (Kimura *et al.*, 1994 ; Rozen *et al.*, 1995 ; Yoshimura, 1993).

c) Facteurs de régulation et fonctions physiologiques de l'ocytocine

La parturition et la lactation sont les facteurs les plus importants favorisant la sécrétion de l'OT. En effet, il a été montré que pendant la grossesse, l'OT, à l'aide des prostaglandines, va permettre la contraction des cellules du myomètre (Sanborn *et al.* 2005). L'augmentation de la production de prostaglandine au moment de la parturition va conduire à l'inactivation de la progestérone entraînant ainsi une augmentation de l'expression des OTR dans l'utérus, ce qui induit la contraction des cellules du myomètre. Ces contractions sont perçues par le système noradrénergique qui, en projetant vers les neurones ocytocinergiques va permettre la libération d'OT (Douglas, 2001).

Lors de la lactation, les mécanorécepteurs présents sur le téton vont activer la libération d'OT. La prolactine va déclencher la production de lait et l'OT va induire la contraction des cellules épithéliales de la glande mammaire pour permettre l'éjection du lait (Leng *et al.*, 2005).

L'OT joue également un rôle important lors d'une stimulation osmotique. En effet, lors de la natriurèse, l'OT est retrouvée en grande quantité dans le plasma chez le rat. De plus, lors d'une prise de boisson salée (2% NaCl), on retrouve une augmentation des ARNm codant pour l'OT dans les neurones magnocellulaires ocytocinergiques, qui peut être corrélé avec la quantité d'OT plasmatique (Ozaki *et al.*, 2004). Elle joue donc un rôle majeur, en action avec la vasopressine, à un retour à l'homéostasie en cas de choc osmotique hypertonique en excréant le sodium au niveau des reins (Verbalis *et al.*, 1991).

L'ocytocine joue également un rôle dans le comportement maternel, social, le stress, les émotions, et la mémoire (Ludwig and Leng, 2006).

2. La Vasopressine

a) Structure et synthèse

La vasopressine est un neuropeptide de 9 acides aminés, dont les cystéines sont reliées par un pont disulfure (Du Vigneaud, 1953). Elle est produite à partir d'une pré-pro-hormone contenant un peptide signal, l'AVP, la neurophysine II et un glycopeptide, la copeptine. Suite à des modifications post-traductionnelles et des étapes de maturation dans des vésicules à cœurs denses, le peptide signal est clivé, donnant ainsi la séquence de la pro-hormone. Des clivages protéolytiques interviennent ensuite, donnant naissance à trois peptides : l'AVP, la neurophysine II et le glycopeptide. L'AVP et la neurophysine II sont ensuite transportées via les vésicules vers la neurohypophyse où elles seront stockées dans les terminaisons neuronales. Le rôle du glycopeptide libéré reste encore inconnu (Poulain et Jard, 1995). Le contenu des vésicules à cœur denses est sécrété sous l'effet de potentiel d'action, à proximité de canaux calciques (Robinson and Martin, 1998).

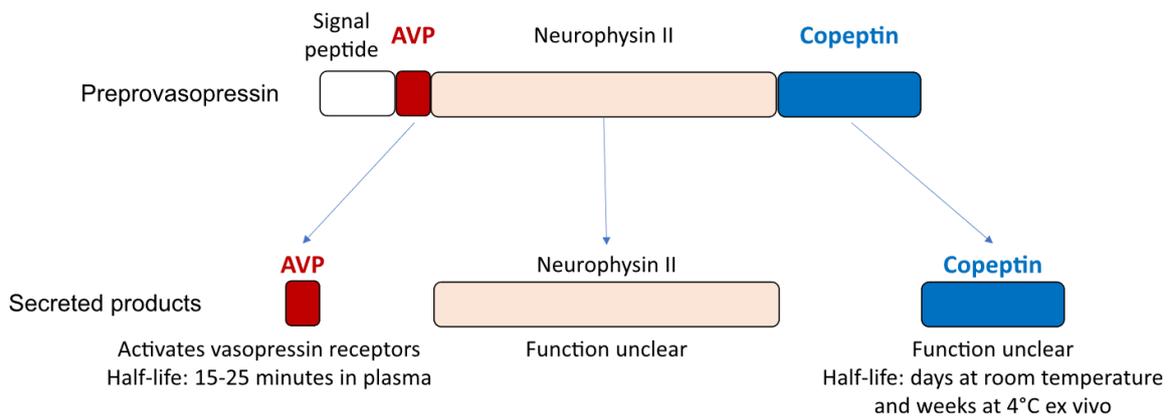


Figure 5 : Schéma de la Pré-pro-vasopressine et de ses produits sécrétés. (Extrait de Kanbay *et al.*, 2019)

b) Récepteurs sensibles à la vasopressine

Il existe deux catégories de récepteurs à la vasopressine : les récepteurs V1 et V2. Les récepteurs V1 sont classés en deux types distincts : les récepteurs V1a et V1b. Les récepteurs V1a sont localisés sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux, où la vasopressine va jouer son action vasoconstrictrice sur les vaisseaux pour influencer la pression artérielle. Ce mécanisme est rendu possible par la voie de signalisation du récepteur qui implique une protéine Gq. Cette protéine va activer la phospholipase C, une enzyme membranaire qui va cliver un phospholipide en deux pour produire deux seconds messager : l'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3) et le 1,2 diacylglycérol (DAG). L'IP3 va se fixer sur des récepteurs canaux du réticulum endoplasmique permettant ainsi de libérer les stocks intracellulaires de calcium dans le cytosol. Cette libération de calcium va être responsable de la contraction des fibres musculaires lisses et ainsi induire une vasoconstriction de ces vaisseaux. Dans le foie, la vasopressine va stimuler la glycogénolyse et la glucogénogénèse. Les récepteurs V1a sont également retrouvés dans les reins et le cerveau (Lolait, 1992 ; Ostrowski *et al.*, 1993).

Les récepteurs V1b sont localisés dans l'adénohypophyse où l'action de la vasopressine va contribuer à la sécrétion de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et ce, en synergie avec la corticolibérine (CRF). Cette sécrétion est liée à l'action de la protéine Gq, où le DAG produit par la voie de signalisation du récepteur va activer une protéine kinase C qui va permettre la sécrétion de l'ACTH. Les récepteurs V1b sont également retrouvés dans le cerveau et le pancréas.

Les récepteurs V2 sont localisés au niveau des reins où la fixation de la vasopressine va induire l'activation de la protéine Gas. Cette protéine va permettre de produire de l'AMP cyclique via l'adénylyl cyclase. L'AMPc va activer la protéine kinase A dans les cellules du tube collecteur du rein et va permettre de réabsorber l'eau par deux mécanismes : la phosphorylation des aquaporines de type 2 et la phosphorylation du facteur de transcription CREB. Ces récepteurs sont également retrouvés dans les poumons.

Enfin, la vasopressine est également en capacité de se fixer sur le récepteur à l'ocytocine.

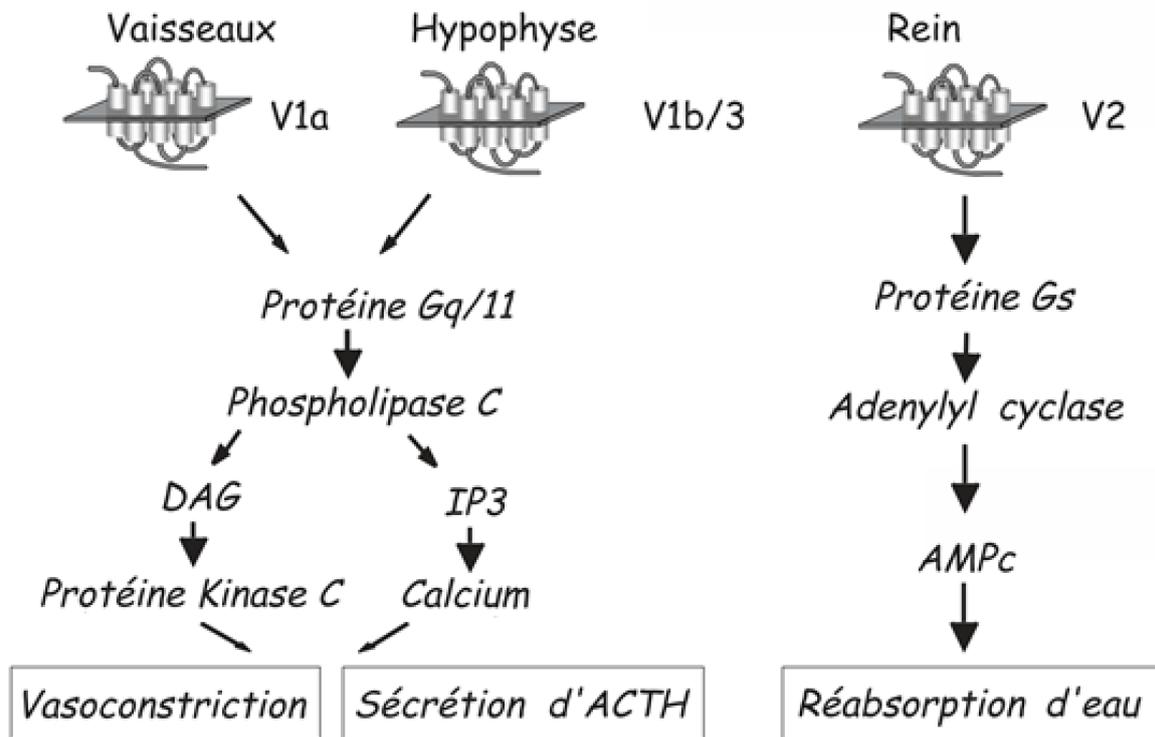


Figure 6 : Lieu d'expression, voies de signalisation et actions physiologiques des récepteurs vasopressinergiques. DAG : diacylglycérol. IP3 : inositol triphosphate. AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique. ACTH : hormone adrénocorticotrope. (Extrait de Robert and Clauser, 2005)

c) Facteurs de régulation et de sécrétion de la vasopressine

La libération de la vasopressine dans le sang va s'effectuer majoritairement sous le contrôle de deux stimuli : l'augmentation de l'osmolarité plasmatique et une réduction de la volémie et la pression artérielle. En effet, il a été montré qu'un changement d'osmolarité de 1-2% était perçu par des récepteurs osmosensibles localisés dans les organes circumventriculaires. Ces informations sont ensuite relayées au PVN afin de synthétiser l'AVP et sa sécrétion dans la neurohypophyse (McKinley *et al.*, 2004). De plus, la baisse de la pression artérielle et l'hypovolémie, vont être détectées par les barorécepteurs de la crosse aortique au niveau du cœur et entraîner l'activation des chémorécepteurs des corpuscules carotidiens. Cela va entraîner la libération de noradrénaline qui va stimuler les neurones à vasopressine dans l'hypothalamus et ainsi permettre la sécrétion de l'AVP dans la neurohypophyse (Bisset and Chowdrey, 1988 ; Jhamandas, 1989).

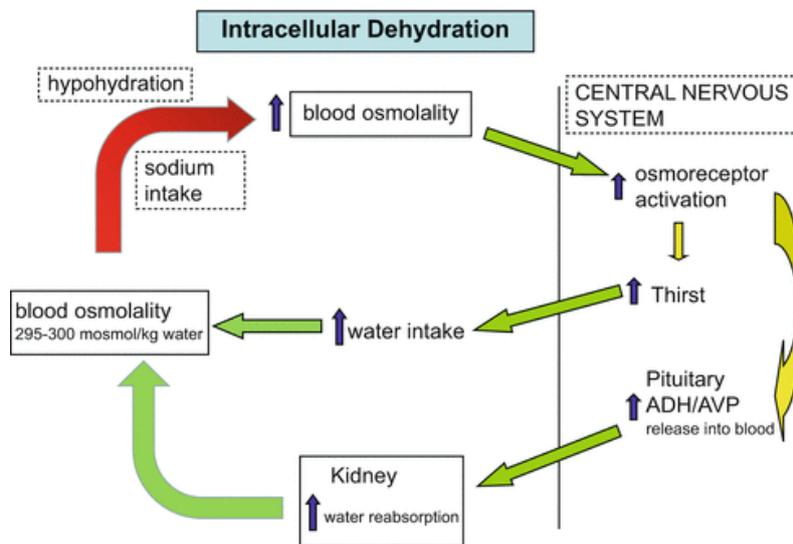


Figure 7 : Schéma représentant une partie des mécanismes mis en place lors d'une déshydratation. (Extrait de Thornton et Norgren, 2016).

d) Fonctions physiologiques de la vasopressine

(1) La réabsorption de l'eau

La fonction la plus importante de l'AVP dans l'organisme est la régulation de l'excrétion de l'eau dans les reins, au niveau du néphron. Lors d'une augmentation de l'osmolarité plasmatique, l'AVP va être sécrétée par les terminaisons des neurones à vasopressine dans la neurohypophyse et l'AVP va circuler dans les vaisseaux sanguins jusqu'au niveau des reins. L'AVP va se lier au récepteur V₂, au niveau de la membrane des cellules épithéliales du canal collecteur des reins. La liaison au récepteur, via la voie de signalisation du récepteur, va permettre d'activer la transcription du gène de l'aquaporine de type 2, canal hydrique, et de se transloquer à la membrane apicale des cellules pour ainsi réabsorber l'eau (Jung and Kwon, 2016 ; Bankir, 2001 ; Robert et Clauser, 2005; Orloff et Handler, 1967).

(2) La vasoconstriction

Lors d'une hémorragie ou pendant la déshydratation, une diminution du volume sanguin va avoir lieu, entraînant une augmentation de la sécrétion d'AVP. L'AVP circulant va se lier aux récepteurs V_{1a}, localisés sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, entraînant ainsi

une vasoconstriction afin de diminuer le débit sanguin et permettre le retour à l'homéostasie (Hasser *et al.*, 1997 ; Coote, 2004 ; Kc et Dick, 2010). Il a été montré que la vasopressine est le plus puissant vasoconstricteur (Altura, 1984).

(3) La régulation corticotrope

Lors d'une situation de stress, l'AVP va être libérée par des neurones parvocellulaires dans le système porte hypothalamo-adénohypophysaire. L'AVP va permettre, via le récepteur V1b, d'agir en synergie avec le CRF pour stimuler la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes de l'adénohypophyse (Antoni, 1993 ; Itoi, 2004 ; Laszlo *et al.*, 2000). De plus, l'AVP pourrait également agir directement sur le corps cellulaire des neurones parvocellulaires pour augmenter la libération de CRF (Antoni, 1993 ; Raff, 1993 ; Lohmeier, 2003).

(4) Régulation des rythmes circadiens

L'AVP joue également un rôle dans la régulation des rythmes circadiens par les récepteurs V1 présents dans les noyaux suprachiasmatiques, centre régulateur de l'horloge circadienne (Ingram *et al.*, 1996).

(5) Activité des neurones à vasopressine lors d'une réponse osmotique

Les neurones à vasopressine reçoivent des signaux de différentes régions cérébrales, notamment des CVO, pour les informer du statut hydrique du corps (Leng *et al.*, 1989). Lors d'une augmentation de l'osmolarité, le SFO et le OVLT vont envoyer des stimulations efférentes vers les neurones de la région A3V3 dans le NSO et le PVN sur les neurones magnocellulaires et vont inhiber, à l'aide du GABA, ou exciter, grâce au glutamate, les neurones à vasopressine (Leng *et al.*, 2001). Ces deux informations contradictoires vont permettre à ces neurones de réguler proportionnellement leur réponse à une élévation de l'osmolarité plasmatique. Lorsque l'osmolarité varie de manière rapide, les neurones à vasopressine vont augmenter leur fréquence de décharge de manière linéaire avec les fluctuations d'osmolarité. Cependant, lorsqu'elle est maintenue à un stade élevé, les neurones à vasopressine vont décharger de manière phasique, en alternant des phases de silence et d'activité. L'activité dans les décharges va refléter le niveau d'osmolarité plasmatique mais le niveau d'activité global sera faible. De plus, pour une même condition osmotique, les neurones à vasopressine vont avoir différents patterns d'activité :

silencieux, irrégulier, phasiques ou continus (Leng *et al.*, 1999). La sécrétion de l'hormone sera faible ou absente lors d'une activité silencieuse ou irrégulière alors qu'elle sera plus élevée lors d'une activité phasique. Dans des conditions extrême d'hyperosmolarité, la vasopressine sera sécrétée en plus forte quantité, de manière continue (Leng *et al.*, 2008).

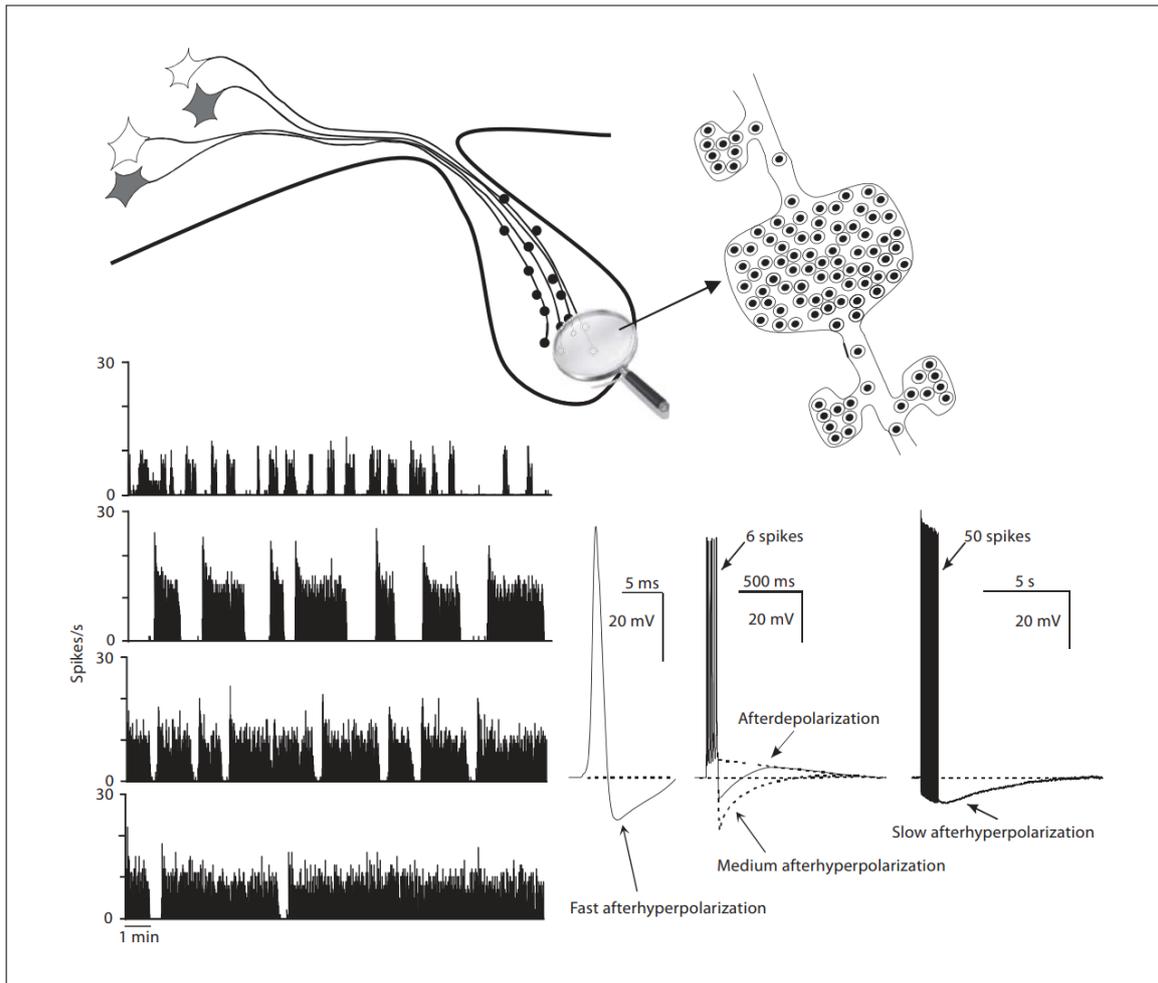


Fig. 1. Phasic firing in vasopressin cells. Each magnocellular vasopressin cell has a single axon, which projects to the posterior pituitary gland. There, axonal swellings and endings are packed with neurosecretory granules which can be secreted as a consequence of spike activity. Phasic firing patterns are particularly important in this, as several hundred spikes are needed to release even a single vesicle from any given ending. Phasic firing comprises bursts of a few hundred spikes, separated by silent intervals. Any given vasopressin cell is fairly consistent in the duration of its bursts and silences, and in the intraburst firing rate; all three of these parameters vary considerably and independently between cells however. The figure shows excerpts of recordings of different vasopressin cells *in vivo*. The phasic firing pattern arises

because of intrinsic mechanisms that produce activity-dependent regulation of excitability. Importantly, every spike is followed by a fast afterhyperpolarization, which limits the maximum frequency at which a vasopressin cell can fire. However, this can be followed by a small afterdepolarization, which tends to make a vasopressin cell more likely to fire again once it has fired. These afterdepolarizations can summate to form a 'plateau' of excitability that sustains a burst. However, this can be terminated by yet other mechanisms – a medium afterhyperpolarization, which reduces firing rate during bursts (spike frequency adaptation) and a slow afterhyperpolarization that can summate to provide a hyperpolarization strong enough to stop a burst.

Figure 8 : Représentation de la décharge phasique des terminaisons à vasopressine. (Extrait de Leng *et al.*, 2008)

C. L'axe hypothalamo-hypophysaire : une vascularisation particulière

L'axe hypothalamo-hypophysaire est un acteur majeur du système endocrinien. De ce fait, les hormones sécrétées, qu'elles soient hypothalamiques ou hypophysaires, doivent pouvoir circuler dans le système vasculaire afin d'atteindre leurs tissus cibles et mener à bien leurs actions.

1. Généralités

Le système circulatoire est composé de divers éléments vasculaires tels que le cœur, le sang ainsi que les différents vaisseaux sanguins. Son rôle est d'acheminer le sang, qui transporte des nutriments, de l'oxygène et d'autres molécules, dans tout l'organisme.

Il existe trois grands types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires. Les artères vont permettre d'acheminer le sang du cœur aux différents organes tandis que les veines vont acheminer le sang des organes au cœur. Quant aux capillaires, ils vont constituer un réseau anastomotique, c'est-à-dire qu'ils vont permettre d'effectuer des connections entre les différents vaisseaux et les organes. Les capillaires sont les plus fins vaisseaux de l'organisme (5-10 μ m de diamètre) et sont un lieu d'échange de nutriments, de gaz, de déchets ou de diverses molécules entre le sang et les organes. Ces échanges peuvent avoir lieu par phénomène de diffusion, c'est-à-dire que les gaz ou les molécules liposolubles vont être en capacité de diffuser librement à travers les cellules endothéliales pour rejoindre la lumière du capillaire. Quant aux molécules non liposolubles ou de haut poids moléculaire, elles vont pouvoir transiter à l'intérieur du capillaire par un mécanisme d'endocytose. La membrane plasmique des cellules endothéliales va se déformer afin de former une vésicule contenant les molécules à faire passer dans le capillaire. Il existe également certains types de capillaires, comme les capillaires fenêtrés ou discontinus dont la structure permet les échanges.

Les veines et les artères sont composées de trois couches : l'intima, la media et l'adventice. L'intima contient l'endothélium, la média des fibres musculaires et l'adventice est la couche conjonctive. Les capillaires quant à eux comportent une organisation plus simpliste puisqu'ils ne sont constitués que d'un endothélium reposant sur une lame basale. Ils possèdent également des cellules particulières, les péricytes entourant les cellules endothéliales et pouvant présenter des propriétés contractiles.

Les capillaires peuvent être classés en trois catégories : les capillaires continus, fenêtrés ou discontinus. Les capillaires continus sont les plus répandus et leurs cellules endothéliales sont jointives. Les capillaires fenêtrés vont contenir sur leur couche endothéliale des pores de 10-100nm de diamètre permettant une perméabilité à des molécules de poids moléculaire jusqu'à 40kDa et assurer des échanges rapides (Schaeffer et al. 2013). Ces capillaires fenêtrés sont retrouvés dans l'hypophyse. Les capillaires discontinus, quant à eux, possèdent un endothélium et une lame basale discontinus, ce qui facilite l'échange des molécules. On retrouve ces capillaires dans la rate, le foie ou encore la moelle osseuse.

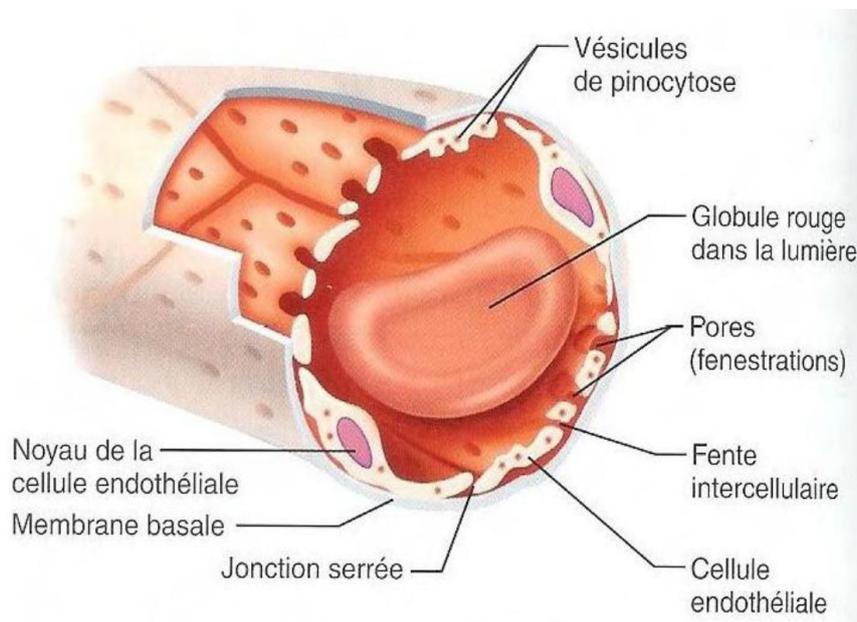


Figure 9 : Schéma représentant un capillaire fenêtré.

2. Le système vasculaire neurohypophysaire

La neurohypophyse est un organe majeur endocrinien puisqu'elle va servir de lieu de sécrétion de l'AVP et de l'OT. De ce fait, un vaste réseau de capillaire est retrouvé dans cette structure afin de permettre d'acheminer ces deux hormones dans leur zone d'action. Ces capillaires présentent une anatomie particulière puisqu'ils vont être dotés de pores de 10-100nm de diamètre afin de laisser passer l'AVP et l'OT dans la lumière du vaisseau.

Le système vasculaire neurohypophysaire possède un rôle majeur dans l'acheminement des hormones, il est donc intéressant de savoir comment celui-ci est mis en place. Il a été montré chez le poisson que l'angiogénèse neurohypophysaire est régulée par le développement des terminaisons neuronales dans la neurohypophyse due à la sécrétion d'ocytocine (Gutnick *et al.*, 2011). En effet, les projections axoniques dans la NH apparaissent avant que le lit capillaire ne soit formé. De plus, l'OT est en mesure de stimuler la migration et la pousse des cellules endothéliales humaines *in vitro* (Cassoni *et al.*, 2006 ; Cattaneo *et al.*, 2008) et des anomalies vasculaires sont retrouvées en fonction de la quantité d'OT sécrétée. Les signaux proangiogéniques sont médiés par les récepteurs OTR présents sur la membrane des cellules endothéliales, permettant à l'OT d'induire l'angiogénèse neurohypophysaire.

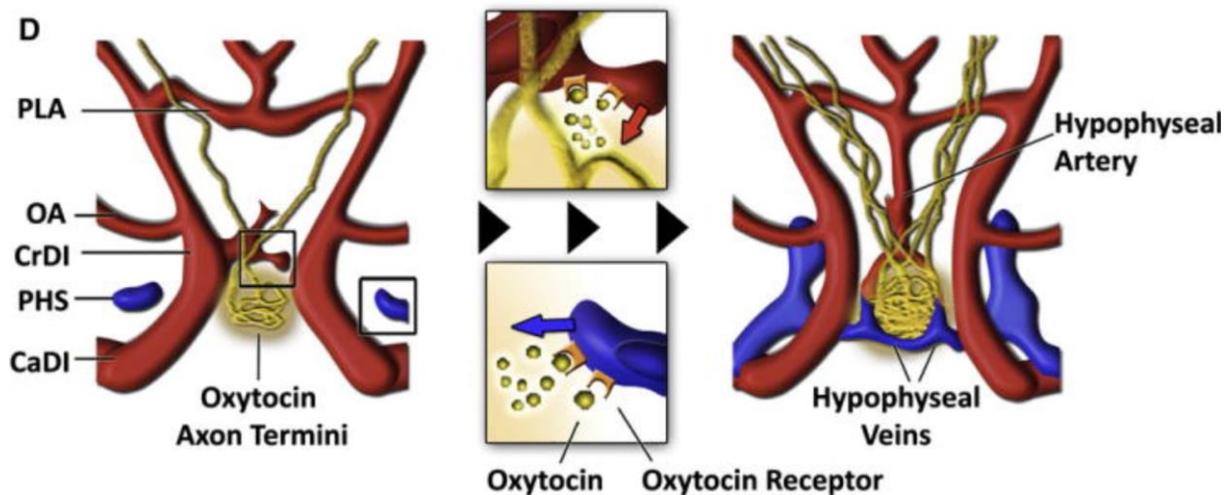


Figure 10 : Schéma représentant les connexions neurovasculaire hypothalamo-hypophysaire par une sécrétion locale d'ocytocine. CaDI : division caudale de la carotide interne. CrDI : division crânienne de l'artère carotide interne. OA : Artère optique. PHS : Sinus primaire de la tête. PLA : Artère palatocérébral. (Extrait de Gutnick *et al.*, 2011)

Les pituicytes possèdent également un rôle important dans la formation de la vascularisation neurohypophysaire. En effet, il a été montré que ces cellules sécrètent des molécules connues pour casser la barrière hémato-encéphalique et le remodelage axonique lors d'une neuroinflammation ou d'une neurodégénérescence au cours du développement afin de rendre perméable les capillaires (Anbalagan *et al.*, 2018).

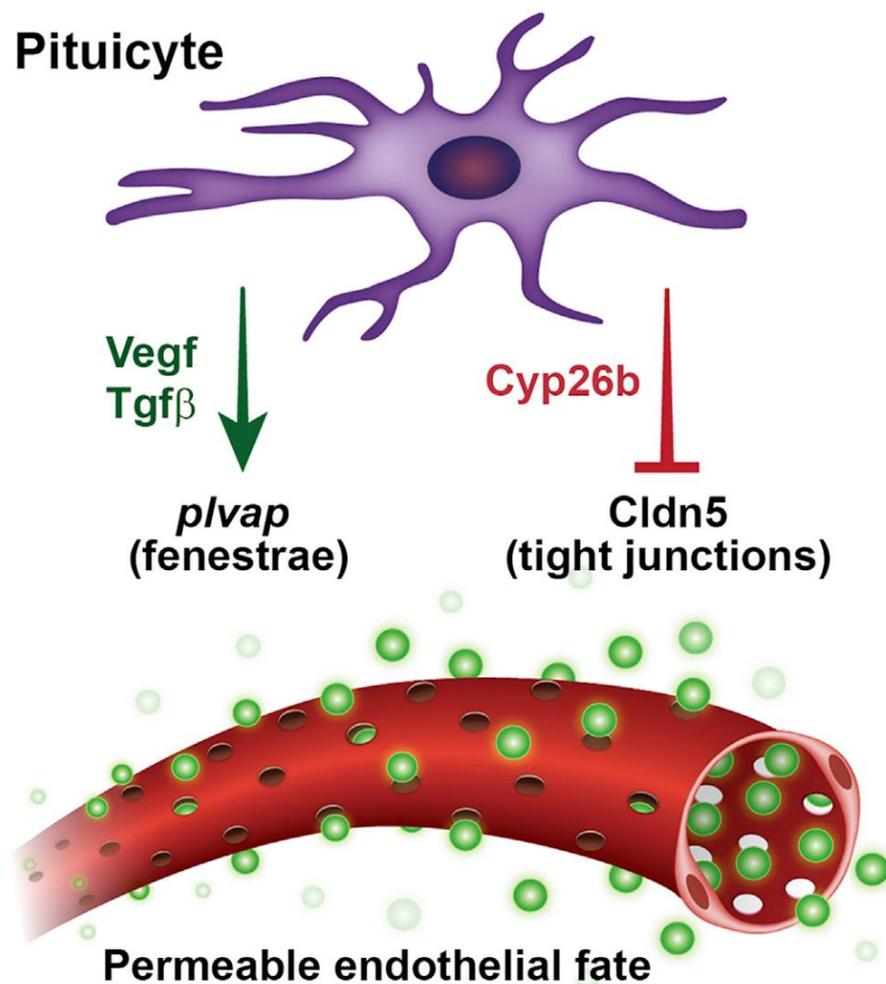


Figure 11 : Représentation schématique du développement d'un capillaire fenêtré par la régulation des pituicytes. (Extrait de Anbalagan *et al.*, 2018)

3. Les péricytes

Les péricytes ont été découverts par Charles-Marie Benjamin Rouget dans la fin des années 1800 (Rouget, 1874). Ces cellules, d'abord appelées cellules de Rouget, ont longtemps été sujettes à de nombreuses confusions et controverses quant à leur définition. En effet, Rouget les a décrites comme étant des cellules motiles, contractiles, entourant les capillaires tandis que d'autres en ont parlé comme des cellules larges et plates entourant les capillaires (Ding *et al.*, 2004) ou encore comme des cellules indifférenciées, associées aux capillaires, pouvant se différencier en fibroblaste, cellule musculaire lisse ou macrophage si besoin (Dore-duffy *et al.*, 2006 ; Dore-duffy, 2008 ; Tilton, 1991). Aujourd'hui encore, leur rôle reste mystérieux bien qu'ils soient de mieux en mieux compris et caractérisés.

a) Morphologie

Dans le système nerveux central, les péricytes sont situés entre les cellules endothéliales, les neurones et astrocytes parenchymateux. Ils sont formés, et entourés, à partir de la lame basale du capillaire (Dore-duffy 2008). Ils possèdent un gros noyau, ce qui les différencie des cellules endothéliales. Leur cytoplasme présente une forme particulière puisqu'il va créer des projections permettant d'entourer les vaisseaux sanguins. Les péricytes peuvent les recouvrir de différentes manières. La plus commune consiste en de larges prolongements cytoplasmiques qui recouvrent une grande partie du capillaire (Figure 13 d). Les projections peuvent également être plus fines, entourant une plus fine partie du vaisseau (Figure 13 e). Les péricytes peuvent également présenter une morphologie indiquant une migration. En effet, les projections peuvent se rétracter (Figure 13 f) ou s'étendre le long du vaisseau (Figure 13 g) (Dore-duffy, 2008). Ces derniers agencements sont majoritairement présents dans le cas d'angiogenèse. De plus, il a été montré qu'un péricyte unique peut étendre ses prolongements sur plusieurs vaisseaux de la microcirculation (Williamson *et al.*, 1980 ; Mazanet et Franzini-Armstrong, 1982).

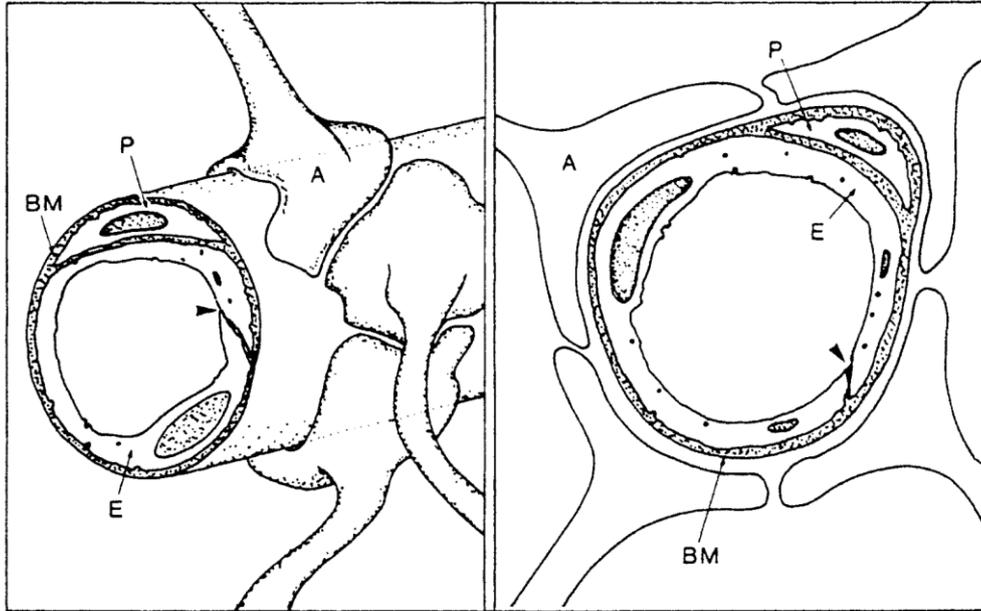


Fig. 1. Cellular relationships at the BBB. The pericyte (P) is closely associated with capillary endothelial cells (E) with which it shares a common basal lamina (BM). The capillary is of the continuous type with interendothelial cell clefts (arrowheads) closed by tight junctions in the form of zonulae occludentes. Astrocytic processes (A) ensheath the capillary (reproduced from Abbott et al. [1989] with permission of the authors and S. Karger AG, Basel).

Figure 12 : Représentation des relations cellulaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique. P : péricytes. E : Cellule endothéliale. BM : lame basale. A : pieds astrocytaires. (Extrait de Allt et Lawrenson, 2001)

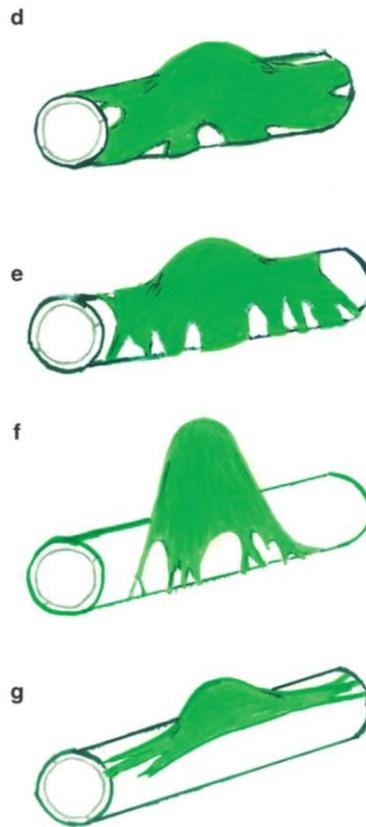


Figure 13 : Schéma représentant les différentes morphologies des péricytes sur les capillaires. Extrait de (Dore-duffy, 2008)

b) Contractibilité et régulation du flux sanguin

Les péricytes sont des candidats idéaux pour la régulation du flux sanguin, notamment en jouant sur le diamètre des capillaires. En effet, ils sont situés sur les capillaires, de la même manière que le sont les cellules musculaires lisses, qui sont connues pour leurs propriétés contractiles et régulatrices du flux sanguin. De plus, les péricytes possèdent des protéines contractiles comme l'actine des muscles lisses alpha (alpha-SMA), la tropomyosine et la myosine (Rucker *et al.*, 2000 ; Alarcon-Martinez *et al.*, 2018).

Les variations de vitesse de flux sanguin dans les capillaires sont dépendantes de la résistance à l'écoulement des fluides et des forces exercées par le passage des hématies dans les vaisseaux. En effet, il a été montré que les capillaires pouvaient faire transiter les hématies à des vitesses différentes malgré des diamètres et longueurs de capillaires identiques. Ces variations seraient liées aux fluctuations d'hématocrite, c'est-à-dire la place occupée par les cellules sanguines

(Gould *et al.*, 2017). De plus, les péricytes étant capables de se contracter, ils vont jouer sur le diamètre des vaisseaux. Lorsque le diamètre des capillaires est mesuré, il est plus élevé à l'endroit où les péricytes sont présents, indiquant que lorsqu'ils sont relaxés, ils vont induire une augmentation de diamètre des capillaires et par conséquent une augmentation de la vitesse du flux. A l'inverse, leur contraction induit une diminution de la vitesse du flux sanguin (Hall *et al.*, 2014).

Les péricytes possèdent de nombreux récepteurs ioniques et récepteurs métabotropiques (Hariharan *et al.*, 2020) leur permettant ainsi d'interagir avec leur environnement. Certains de ces récepteurs sont impliqués dans des cascades conduisant à la constriction ou à la dilatation des vaisseaux puisqu'ils réagissent à des molécules vasoactives. Parmi les voies les plus connues aujourd'hui on retrouve comme molécules pouvant conduire à une contraction des vaisseaux l'ATP, la noradrénaline, les dérivés de l'acide arachidonique, et l'endotheline-1 (Kawamura *et al.*, 2003 ; Peppiatt *et al.*, 2006 ; Fernández-Klett *et al.*, 2010 ; Schönfelder *et al.*, 1998). On retrouve également sur la membrane des péricytes les récepteurs V1a, sensibles à la vasopressine (Yang *et al.*, 2010) dont le mécanisme est encore inconnu. Les molécules les plus connues provoquant la dilatation des péricytes sont le glutamate, en activant la production de prostaglandine E2 astrocytaire, l'adénosine et les canaux KATP (Zambach *et al.*, 2021 ; Mishra *et al.*, 2016 ; Q. Li and Puro, 2001).

II. Techniques d'étude de la neurohypophyse

La neurohypophyse est située sous l'hypothalamus, à environ 0,5 cm de la surface du crâne de souris, ce qui en fait une structure profonde, difficile à étudier car son accès n'est pas aisé. C'est pour cette raison que les différents aspects endocriniens de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire ne sont aujourd'hui que peu étudiés et peu caractérisés. En effet, bien que l'on sache que les neurones endocriniens sont capables de générer des rythmes hormonaux, les mécanismes de régulation de la sécrétion hormonale sont toujours peu connus puisque les approches d'études sont majoritairement faites sur des cellules isolées *in-vitro* ou *ex-vivo*. Il n'est donc pas toujours évident d'en faire un lien avec la réelle fonction physiologique car le système n'est pas entier. Malgré tout, grâce au développement technologique au cours de ces dernières années, des outils chémo génétiques sont apparus permettant d'imager et de suivre une activité neuronale ou de mesurer un flux sanguin, par exemple, dans ces structures difficiles d'accès chez l'animal vivant.

A. Etude des zones profondes du cerveau *in-vivo* : GRIN Lenses

La lentille à gradient d'indice (GRIN) est une lentille en verre complexe. En effet, l'indice de réfraction du verre est fonction de sa position, c'est-à-dire qu'il va varier car le rayon optique suit un chemin de propagation sinusoïdal à travers la lentille. Dans un premier temps, la lumière va être réfractée une première fois lorsqu'elle va entrer dans la lentille, car le milieu passe de l'air au verre. Puis, elle est réfractée une seconde fois, lorsque la lumière va quitter la lentille pour entrer une nouvelle fois dans l'air. Cette deuxième réfraction permet d'obtenir un point focal et donc une image.

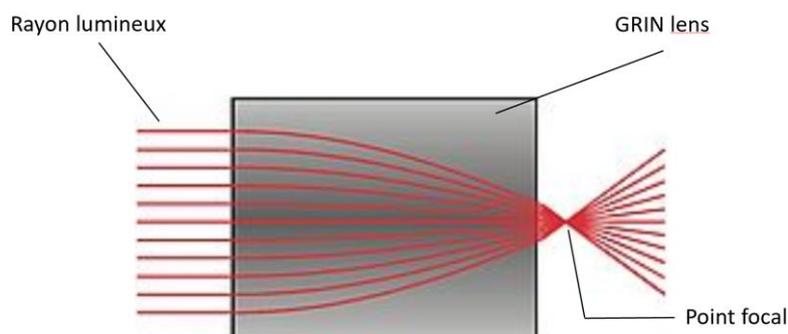


Figure 14 : Schéma représentatif du chemin de réfraction de la lumière dans une GRIN lens (adaptée de GRINtech)

Les lentilles GRIN sont des outils qui permettent une acquisition à une résolution suffisante des structures cérébrales *in-vivo* (Barretto *et al.*, 2009). Il existe différentes longueurs et différents diamètres de lentilles, permettant d'imager les structures corticales comme les structures plus profondes. Pour des structures telles que l'hippocampe (Ziv *et al.*, 2013) ou le cortex prélimbique (Pinto et Dan, 2015), des diamètres de 1mm peuvent être utilisés alors que pour des structures comme l'amygdale (Li *et al.*, 2017), l'hypothalamus (Jennings *et al.*, 2015) ou l'hypophyse (Hoa *et al.*, 2019), des diamètres de 0,5-0,6mm sont utilisés afin de limiter les dommages effectués sur les tissus puisqu'il s'agit de structures plus profondes.

Une fois la lentille implantée au-dessus de la structure d'intérêt, il existe plusieurs méthodes, en fonction de la qualité d'image requise et la question à étudier, afin de pouvoir imager *in-vivo* les animaux. La première, un microscope miniature, appelé miniscope (Ghosh *et al.*, 2011), petit et léger, est monté sur la tête des souris. Les animaux sont donc capables de se déplacer librement, permettant ainsi de corrélérer l'activité calcique de neurones avec le comportement des animaux, pendant plusieurs jours ou mois. Pour la seconde, les animaux vigiles sont placés en dessous d'un microscope et retenus par la tête à l'aide d'une pièce métallique. Cette méthode permet aisément l'imagerie des structures profondes du cerveau chez la souris (Bocarsly *et al.*, 2015).

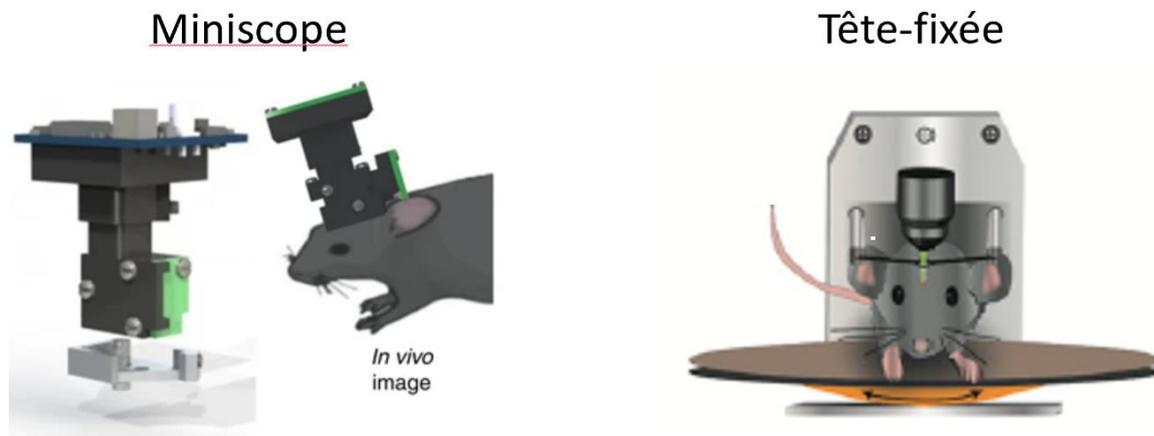


Figure 15 : Représentation du miniscope et de la condition tête-fixée pour l'imagerie *in-vivo*

B. Enregistrement de l'activité calcique

1. Indicateurs génétiquement modifiés

Pendant de nombreuses années, comprendre les fonctions physiologiques en étudiant l'activité électrique neuronale *in-vivo* n'était pas chose simple. En effet, hormis les techniques de patch-clamp, qui ne permettent l'étude que de quelques neurones et dont la technique n'est pas réellement adaptée pour l'*in-vivo* et les enregistrements extracellulaires, qui ne permettent pas d'obtenir des informations précises sur un neurone isolé ou au sein d'une population, il n'existait pas d'autres moyen d'étudier l'activité globale des neurones. Mais, dans les années 2000, des indicateurs optiques encodés génétiquement ont commencé à apparaître, permettant de réels progrès dans la compréhension des circuits neuronaux et des fonctions physiologiques, nous laissant l'opportunité d'être plus précis dans nos études. On retrouve parmi ces indicateurs encodés génétiquement des indicateurs sensibles aux variations de calcium, qui seront abordés dans cette partie, de voltage ou encore de pH.

a) Le calcium

Le calcium est un second messager qui régule la plupart des activités des cellules eucaryotes. Dans les neurones, le calcium joue un rôle majeur puisqu'il va participer à l'activité synaptique, à la dépolarisation des cellules et au relargage des neurotransmetteurs. L'activité neuronale est caractérisée par des potentiels d'actions, détectés par des canaux sensibles au voltage, qui vont conduire à une augmentation du calcium intracellulaire, permettant ensuite de déclencher des processus dépendant du calcium comme la libération de neurotransmetteurs. Depuis plusieurs années, il est possible de détecter les variations de calcium intracellulaire à l'aide d'outils tels que les indicateurs de calcium génétiquement encodés (GECI).

b) Les indicateurs de calcium génétiquement encodés

Les GECI sont des indicateurs de calcium fluorescents qui permettent de suivre les variations de calcium à l'intérieur de la cellule et, dans le cas des neurones, de suivre leur activité neuronale. Ce sont des protéines dérivées de la protéine fluorescente verte (GFP), permutées circulairement (cp), associées à une calmoduline, une protéine chélatrice de calcium, et à M13, un peptide de la chaîne légère de myosine II. L'avantage principal des GECI est qu'ils peuvent être insérés génétiquement à l'aide d'approches virales ou encore exprimés dans des souris

transgéniques. Ce sont donc des outils de choix pour l'étude *in-vivo*. On peut classer les GECI en deux catégories : ceux basés sur les phénomènes de résonance d'énergie et ceux basés sur un fluorophore.

c) Les protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes sont dérivées de *phylum Cnidaria* et permettent de rapporter des événements cellulaires. Elles peuvent être introduites génétiquement dans les cellules et modifiées afin de créer des distorsions conformationnelles et ainsi permettre des changements dans leurs propriétés spectroscopiques pour ainsi rapporter des changements dans leur environnement. On peut retrouver ces caractéristiques dans les techniques de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) qui consiste par un effet quantique mécanique au transfert d'énergie d'une molécule fluorescente donneuse à une autre, accepteuse. Ce transfert a lieu lorsque le calcium se lie à la calmoduline, diminuant la distance entre les deux protéines. La fluorescence du donneur va alors diminuer tandis que celle de l'accepteur va augmenter. (Figure 16 A) Il est donc ainsi possible de suivre les interactions entre deux molécules localisées très proches. (Okumoto, 2010 ; Jares-Erijman et Jovin, 2003).

La GFP, qui provient de la méduse *Aequorea*, permet le codage génétique d'une fluorescence verte élevée et a ainsi permis de suivre l'expression et la dynamique de nombreuses protéines. Malgré la conformation du fluorophore, de nombreux paramètres biochimiques sont capables de moduler la GFP dont la permutation circulaire qui consiste à créer de nouvelles terminaisons amino et carboxyle dans la séquence primaire de la protéine (Zacharias *et al.*, 2000). La permutation circulaire de protéine fluorescente verte (cpGFP) présente plusieurs avantages. Premièrement, elle permet la fusion sur des protéines dont la GFP ne parviendrait pas à s'exprimer puisque les terminaisons amino-carboxyle sont différentes. Deuxièmement, la permutation circulaire va modifier l'orientation du chromophore de la GFP par rapport à la protéine avec laquelle elle a fusionné. Troisièmement, elle peut permettre la détection par fluorescence de changements structurels dans des protéines comme les protéines transmembranaires.

d) Les GCaMP

Les GCaMP sont des GECI basés sur l'insertion d'un fluorophore premièrement développé par Junichi Nakai (Nakai *et al.*, 2001). La cpGFP est fusionnée à la calmoduline et à M13. Lorsque la calmoduline va chélater le calcium, elle va subir un changement de conformation qui va permettre de déprotoner la GFP et induire une émission de fluorescence élevée (Akerboom *et al.*, 2009). (Figure 16 B)

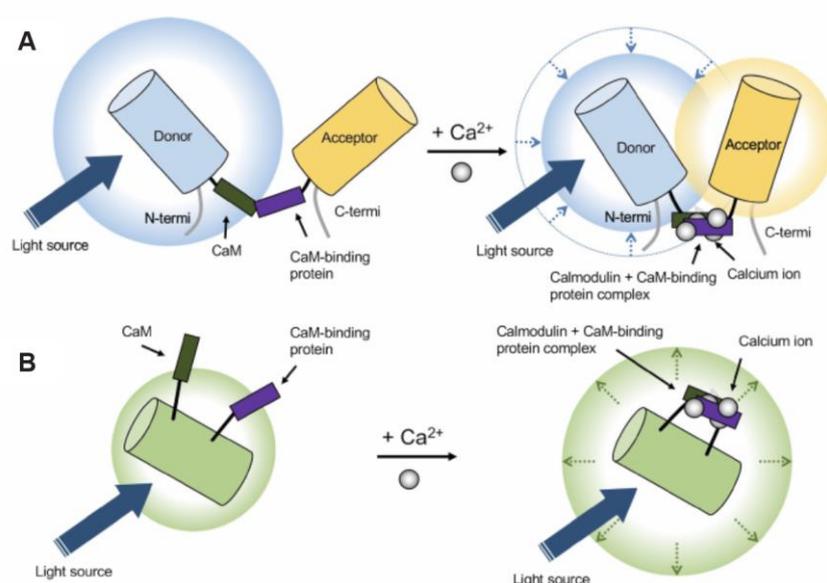


Figure 16 : Représentation des indicateurs de calcium génétiquement encodés. (A) FRET : La liaison du calcium permet d'approcher le donneur et l'accepteur pour induire le FRET. (B) GECI à un fluorophore : La liaison du calcium à l'indicateur fluorescent va changer sa conformation et conduire à une augmentation de la fluorescence émise. CaM : Calmoduline. (Extrait de Oh *et al.*, 2019)

Il existe différents variants de GCaMP, allant de 1 à 8, eux-mêmes divisés en sous-variants en fonction de leurs spécificités, dépendant de leur affinité avec le calcium et l'intensité de fluorescence émise. Le GCaMP6 est le GECI le plus couramment utilisé aujourd'hui et il se divise en trois variants différents (Chen *et al.*, 2013) : GCaMP6s, GCaMP6m et GCaMP6f. Le premier, s pour slow, va avoir une faible affinité pour le calcium tandis que son rapport signal sur bruit sera plus élevé. Le second, m pour médium, aura une affinité et un rapport signal sur bruit moyen. Le troisième, f pour fast, aura une grande affinité pour le calcium tandis que son rapport signal sur bruit sera plus faible. Aujourd'hui, de nouveaux variants présentant de

meilleures affinités pour le calcium et de plus fortes émissions de fluorescence avec un meilleur ratio signal sur bruit ont vu le jour, comme le GCaMP8 (Zhang *et al.*, 2021).

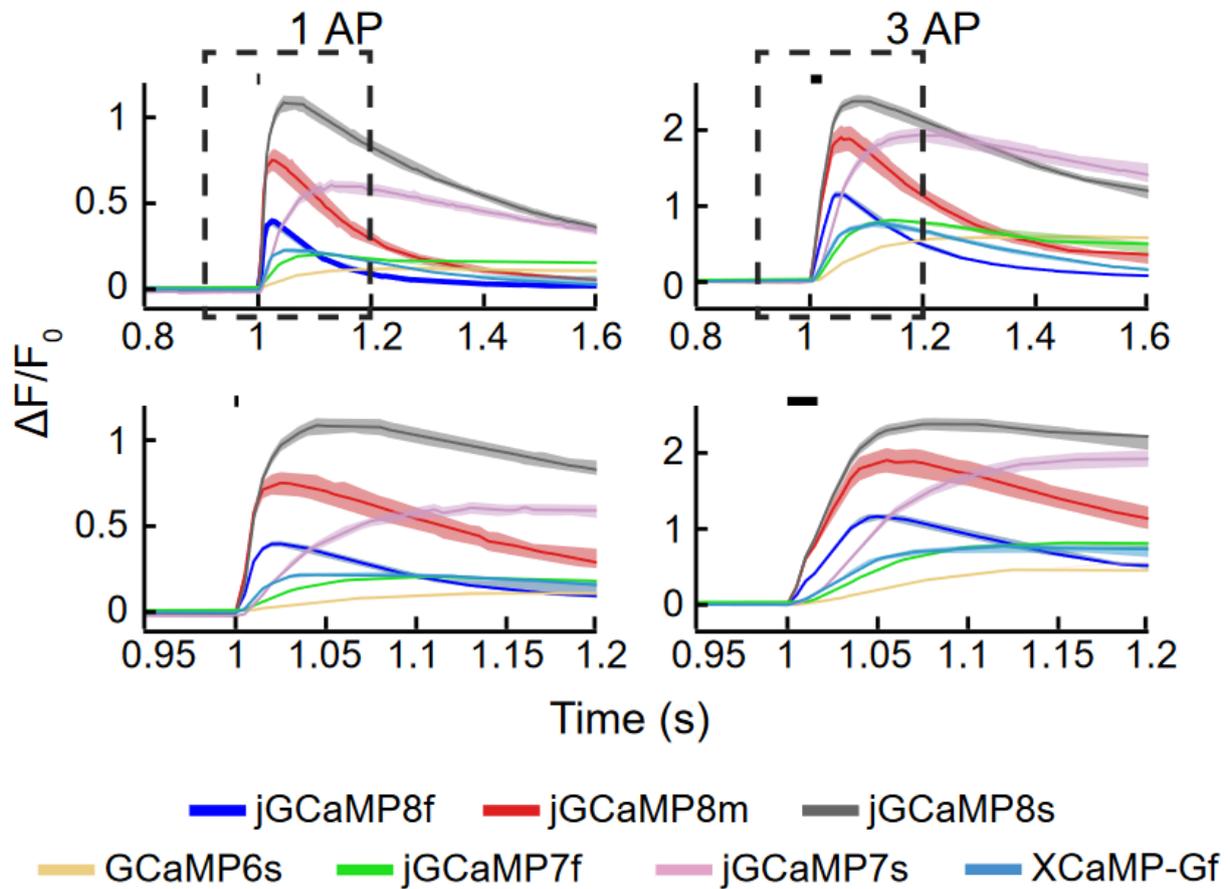


Figure 17 : Réponses des différentes sondes GCaMP pour 1 (gauche) ou 3 (droite) potentiels d'action. (Extrait de Zhang *et al.*, 2021)

e) Approche virale

L'utilisation des GECI peut se faire par approche virale en utilisant des vecteurs dérivant d'adénovirus associés (AAV). Cette méthode consiste à faire exprimer une protéine d'intérêt, GCaMP par exemple, dans des cellules cibles afin de pouvoir les étudier spécifiquement. Les AAV possèdent un faible caractère immunogène et sont donc bien tolérés par l'organisme sur de longues périodes (Kaplitt *et al.* 1994). Il est possible d'infecter toutes les cellules dépendant d'un promoteur spécifique ou bien de cibler un type cellulaire particulier chez des souris transgéniques en utilisant une Cre-recombinase.

Les AAV sont des virus appartenant à la famille des *Parvoviridae*. Le nom « Adéno-associé » vient du fait qu'ils ne peuvent se répliquer qu'en présence d'un virus auxiliaire, comme l'adénovirus, le virus de l'herpès ou encore le papillomavirus. Les AAV sont non enveloppés et possèdent une capsidie qui contient de l'ADN simple brin. Ils possèdent un cycle infectieux biphasique en fonction de la présence, ou non, du virus auxiliaire. Si l'AAV infecte seul la cellule, il est incapable de se répliquer et entre dans une phase de latence. Au contraire, s'il infecte la cellule en-même temps que le virus auxiliaire, il va entrer dans une phase répllicative (Millet *et al.*, 2013).

Il existe différents sérotypes d'AAV, allant de l'AAV1 à l'AAV9, qui, bien qu'ils soient capables d'infecter la quasi-totalité des tissus, vont présenter des préférences pour des types cellulaires particuliers (Wu *et al.*, 2006). On préférera par exemple utiliser un AAV2, 5, 7 ou 9 pour étudier le cerveau.

Afin de synthétiser la protéine cible à l'aide des AAV, il est nécessaire de remplacer la séquence d'ADN viral par la séquence d'ADN de la protéine cible, sous le contrôle d'un promoteur, tout en conservant certains domaines pour permettre la transcription. Le promoteur est un élément du gène indispensable à la transcription de l'ADN puisque l'ARN polymérase va s'y fixer avant de démarrer la synthèse d'ARN permettant la synthèse de protéine. Les promoteurs peuvent être spécifiques d'un type cellulaire, comme le promoteur de la synaptophysine qui va permettre de cibler spécifiquement les neurones. Mais également ubiquitaire, c'est-à-dire qu'il va cibler tous les tissus sans spécificité : c'est le cas du promoteur CAG par exemple.

2. Souris transgéniques

Les souris transgéniques sont des souris dont le génome a été modifié et pouvant transmettre cette modification à leur descendance. Ces souris s'obtiennent en insérant un vecteur contenant la séquence du gène à introduire, modifier ou invalider, entre deux séquences identiques du gène cible. Une recombinaison homologe va se produire, invalidant le gène cible et le remplaçant par la séquence d'intérêt. De cette manière, il est possible de créer de nombreuses modifications du génome comme par exemple, l'introduction d'un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur spécifique introduit ou encore l'expression d'une Cre-recombinase dans un tissu ou type cellulaire spécifique.

L'un des systèmes les plus utilisés aujourd'hui est le système Cre/lox (Nagy, 2000). La Cre est une recombinaase qui va permettre la recombinaison entre deux sites LoxP. Ce système permet une expression conditionnelle d'un gène puisqu'il ne pourra être exprimé que dans les cellules possédant la Cre recombinaase.

Les souris possédant la Cre recombinaase peuvent ensuite être croisée avec des souris transgéniques portant une séquence d'ADN spécifique entourée de deux sites LoxP. C'est le cas par exemple des souris Wnt1-Cre/Ai95d. Ces souris sont issues du croisement entre une lignée exprimant la Cre recombinaase dans les cellules possédant le promoteur Wnt1 et une lignée de souris exprimant le gène Ai95d, permettant d'exprimer la GCaMP6f, entourée de deux sites LoxP. Ainsi, toutes les cellules exprimant le promoteur Wnt1 exprimeront la GCaMP6f et il sera donc possible – notamment pour mon travail de thèse – de suivre l'activité calcique des péricytes dérivant de la crête neurale dans la neurohypophyse.

Une autre méthode permettant de faire exprimer des GECI dans des cellules spécifiques et de pouvoir enregistrer l'activité calcique est d'utiliser une approche virale dans des souris transgéniques exprimant la Cre recombinaase. Dans ce cas, on utilise un virus dit « Cre-dépendant », c'est-à-dire que la séquence génomique est entourée de deux sites LoxP, permettant son expression dans les cellules exprimant la Cre.

Bien que les souris transgéniques soient des outils particulièrement efficaces pour étudier un type cellulaire d'intérêt, elles présentent toutefois des inconvénients majeurs. En effet, il est possible que l'expression du transgène ne soit pas bonne ou non spécifique, que les lignées dérivent ou encore que des perturbations de la dynamique du calcium aient lieu (Steinmetz *et al.*, 2017). Ces inconvénients seront abordés en détails dans la discussion.

C. Le flux sanguin

La neurohypophyse est une glande endocrine. De ce fait les hormones sécrétées vont transiter par la circulation sanguine afin de pouvoir mener leurs actions dans leurs tissus cibles. Il est donc nécessaire que le système vasculaire soit régulé finement, notamment au niveau de sa vitesse pour pouvoir capter et acheminer correctement les hormones à destination.

Il existe différents paramètres pouvant réguler le flux sanguin, provoquant des diminutions de vitesse ou des accélérations. En effet, des molécules vasoactives sont sécrétées par les cellules endothéliales, permettant de réguler le flux sanguin. Parmi les molécules vasodilatatrices on retrouve le monoxyde d'azote, les prostacyclines et la bradykinine et pour les molécules vasoconstrictrices, l'endothéline, l'angiotensine ou encore le thromboxane A2 (Alexander *et al.*, 1998).

Les artérioles vont jouer un rôle important puisqu'elles sont responsables du tonus vasculaire et vont réguler le débit sanguin dans les lits des capillaires. Ce tonus est contrôlé par le système autonome mais également par des molécules vasoactives présentes dans le sang comme les catécholamines, l'angiotensine II ou encore la vasopressine.

Les différents vaisseaux sanguins vont présenter des cellules musculaires lisses qui ont la particularité d'être contractiles. Elles vont réagir aux molécules vasoactives mais également aux changements de pression. Leur contraction ou relaxation va ainsi induire une vasoconstriction ou une vasodilatation, permettant ainsi de moduler la vitesse du flux sanguin. Cependant, les capillaires ne possèdent pas ces cellules et ne permettent ainsi pas, sous cet aspect, un contrôle du flux sanguin. Mais, il a été montré que les péricytes – localisés autour des cellules endothéliales des capillaires – sont capables de faire fluctuer le flux sanguin. En effet, il a été montré que la contraction de ces cellules induisait une vasoconstriction, ce qui entraînait une diminution de la vitesse du flux des capillaires alors qu'une relaxation des péricytes permettait l'effet contraire, soit une vasodilatation et par conséquent, une augmentation de la vitesse du flux (Hall *et al.*, 2014; Peppiatt *et al.*, 2006).

Malgré l'importance du réseau de capillaires dans l'hypophyse compte tenu de sa relation avec la sécrétion hormonale, les études sur le flux sanguin dans cette région sont rares. Des méthodes

indirectes pour mesurer le flux sanguin ont cependant commencé à se mettre en place. En effet, des microsphères non radioactives ont été injectées dans la circulation, permettant d'estimer le flux en suivant leur nombre parvenu dans un tissu spécifique (Jansson et Hellerström, 1981). Cette méthode a notamment été utilisée sur le mouton pour calculer le flux neurohypophysaire (Page *et al.*, 1990). D'autres techniques, basées sur la détection de la diminution de radioactivité suite à des injections dans l'adénohypophyse de radio-isotopes (Hedge *et al.*, 1966), ont permis d'estimer la vitesse du flux dans cette région. De même, l'injection de radio-isotopes a permis d'estimer une valeur de flux dans la neurohypophyse chez des animaux déshydratés, montrant une augmentation de la vitesse du flux chez ces animaux (Lichardus *et al.*, 1977). Cependant, ces techniques sont indirectes et ne permettent que d'estimer la vitesse du flux sanguin dans un organe entier sans prendre en considération les changements de flux pouvant survenir lors de changements d'activité cellulaire au sein du tissu. Cela s'explique notamment par la difficulté d'accès de la glande pituitaire.

Toutefois, des méthodes plus directes, *in-vivo*, ont commencé à se mettre en place comme la mesure de la clairance de l'hydrogène (Aukland *et al.*, 1964) dans l'adénohypophyse (Kemeny *et al.*, 1985) et maintenant par des expérimentations par microscopie en utilisant des dextrans fluorescents dans la circulation, marquant le plasma sanguin tout en permettant de visualiser le passage des hématies. Cette dernière méthode est peu invasive pour l'animal et va permettre une visualisation en direct du flux chez l'animal éveillé, afin d'obtenir des informations sur la vitesse du flux sanguin dans des vaisseaux individuels et de les corréler à des sécrétions hormonales par exemple.

D. Suivi des neuropeptides : biosenseurs

Depuis de nombreuses années, la communauté scientifique s'intéresse au suivi et à la libération des neurotransmetteurs et des neuropeptides dans le cerveau. En effet, les neurotransmetteurs tels que le glutamate, la dopamine ou l'acétylcholine, par exemple, possèdent des rôles majeurs dans les fonctions complexes du cerveau comme la mémoire, le mouvement, ou encore le sommeil. Des dérégulations de ces systèmes sont impliqués dans des pathologies telles que Alzheimer, Parkinson, la dépression ou encore la schizophrénie (Tritsch et Sabatini, 2012 ; Williams et Adinoff, 2008 ; Francis *et al.*, 1999). Cependant, les méthodes utilisées jusqu'à récemment sont limitées dans leur utilisation. Par exemple, la microdialyse est une méthode qui permet le suivi des neurotransmetteurs extracellulaires mais ne permet qu'une faible résolution spatiale et temporelle et est particulièrement invasive. D'autres méthodes telles que le Fast-scan cyclic voltometry (FSCV) sont utilisées mais elles ne permettent pas le suivi des neurotransmetteurs ou des neuropeptides à faible concentration, et demandent l'implantation d'une large sonde, ne permettant ainsi pas une fine analyse spatiale des neuropeptides (Jaquins-Gerstl and Michael 2015).

En 2013, Marvin et al. mettent en place le premier senseur, iGluSnFR, capable de suivre le relargage synaptique excitateur de glutamate. Ce senseur est basé sur l'insertion de la cpGFP dans le récepteur ionotropique Glt1 de *E. coli* (Marvin *et al.*, 2013).

En 2018, deux nouveaux senseurs, capable de suivre de manière spatiale et temporelle le relargage de dopamine et d'acétylcholine sont produits (Patriarchi *et al.*, 2018 ; Jing *et al.*, 2018). Ces senseurs sont basés sur l'insertion de la cpGFP dans la troisième boucle intracellulaire (ICL3) des récepteurs humains dopaminergique DRD1-2-4 et muscarinique acétylcholine M3R. La boucle ICL3 a été choisie car elle lie les hélices 5 et 6 de ces récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et permet un changement de conformation du récepteur lorsque le ligand se fixe sur son site de liaison entraînant un changement de l'émission du fluorophore cpGFP.

Aujourd'hui, de nombreux senseurs permettant le suivi des neurotransmetteurs sont mis en place et des senseurs permettant le suivi des neuropeptides sont en cours de développement. Le principe de ces senseurs repose sur la même méthode que pour les neurotransmetteurs car la majorité des neuropeptides vont se lier sur des RCPG, il est donc possible de remplacer la boucle ICL3 du récepteur par la cpGFP et ainsi suivre le relargage des neuropeptides lors du

changement de conformation du récepteur suite à la liaison du neuropeptide. C'est le cas du senseur OxLight1, qui permet le suivi des orexines (Duffet *et al.*, 2022) ou encore du senseur GRABOT, pour l'oxytocine (Qian *et al.*, 2022).

III. Hypothèses et objectifs

L'hypophyse est une glande endocrine majeure constituée de deux parties majeures distinctes : l'adénohypophyse et la neurohypophyse. La première va produire des hormones dans ses cellules endocrines sous contrôle de neurones parvocellulaires tandis que la seconde va recevoir les terminaisons neuronales des neurones magnocellulaires, permettant ainsi la sécrétion de deux neurohormones, l'ocytocine et la vasopressine. Les terminaisons neuronales vont former une jonction neurohémale avec les capillaires fenêtrés, permettant aux hormones de se déverser dans la circulation sanguine et d'atteindre leurs organes cibles afin de mener leurs actions respectives.

L'hypophyse est une structure profonde du cerveau située sous l'hypothalamus. Sa localisation en fait donc un organe difficile à étudier de par sa difficulté d'accès. Pendant de nombreuses années, son étude s'est faite à l'aide de techniques d'histologies, permettant d'en comprendre la composition cellulaire et son architecture. Des techniques d'électrophysiologie ont également été mises en place mais ces dernières se sont concentrées sur l'étude des corps cellulaires des neurones magnocellulaires situées dans le noyau supraoptique et dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus car il s'agit d'une structure plus facile d'accès.

L'axe hypothalamo-hypophysaire est en lien direct avec la circulation sanguine et ce, à deux niveaux. Premièrement, le système porte hypothalamo-hypophysaire est constitué de deux plexus de réseaux denses de capillaires fenêtrés au niveau de la face externe de l'éminence médiane et du parenchyme de l'adénohypophyse, connectés entre eux par les vaisseaux de la tige hypophysaire. Deuxièmement, un plexus de capillaires fenêtrés au niveau de la neurohypophyse collecte les neurohormones, vasopressine et ocytocine, pour les déverser dans la circulation générale. Les relations entre neurones et capillaires fenêtrés ont été notablement étudiées ces dernières années au niveau de l'éminence médiane. Concernant les communications des organes périphériques vers le cerveau, les tanocytes joueraient un rôle majeur dans la recapture de la leptine dans la circulation sanguine au niveau de l'éminence médiane afin de permettre sa transcytose dans le liquide céphalo rachidien ou l'hypothalamus (Balland *et al.*, 2015 ; Duquenne *et al.*, 2021). De plus, les capillaires au sein de l'éminence médiane sont capables de laisser diffuser rapidement et librement des hormones périphériques telles que la ghréline et des boucles profondes de capillaires fenêtrés permettent que ces hormones périphériques soient directement captées dans des régions de l'hypothalamus (Schaeffer *et al.*, 2013). Concernant les communications du cerveau vers la périphérie, des études ont montré grâce à de fines électrodes de carbone senseur de la dopamine, que des

épisodes orchestrés de relargage de dopamine ont lieu au niveau des terminaisons neuronales dopaminergiques dans l'éminence médiane et ce en relation inverse avec les taux circulants de prolactine libérée par l'adénohypophyse (Romanò *et al.*, 2017). L'ensemble de ces résultats indiquent que les différents éléments de la jonction neuro-hémale jouent des rôles clé dans le dialogue cerveau (hypothalamus) et le milieu sanguin. Malgré l'évidence de plasticité au niveau de cette jonction neuro-hémale (Prevot *et al.*, 2010), la question d'un rôle d'une régulation dynamique et fonctionnelle du flux sanguin dans ces capillaires fenêtrés est toujours en suspens.

Aujourd'hui, les techniques d'expérimentation se sont développées, permettant d'aborder cette question au niveau de la neurohypophyse *in-vivo*. Ma thèse a pour objectif d'aborder cette question sur des modèles de mammifère (souris) et ainsi de mieux appréhender, de manière générale, le lien entre un système neuroendocrinien et le système vasculaire fenêtré. En effet, j'ai cherché à savoir si et comment, la sécrétion d'une hormone neurohypophysaire comme la vasopressine, par des neurones magnocellulaires hypothalamiques, pouvait s'accompagner de modifications de la microcirculation des capillaires neurohypophysaires. Lors d'une déshydratation, les terminaisons neuronales à vasopressine vont être excitées, permettant ainsi l'exocytose des vésicules contenant la vasopressine. Cette sécrétion s'effectue dans une jonction neurohémale, avec la terminaison neuronale située au plus proche des pores fenêtrés d'un capillaire, permettant ainsi la libération rapide de l'hormone directement dans la circulation neurohypophysaire, puis dans la circulation générale. De ce fait, j'ai étudié si une stimulation des neurones à vasopressine, par une déshydratation, avait la capacité de moduler le flux sanguin neurohypophysaire et par conséquent si un acteur de régulation du flux sanguin, comme les péricytes, était capable de réguler le débit sanguin. J'ai également étudié l'activité calcique des terminaisons, sous-tendant la sécrétion de vasopressine, et ce en fonction des conditions, qu'elles soient basales ou en déshydratation. De plus, j'ai également entrepris de créer un outil permettant de suivre de manière directe la sécrétion de la vasopressine à partir de cellules exprimant un senseur de cette neurohormone.

IV. Résultats

A. Article

A live imaging approach in mouse models to interrogate the vasopressin delivery into the systemic circulation.

Bignaud Cassandre^{1*}, Lafont Chrystel^{1,2}, Fontanaud Pierre^{1,2}, and Mollard Patrice^{1,2*}

¹Institute of Functional Genomics, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

²BioCampus Montpellier, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

*Correspondence: cassandra.bignaud@igf.cnrs.fr, patrice.mollard@igf.cnrs.fr

Running title: Neurohypophysis in vivo imaging

Key words: Brain-periphery dialog, in vivo imaging, microvessels, diabetes insipidus

Abstract

Neurohemal junctions between neurohormone-releasing nerve terminals and fenestrated capillaries are critical for basic body functions such as vasopressin (AVP) regulation of kidney water reabsorption. However, how these neurohemal junctions function *in vivo* remains poorly understood. We have developed a toolkit to interrogate the relationship between the stimulation of AVP release from nerve endings and the local neurohypophysis (NH) microenvironment including blood flow dynamics in fenestrated capillaries. This methodology which allows cellular *in vivo* NH imaging of awake mouse models is now readily applicable for longitudinal studies of the NeuroEndocrine-Vascular Unit (NEVU) in health and disease over a period of days to months. Remarkably, our results suggest that characteristic features of the NEVU change upon stimulation of AVP release in response to mouse dehydration.

The hypothalamic-neurohypophyseal system is a major endocrine system that acts as a neurohemal relay between the brain and peripheral organs (Burbach *et al.*, 2001). It is composed of magnocellular neurons whose cell bodies are located in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in which two neuropeptides, oxytocin (OT) and arginine vasopressin (AVP), are synthesized (Brownstein *et al.*, 1980). These two neurohormones are transported along axons to the neurohypophysis (NH) where they are then secreted into the systemic circulation. The neuronal endings form a neurohemal junction with NH fenestrated capillaries. Neurohormones are thus able to reach their target tissues and perform their actions (Burbach *et al.*, 2001). In the systemic circulation, OT acts on smooth muscle cells of the uterus and the mammary gland to regulate parturition and milk ejection (Leng *et al.*, 2005). AVP, following an increase in plasma osmolarity, increases water reabsorption in the kidney by regulating the number of aquaporins at the collecting duct membrane (Jung and Kwon, 2016).

Precisely, the NH system consists of two major parts: nerve endings through neuronal terminals secreting neurohormones and the vascular system. These different elements form a neurohemal junction. Recent studies have recently been conducted on the median eminence which is another key neurohemal junction of the brain-periphery dialog. From periphery to brain, studies have shown a role to tanycytes in the capture of leptin from the systemic circulation in order to allow its transcytosis in the cerebrospinal fluid and thereby the hypothalamus (Balland *et al.*, 2015 ; Duquenne *et al.*, 2021). Others studies have allowed to identify how gut hormones such as ghrelin were able to diffuse freely and rapidly from the blood to reach the hypothalamus (Schaeffer *et al.*, 2013). From brain to the periphery, live studies in awake mouse models have unveiled spatio-temporal patterns of dopamine release events close to the capillary loops of the median eminence. Dopamine is then carried by the pituitary portal system towards the anterior pituitary where dopamine acts to inhibit prolactin release into the systemic circulation (Romanò *et al.*, 2017). However, the question about a role for a dynamic and functional regulation of blood flow in neurohemal junction remains open.

This prompted us to develop a framework of complementary tools and technics to decipher the logic of vasopressin (AVP) delivery into the systemic circulation, namely to explore whether stimulation of AVP output would involve local capillary events within NH of mouse models. First, we develop a strategy to monitor calcium spiking activity from awake mice in basal and dehydrated conditions. To do so, mice were imaged *in vivo* in a “head-fixed” configuration and

pre-implanted with GRIN lenses which act as an optical relay between a fluorescent microscope and AVP terminals expressing calcium-sensitive fluorescent GCAMP reporters. Parallel *ex vivo* experiments were conducted to study whether released AVP could locally interfere with calcium activity in nerve terminals. Second, cellular *in vivo* imaging studies were carried out in GRIN lens-implanted mice in which red blood cell velocities were monitored as a surrogate of blood flow rate in NH fenestrated capillaries in basal and dehydrated conditions. Finally, *ex vivo* experiments were conducted to investigate whether locally released AVP in the NH extracellular space could control signaling transduction in neural crest-derived pericytes, mural cells with contractile properties which surround fenestrated capillaries. Hence our study provides a powerful framework of tools and techniques to uncover hidden events of the NH neurohemal junction and their potent contribution in the vasopressin response to dehydration.

Material & Methods

Animals

Adults male and female Wild-type C57BL/6 (8-14 weeks), Wnt1-Cre;Ai95d and AVP-Cre mice were housed in a 12h light/12h dark cycle with food and water available ad libitum. All animal procedures were approved by the Languedoc Roussillon Institutional Animal Care and Use Committee (APAFIS#21598-2019072213268520 v2, 2020-2025).

Stereotaxic injections of AAV

All mice were anesthetized with Ketamine/Xylazine (0.1/0.02mg/kg). Wild-type C57BL/6 mice are placed into a stereotaxic station and received 1 μ L bilateral injections of AAV9-CAG-GCaMP6s-WPRE-SV40 or AAV9-CAG-GCaMP8s-WPRE-SV40 (Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA) into the paraventricular nucleus at coordinates -0.1mm antero-posterior, \pm 0.2mm lateral and -4.8mm dorso-ventral). AVP-Cre mice are placed into a stereotaxic station and received 1 μ L injections of AAV9-CAG-fl-GCaMP8s-fl-WPRE-SV40 (Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA) into neurohypophysis at coordinates -2.6mm antero-posterior, 0mm lateral and -5.8/-6.2 mm dorso-ventral. Experiments are processed four weeks after injection.

Stereotaxic implantation of GRIN lens for optical imaging in awake head-fixed mice

As described previously (Hoa *et al.*, 2019), wild-type C57BL/6 mice were anesthetized with Ketamine/Xylazine (0.1/0.02mg) and placed into a stereotaxic station to implant a GRIN lens

(0.6-mm diameter, 1.5 pitch, 7.5-mm length, and 150- μ m working distance ; GRINTECH, Jena, Germany) above the neurohypophysis. The GRIN lens is placed in a 20G1/2 Gauge needle, with a metal rod placed above the GRIN to prevent movement, and inserted at coordinates - 2.6mm antero-posterior, 0mm lateral and -5.8/-6.2 mm dorso-ventral. Then, the needle is removed and the metal keep the GRIN in place above the neurohypophysis. The GRIN lens is preliminarily fixed with UV-cement (Henry Schein, France), the metal rod is removed and the GRIN lens is fixed with UV-retractable cement. Then, a head-plate is fixed on the scalp of the mice with the UV cement. Two weeks after surgery, mice are habituated to imaging with the head-plate fixation system every day during a week.

***In-vivo* monitoring of blood flow in head-fixed mice**

Implanted wild-type C57BL/6 mice with GRIN lens are placed in the head-plate fixation system under a stereomicroscope (Zeiss Discovery V.12, Carl Zeiss, Jena, Germany) fitted with a fluorescence lamp Lambda LS (Sutter Instrument Company, Novato, CA) and a sCMOS camera (ORCA Flash 4.0 C11440, Hamamatsu, Japan), all controlled with MetaMorph7.8.9 software (Molecular Devices, California, USA). A 200 μ L retro-orbital injection of 500kDa FITC isocyanate Dextran or 150kDa Tetramethylrhodamine isocyanate dextran (50mg/ml in Saline buffer) (Sigma-Aldrich) is carried out to fluorescently label blood plasma allowing visualization of dark (non fluorescent) red blood cells (RBC). Imaging of blood flow is performed between 100 and 200 frames per second during 2.5 to 5 second recordings. After basal recording of RBC velocity, a 10% NaCl subcutaneous injection is processed or water is removed for 24 to 48h to monitor capillary RBC velocities in dehydrated condition.

Movies are stabilized and analysed in MATLAB (Mathworks, Portola Valley, CA) using previously described image analysis methods: NoRMCorre (Pnevmatikakis and Giovannucci, 2017; Kim *et al.*, 2012). Averages of RBC velocities were measured in 3 to 12 vessels per movie in 3 to 7 mice per condition.

Calcium imaging in neurohypophysis slices

Wnt1-Ai95d, AVP-cre and wild-type C57BL/6 mice are killed by decerebration. Then, the pituitary gland is removed by breaking the meninges surrounding and placed in ACSF solution (NaCl, 124mM ; KCl 5mM ; NaHCO₃ 26mM ; D-(+)-Glucose 10mM ; NaH₂PO₄ 1.25mM ; MgSO₄ 1.3mM, CaCl₂ 2mM) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. The pituitary gland is then embedded in agar low melting mixed with ACSF and placed on a vibratome chamber immersed

in cold ACSF. Slices of 180 μ m thickness are pasted on a slide coat with poly-L-Lysine in ACSF solution. Then, the whole pituitary gland or slices are placed on a perfusion chamber with ACSF solution circulating at a rate of 1mL/min. Recordings are made under the stereomicroscope Carl Zeiss Discovery V.12 using a water-immersion objective (Objective W Plan-Apochromat 20x/1.0). Calcium activity of pericytes is recorded at 2Hz and calcium activity of terminals endings at 0.5Hz. In both cases, recordings in basal medium and in presence of 10nM of AVP are processed.

Calcium data analysis was performed with MatLab (movies correction), Fiji (fluorescence intensity measurements) and IGOR software (Wavemetrics, Portland, Oregon; calcium waves analysis).

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM or median \pm IQR. Differences between groups were identified by one-way ANOVA (non-parametric tests) and frequency distribution was processed between -200 and +200 percentage of variation in RBC velocities with an increment of 10 using GraphPad Prism software (GraphPad inc., San Diego, CA).

Results

Engineering a technical approach for detecting calcium signals in NH terminals

Dynamics of parvocellular AVP and OT neurons have been extensively recorded at the neuronal soma level in anesthetized rats using electrophysiological recordings and retrograde stimulation of the pituitary stalk (Leng *et al.*, 2015 ; Leng *et al.*, 2008 ; Leng *et al.*, 2019). However, the genuine signature of these parvocellular neurons at the NH level remains elusive. This prompted us to detect calcium signals as a surrogate of nerve terminal activities since a rise in cytosolic calcium is critical for transmitting electrical signals to NH neurohormone exocytosis (Nowycky *et al.*, 1998 ; Lim *et al.*, 1990).

We first established a protocol for recording calcium signals in NH terminals in awake wild-type mice pre-injected at the NH level with AAV9-CAG-GCaMP6s and implanted with a GRIN lens for real-time calcium imaging (Fig. 1A). However, the rich vasculature around the NH was a critical factor upon AAV injection and GRIN lens implantation which sadly lead to 60-80% mouse death within one-two days following surgery. When mouse survival was long enough (at least 3 weeks were required to get efficient GCaMP6 expression prior to recording), we

were able to record multi-terminal bursts of calcium spikes in basal conditions (Fig. 1B, 1C, top panels). Raster plot analysis allowed to unveil high coordination of these bursts of calcium spikes between terminals of the same field (Fig. 1C, bottom panels). Coordination was kept following subcutaneous injection of 10% NaCl (200 μ L) while the burst patterns switched to a more continuous high spiking profile, a NH terminal response to hypertonic stimulation which resembled those detected by electrophysiology in the supraoptic nuclei (Leng *et al.*, 2008 ; Leng and Russell, 2019 ; Leng *et al.*, 2015). Given the very low rate of success (only one mouse was successfully monitored during both basal and hypertonic conditions), we pursued calcium recordings in *ex vivo* NH terminals. We also decided to use a GCaMP sensor with a better affinity for calcium and a better fluorescence emission, GCaMP8s (Zhang *et al.*, 2020). Calcium activity of neuronal terminals was measured in NH pituitary slices from mice previously injected with a virus encoding calcium indicator, AAV9-CAG-GCaMP8s or AAV9-syn-fl-GCaMP8s-fl (Fig. 1D) and calcium activity was monitored in termini as indicated by the white arrows on the neurohypophysis slice (Fig. 1E, right panel). In basal condition, in wild-type C57BL/6 mice (WT), two calcium activity profiles were observed (Fig. 1F), which may correspond to the two populations of terminals present in the neurohypophysis: oxytocin and vasopressin terminals. The first population of terminal endings displayed rapid spikes activity (purple and green curves, Fig. 1F left panel) while the second population showed characteristic calcium events with fast onset and slowly-decaying (over hundreds of seconds) phase (blue, red, black curve, Fig. 1F right panel). In AVP-Cre mice, in which only AVP terminals displayed GCaMP expression (Fig. 1G), we mainly observed the second pattern of calcium events with short-lived onset and slow decay phase (Figure 1F, right panel). However, we were unable to detect any spatial coordination of calcium spikes in *ex vivo* NH nerve terminals from both WT and AVP-Cre mice.

Effect of vasopressin on neuronal terminals and positive feedback mediated via V1a and OxR receptors

Another question of interest about NH functioning deals about local communication. Since vasopressin responses have already been reported in isolated pituicytes from rat NH (Hatton *et al.* 1992), we explored whether AVP released into the extracellular space may have local effects in situ, namely on nerve terminals themselves. Perfusion with 10nM AVP onto pituitary slices from AVP-cre mice previously injected with a calcium indicator AAV9-syn-fl-GCaMP8s-fl triggered a 20% increase in calcium that returns to basal levels after washout (Figure 2A, n=4), suggesting that AVP when secreted by termini may exert a positive feedback onto either termini

themselves or via other cells like pituicytes (Hatton *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2020). Such *ex vivo* experiments allowed us to dissect which AVP receptors transmitted this local feedback. Perfusion with either a V1a antagonist and 10nM AVP (Figure 2B, n=2) or OXR antagonist (Figure 2C, n=2) and 10nM AVP moderately reduced calcium responses of nerve terminals to vasopressin (10%), whereas perfusion with both antagonists and 10nM AVP (Figure 2D, n=3) almost prevented AVP-mediated calcium response. These results suggest that vasopressin locally released in situ is able to increase calcium activity of AVP terminals and, possibly, secretion of AVP via a local positive feedback. The latter may involve local transmission via both vasopressin V1a and oxytocin OXR receptors.

Local NH blood flow changes upon dehydration

AVP which is locally released from terminals into the NH extracellular space then diffuses via capillary fenestrations into the systemic circulation. From the estimation of both NH extracellular space and whole-body blood volume, a x5,000-10,000-fold dilution occurs from the NH extracellular space towards systemic circulation. This led us to explore the working hypothesis that dynamic changes in local NH capillary blood flow would occur to facilitate AVP intravasation into NH capillaries and thereby the blood delivery of AVP to its peripheral targets. Indeed dynamic capillary blood flow changes occur during both enhanced neuronal activity in the brain (Pfeiffer *et al.*, 2021) and stimulation of hormone secretion in endocrine tissues vascularized by fenestrated capillaries (Lafont *et al.*, 2010 ; Almaça *et al.*, 2018 ; Jansson and Carlsson, 2019 ; Tamayo *et al.*, 2022). To determine whether changes within the neurohypophyseal microvasculature occur during vasopressin secretion, we used mice previously implanted with a GRIN lens and injected with FITC-Dextran 70kDa to monitor red blood cell (RBC) velocities in neurohypophyseal capillaries (Fig. 3A). After one or two days dehydration, the average neurohypophyseal RBC velocities measured over periods of 1sec of RBC velocity recordings remained unchanged between basal - hydrated ($320.5 \mu\text{m/s} \pm 38.88 \text{ SEM}$, n=40) and dehydrated (day 1 : $282.53 \mu\text{m/s} \pm 40.6 \text{ SEM}$, n=40 ; day 2 : $351.2 \mu\text{m/s} \pm 53.3 \text{ SEM}$, n = 32) states (Fig. 3B).

An important finding deals about the blood flow behavior in individual NH capillaries as observed from RBC velocity monitoring. When we quantified RBC velocity variations capillary per capillary, but not the whole field, we detected variations of $-7.25\% \pm 29.65 \text{ IQR}$ (n=56 vessels) in the basal state, for two following measurements from the same vessel. However, although the average RBC velocities within the whole field of image recording did

not differ in the dehydrated state (day 1 : $-17.85\% \pm 84.93$ IQR, $n=40$; day 2 : 12.8 ± 57.3 IQR), larger variations in RBC velocities in individual capillaries occurred, ranging from 222% to -89.4%, indicating that some capillaries either increased or decreased their RBC velocities while on the average these variations compensated between each other at the whole NH level (Fig. 3C). When absolute changes in RBC velocities were considered, there was a significant 58.21% increase in the amplitude of RBC velocity changes in individual capillaries between basal and dehydrated states, respectively ($p=0.0087$, analysis of variance (ANOVA)), ranging from 1.4% to 222.1% (Fig. 3C, Abs values). Furthermore, analysis of frequency distribution of RBC velocity changes showed a wider Gaussian distribution in dehydrated states (Fig. 3D). These results show that larger variations in RBC velocities take place during one- or two-days dehydration, although the overall capillary blood flow remains unchanged within the NH.

Similar trend in amplitude changes of RBC velocity changes in individual capillaries occurred within 20-40 min following a subcutaneous injection of 10%NaCl (200 μ L) although not significant (Fig. 3E-F). Analysis of frequency distribution of RBC velocity changes in individual capillaries showed a wider Gaussian distribution in response to hypertonic stimulation (Fig. 3G). Altogether our new experimental strategy based on cellular *in vivo* imaging of NH microvasculature in awake animals suggest that changes in NH capillary blood flow occur at the individual capillary level, characterized by either increasing or decreasing RBC velocities, in response to a physiological demand of AVP delivery into the systemic circulation.

NH Pericytes respond to AVP

Recent studies from our lab and others (Tamayo *et al.*, 2022 ; Michau *et al.*, 2022) have shown that laser-guided optogenetic stimulation of pericytes, mural contractile cells located around blood capillaries, are able to dynamically control RBC velocities in fenestrated capillaries from mouse pancreatic islets. Mouse NH capillaries are surrounded by two subsets of pericytes which were either derived from the neural crest (lineage-traced in Wnt1-Cre x ROSA26 fl/fl GCaMP6f mouse) (Fig. 4A-B) or NG2+ve (not shown). Since there is a larger density of neural crest-derived pericytes in mouse NH, we explored whether AVP could control cytosolic calcium, a key step in pericyte constriction (Alarcon-Martinez *et al.*, 2021), in NH pituitary slices from Wnt1-Cre x ROSA26 fl/fl GCAMP6f mice. In control conditions, GCAMP6f +ve cells surrounding capillaries displayed spontaneous calcium spikes (Fig. 4C, $n=7$). Slice perfusion

with 10nM AVP triggered a massive, monotonic increase in pericyte calcium levels (Fig. 4D, n=3) which slowly returned to basal levels upon AVP washout. Strikingly AVP responses of pituitary pericytes appeared specific to NH since neural crest-derived pericytes within the anterior pituitary failed to respond to AVP stimulation (Fig. 4E, n=2).

Discussion

One of the major challenges in neuroendocrinology is to identify the patterns of neurohormones released at neurohemal junctions which then control basic body functions. In the case of neurohormones secreted by parvocellular neurons such GnRH neurons, downstream stimulation of pituitary LH pulses are commonly used as surrogates of GnRH release profiles (Goodman *et al.*, 2022). In the case of neurohormones released by magnocellular neurons such as AVP, the current understanding and concept of AVP release patterning into the bloodstream have been based on electrophysiological signatures of supraoptic AVP neurons in anesthetized rodent models (Leng *et al.*, 2008 ; Leng and Russell, 2019 ; Leng *et al.*, 2015). This is however a lack of information about how AVP released from NH nerve endings leads to the build-up of AVP increase into the systemic circulation that is adequately decoded by the kidney upon water reabsorption regulation. This has prompted us to develop a logical approach to identify the characteristic features of AVP nerve terminals in their native, local NH microenvironment, including their functional relationship with capillary blood flow dynamics, in basal hydrated conditions as well as upon establishment of dehydration challenge. Our combined *in vivo/ex vivo* approach provides one of the most precise ways to identify how AVP secretion dynamics occur at the NH level. This may be of translational relevance since AVP is essential for normal body homeostasis and disrupted in pathological conditions.

Decoding of AVP nerve terminal dynamics at the NH level

Our new *in vivo* imaging strategy has allowed us to address the long-standing question of how multiple nerve terminals fire signals critical for neurohormone exocytosis at a neurohemal junction in awake animal models. Even though the information is limited due technical challenges, it is remarkable to record for the first time that NH nerve terminals fire coordinately *in vivo* even though the patterns of calcium spiking in these terminals adapt upon hypertonic stimulation. Although the question about how AVP neurons fire within supraoptic nuclei has been a matter of debates during the past decades (Leng and Russell, 2019 ; Leng *et al.*, 2008 ;

2015 ; Israel *et al.*, 2016 ; Richard *et al.*, 1997), our first *in vivo* recording of calcium spiking in NH nerve terminals suggests that multi-terminal coordination exists *in vivo* at the NH level which disappears when AVP terminals are monitored *ex vivo* in pituitary slices. Further experiments will be needed to validate such findings which would need improvements in GRIN lens implantation and imaging, such as inclined GRIN lens implantation as recently developed to record hypothalamic kisspeptin neurons *in vivo* (Moore *et al.*, 2022).

High precision interrogation of AVP nerve terminals and their relationship with NH microenvironment: a new avenue in understanding the regulation of AVP delivery into the systemic circulation

Our framework of *in vivo* and *ex vivo* technics to decipher how released AVP by nerve terminals leads to a bolus of AVP into the bloodstream, has unveiled hitherto unrecognized features of the local NH environment. First our data suggest that both acute hypertonic stimulation and sustained dehydration lead to a specific signature of local capillary blood flow changes. While acute salt loading leads to AVP neuron stimulation and a global decrease of blood flow in the supraoptic nuclei (Roy *et al.*, 2021), marked changes in blood flow were monitored in both directions (increasing or decreasing) in individual NH capillaries while no significant changes in the overall blood flow rates occurred within the NH in awake animals. First, the maintenance of an overall NH capillary blood flow rate of $\sim 300\mu\text{m}/\text{sec}$ suggests the existence of NH “autoregulation” which keeps appropriate NH capillary blood flow despite changes in upstream arterial pressure. Moreover, this autoregulation process may protect NH functioning from “side” effects of prolonged, intense changes in blood flow as was recently observed in pancreatic islets in which sustained high blood flow in fenestrated capillaries increases susceptibility to immune attack (Ullsten *et al.*, 2020). Second, it is remarkable that some capillaries increase their blood flow rates while others decrease blood circulation upon AVP stimulation in response to a dehydration challenge. Such increase in flow rate may lead to appropriate oxygen supply to nearby stimulated AVP terminals as suggested by earlier *ex vivo* experiments (Cazalis *et al.*, 1987 ; Shibuki, 1989). The origin of these increases in capillary blood flow is currently unknown and will need to be characterized in detail in future studies. Candidates such as nitric oxide which triggers vessel dilation in supraoptic nuclei will be of interest to study (Du *et al.*, 2015). Conversely, AVP locally released into the NH may be involved in decreases in capillary blood flow via a stimulatory action on contractile neural crest-derived pericytes. Such contribution of AVP to regulate blood flow may be further amplified by the ultrashort positive feedback exerted by vasopressin and mediated by V1a and O_xR

receptors, either directly or indirectly via pituicytes, on cytosolic calcium in AVP nerve terminals.

In summary, our toolkit enables the interrogation of NH functioning in awake mammalian models and the study of how vasopressin is delivered into the systemic circulation in response to physiological and pathological demands since animals can be studied for days to months during which they act as their own controls. Finally, our findings might prompt a reassessment of the neurohemal junction where a functional and dynamic relationship might exist between NH nerve terminals and changes in blood flow in nearby fenestrated capillaries. Deciphering alterations of this NeuroEndocrine-Vascular Unit (NEVU) in mouse models could better define dysfunction in circulating neurohormone levels as routinely detected in central diabetes insipidus that is a rare disease with a prevalence of ~ 1 in 25,000 individuals (Atila *et al.*, 2022).

Acknowledgments

We thank all members of the Montpellier core facilities IPAM (ISO 9001-2015 quality certified) and iExplore for their unconditional support and thoughtful comments during the course of this work. We also thank Freddy Jeanneteau for providing us the AVP-Cre mouse model. The authors were supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE14-0017-01), France-Bioimaging (INBS10-GaL/AR-11/12), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, and Université de Montpellier (to P.M.). C.B. was supported by a fellowship from the joined PhD program between CNRS (France) and the Weizmann Institute of science (Israel).

References

Alarcon-Martinez, Luis, Muge Yemisci, and Turgay Dalkara. 2021. “Pericyte Morphology and Function.” *Histology and Histopathology* 36 (6): 633–43.

<https://doi.org/10.14670/HH-18-314>.

Almaça, Joana, Jonathan Weitz, Rayner Rodriguez-Diaz, Elizabeth Pereira, and Alejandro Caicedo. 2018. “The Pericyte of the Pancreatic Islet Regulates Capillary Diameter and Local Blood Flow.” *Cell Metabolism* 27 (3): 630-644.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.016>.

Atila, Cihan, Paul Benjamin Loughrey, Aoife Garrahy, Bettina Winzeler, Julie Refardt, Patricia Gildroy, Malak Hamza, et al. 2022. “Central Diabetes Insipidus from a Patient’s

- Perspective: Management, Psychological Co-Morbidities, and Renaming of the Condition: Results from an International Web-Based Survey.” *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8587 (22): 1–10. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(22\)00219-4](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(22)00219-4).
- Balland, Eglantine, Julie Dam, Fanny Langlet, Emilie Caron, Sophie Steculorum, Andrea Messina, S Rasika, et al. 2015. “Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain.” *Cell Metab* 19 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015.Hypothalamic>.
- Brownstein, Michael J, James T Russel, and Harold Gainer. 1980. “Synthesis, Transport, and Release of Posterior Pituitary Hormones.” *Science* 207: 373–78.
- Burbach, J. P.H., S. M. Luckman, D. Murphy, and H. Gainer. 2001. “Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System.” *Physiological Reviews* 81 (3): 1197–1267. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1197>.
- Cazalis, Monique, Govindan Dayanithi, and Jean J. Nordmann. 1987. “Hormone Release from Isolated Nerve Endings of the Rat Neurohypophysis.” *J. Physiol* 390: 55–70.
- Du, Wenting, Javier E. Stern, and Jessica A. Filosa. 2015. “Neuronal-Derived Nitric Oxide and Somatodendritically Released Vasopressin Regulate Neurovascular Coupling in the Rat Hypothalamic Supraoptic Nucleus.” *Journal of Neuroscience* 35 (13): 5330–41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3674-14.2015>.
- Duquenne, Manon, Cintia Folgueira, Cyril Bourouh, Marion Millet, Anisia Silva, Jérôme Clasadonte, Monica Imbernon, et al. 2021. “Leptin Brain Entry via a Tanycytic LepR–EGFR Shuttle Controls Lipid Metabolism and Pancreas Function.” *Nature Metabolism* 3 (8): 1071–90. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00432-5>.
- Fidler Lim, Nancy, Martha C. Nowycky, and Richard J. Bookman. 1990. “Direct Measurement of Exocytosis and Calcium Currents in Single Vertebrate Nerve Terminals.” *Nature*. <https://doi.org/10.1038/344449a0>.
- Hatton, G. I., R. J. Bicknell, J. Hoyland, R. Bunting, and W. T. Mason. 1992. “Arginine Vasopressin Mobilises Intracellular Calcium via V1-Receptor Activation in Astrocytes (Pituicytes) Cultured from Adult Rat Neural Lobes.” *Brain Research* 588 (1): 75–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91346-G](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91346-G).
- Hoa, Ombeline, Chrystel Lafont, Pierre Fontanaud, Anne Guillou, Yasmine Kemkem,

- Rhonda D. Kineman, Raul M. Luque, Tatiana Fiordelisia Coll, Paul Le Tissier, and Patrice Mollard. 2019. “Imaging and Manipulating Pituitary Function in the Awake Mouse.” *Endocrinology* 160 (10): 2271–81. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00297>.
- Israel, Jean Marc, Stéphane H. Oliet, and Philippe Ciofi. 2016. “Electrophysiology of Hypothalamic Magnocellular Neurons in Vitro: A Rhythmic Drive in Organotypic Cultures and Acute Slices.” *Frontiers in Neuroscience* 10 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00109>.
- Jansson, Leif, and Per Ola Carlsson. 2019. “Pancreatic Blood Flow with Special Emphasis on Blood Perfusion of the Islets of Langerhans.” *Comprehensive Physiology* 9 (2): 799–837. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160050>.
- Jung, Hyun Jun, and Tae Hwan Kwon. 2016. “Molecular Mechanisms Regulating Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct.” *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 311 (6): F1318–28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00485.2016>.
- Kim, Tyson N., Patrick W. Goodwill, Yeni Chen, Steven M. Conolly, Chris B. Schaffer, Dorian Liepmann, and Rong A. Wang. 2012. “Line-Scanning Particle Image Velocimetry: An Optical Approach for Quantifying a Wide Range of Blood Flow Speeds in Live Animals.” *PLoS ONE* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038590>.
- Lafont, Chrystel, Michel G. Desarménien, Mathieu Cassou, François Molino, Jérôme Lecoq, David Hodson, Alain Lacampagne, et al. 2010. “Cellular in Vivo Imaging Reveals Coordinated Regulation of Pituitary Microcirculation and GH Cell Network Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9): 4465–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902599107>.
- Leng, Gareth, Colin Brown, Nancy Sabatier, and Victoria Scott. 2008. “Population Dynamics in Vasopressin Cells.” *Neuroendocrinology* 88 (3): 160–72. <https://doi.org/10.1159/000149827>.
- Leng, Gareth, Celine Caquineau, and Nancy Sabatier. 2005. “Regulation of Oxytocin Secretion.” *Vitamins and Hormones* 71 (05): 27–58. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)71002-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)71002-5).
- Leng, Gareth, Rafael Pineda, Nancy Sabatier, and Mike Ludwig. 2015a. “The Posterior Pituitary, from Geoffrey Harris to Our Present Understanding.” *Journal of Endocrinology* 226 (2): T173–85. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087>.

- . 2015b. “The Posterior Pituitary, from Geoffrey Harris to Our Present Understanding.” *Journal of Endocrinology* 226 (2): T173–85. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087>.
- Leng, Gareth, and John A. Russell. 2019. “The Osmoresponsiveness of Oxytocin and Vasopressin Neurones: Mechanisms, Allostasis and Evolution.” *Journal of Neuroendocrinology* 31 (3): 1–17. <https://doi.org/10.1111/jne.12662>.
- Michau, Aurélien, Chrystel Lafont, Paula Bargi-Souza, Yasmine Kemkem, Anne Guillou, Magalie A. Ravier, Gyslaine Bertrand, et al. 2022. “Metabolic Stress Impairs Pericyte Response to Optogenetic Stimulation in Pancreatic Islets.” *Frontiers in Endocrinology* 13 (June): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.918733>.
- Moore, Aleisha M., Lique M. Coolen, and Michael N. Lehman. 2022. “In Vivo Imaging of the GnRH Pulse Generator Reveals a Temporal Order of Neuronal Activation and Synchronization during Each Pulse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2117767119>.
- Nowycky, Martha C., Elizabeth P. Seward, and Natalya I. Chernevskaia. 1998. “Excitation-Secretion Coupling in Mammalian Neurohypophysial Nerve Terminals.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 18 (1): 65–80. <https://doi.org/10.1023/A:1022575126738>.
- Pfeiffer, Thomas, Yuening Li, and David Attwell. 2021. “Diverse Mechanisms Regulating Brain Energy Supply at the Capillary Level.” *Current Opinion in Neurobiology* 69: 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.010>.
- Pnevmatikakis, Eftychios A., and Andrea Giovannucci. 2017. “NoRMCorre: An Online Algorithm for Piecewise Rigid Motion Correction of Calcium Imaging Data.” *Journal of Neuroscience Methods* 291: 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>.
- Richard, Philippe, Françoise Moos, Govindan Dayanithi, Laurent Gouzènes, and Nancy Sabatier. 1997. “Rhythmic Activities of Hypothalamic Magnocellular Neurons: Autocontrol Mechanisms.” *Biology of the Cell* 89 (9): 555–60. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(98\)80159-7](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(98)80159-7).
- Romanò, Nicola, Anne Guillou, David J. Hodson, Agnès O. Martin, and Patrice Mollard. 2017. “Multiple-Scale Neuroendocrine Signals Connect Brain and Pituitary Hormone Rhythms.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (9): 2379–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616864114>.

- Roy, Ranjan K., Ferdinand Althammer, Alexander J. Seymour, Wenting Du, Vinicia C. Biancardi, Jordan P. Hamm, Jessica A. Filosa, Colin H. Brown, and Javier E. Stern. 2021. “Inverse Neurovascular Coupling Contributes to Positive Feedback Excitation of Vasopressin Neurons during a Systemic Homeostatic Challenge.” *Cell Reports* 37 (5): 109925. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109925>.
- Schaeffer, Marie, Fanny Langlet, Chrystel Lafont, François Molino, David J. Hodson, Thomas Roux, Laurent Lamarque, et al. 2013. “Rapid Sensing of Circulating Ghrelin by Hypothalamic Appetite-Modifying Neurons.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4): 1512–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>.
- Shibuki, Katsuei. 1989. “Calcium-Dependent and Ouabain-Resistant Oxygen Consumption in the Rat Neurohypophysis.” *Brain Research* 487 (1): 96–104. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90944-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90944-X).
- Tamayo, Alejandro, Luciana Mateus Gonçalves, Rayner Rodriguez-Diaz, Elizabeth Pereira, Melissa Canales, Alejandro Caicedo, and Joana Almaça. 2022. “Pericyte Control of Blood Flow in Intraocular Islet Grafts Impacts Glucose Homeostasis in Mice.” *Diabetes* 71 (8): 1679–93. <https://doi.org/10.2337/db21-1104>.
- Ullsten, Sara, Daniel Espes, My Quach, Malin Fex, Monica Sandberg, and Per Ola Carlsson. 2020. “Highly Blood Perfused, Highly Metabolically Active Pancreatic Islets May Be More Susceptible for Immune Attack.” *Physiological Reports* 8 (13): 1–11. <https://doi.org/10.14814/phy2.14444>.
- Zhang, Y, M Rózsa, D Bushey, J Zheng, D Reep, G J Broussard, A Tsang, et al. 2020. “JGCaMP8: A New Suite of Fast and Sensitive Calcium Indicators.” *Janelia*, 8.

Figure 1. Basal calcium activity of NH nerve terminals in wild-type and AVP-Cre mice.

A. Schematic representation of stereotaxic injection of AAV9-CAG-GCaMP6s-WPRE-SV40 and the setup used to record *in-vivo* neurohypophyseal terminal activity in head-fixed configuration (wild-type mouse). B. Neurohypophyseal nerve terminals expressing the calcium-sensitive GCaMP6 sensor imaged through a GRIN lens (scale = 100 μ m) (wild-type mouse). C. Illustration of patterns of calcium spikes in basal (left, top panels) and dehydrated states (right, top panel) and related raster plots (bottom panels). D. Schematic representation of stereotaxic injection of AAV9-Syn-GCaMP8s-WPRE-SV40 (wild-type mice) or AAV9-CAG-fl-GCaMP8s-fl-WPRE-SV40 (AVP-Cre mice) and the setup used to record *ex-vivo* calcium activity in nerve terminals (wild-type or AVP-Cre mice). E. *Ex-vivo* slice showing the recording field of mouse neurohypophysis (scale = 100 μ m, left panel) and calcium activities in neurohypophyseal nerve terminals in basal condition (white arrows, scale = 100 μ m, right panel). F. Two distinct profiles of calcium activities detected in nerve terminals in WT mice. G. Calcium activity profiles in vasopressin nerve terminals recorded in pituitary slices from AVP-Cre mice.

Figure 2. Effect of vasopressin on neuronal terminals and positive feedback mediated by V1a and OxR receptors (ex vivo studies from AVP-Cre mice).

A. Calcium activity of AVP terminals in basal condition (1), under 10-8M AVP stimulation (2) and during wash out (8). B. Calcium activity of AVP terminals in basal condition (1), under 10-8M AVP and 10-6M V1a antagonist stimulation (3) and during wash out (8). C. Calcium activity of AVP terminals in basal condition (1), under 10-8M AVP and 10-6M OxR antagonist stimulation (4) and during wash out (8). D. Calcium activity of AVP terminals in basal condition (1), under 10-6M V1a and OxR antagonist stimulation (5) followed by 10-6M V1a and OxR antagonists and 10-8M AVP (6), and during wash out (8).

Figure 3. Local NH blood flow changes in mouse neurohypophysis upon dehydration.

A. Illustration of the head-fixed configuration and capillary field observed throughout a GRIN lens (scale bar = 100 μ m). B. RBC velocity (μ m/s) of NH capillaries in basal condition (n=40 vessels) and after one (n=40 vessels) or two days (n=32 vessels) of dehydration. C. Relative (left) and absolute (right) RBC velocity variation (%) in basal condition (n = 56 vessels) and after one (n=40 vessels) or two days (n=32 vessels) of dehydration (Kruskal-Wallis test, *: p=0.0226 ; **: p = 0.0099 ; ****: p < 0.0001). D. Relative frequency in % of RBC velocity variations (%) in basal condition (black dashed lines) and after one (red dashed lines) or two days (pink dots) of dehydration. Straight lines represent the Gaussian function of variations in RBC velocities (black and red lines for basal and dehydrated conditions, respectively). E. RBC velocities (μ m/s) of NH capillaries in basal condition (n=43 vessels) and after a subcutaneous injection of 10% NaCl (n=43 vessels). F. Relative (left) and absolute (right) RBC velocity variations (%) in basal condition (n = 43 vessels) and after a subcutaneous injection of 10% NaCl (n= 43 vessels) (One-way ANOVA test, ***: p=0.0004 ; ****: p < 0.0001). G. Relative frequency in % of the RBC velocity variation (%) in basal condition (black dashed lines) and after a subcutaneous injection of 10% NaCl red dashed lines. Straight lines represent the Gaussian function of the variations in RBC velocities (black and red lines for basal and dehydrated conditions, respectively).

Figure 4. Pericytes activity during a stimulation of vasopressin. A,B. Whole NH (A) and NH field (B) of Wnt1-Cre x ROSA26 fl/fl GCaMP6f mouse are shown. Immunostaining for GCaMP6f (green, neural crest-derived pericytes) and PCAM (marker of capillaries; red) was performed. Scale bars: 50µm and 30µm, respectively. C. Basal calcium activity of neural crest-derived pericytes in the neurohypophysis (*ex vivo*). Left panel, raster plots of calcium levels in individual NH pericytes, pseudo-color coding from black to white upon calcium raising. Right panel, low amplitude calcium spikes recorded in one pericyte (indicated by the horizontal line in left panel). D. Calcium activity of neural crest-derived pericytes in the neurohypophysis *ex vivo* during basal condition (left), under 10⁻⁸M AVP stimulation (middle) and during washout (right). Left panel, raster plots of calcium levels in individual NH pericytes. Right panel, two pericyte calcium responses to AVP. E. Calcium activity of neural crest-derived pericytes in the adenohypophysis during basal condition (right), under 10⁻⁸M AVP stimulation (middle) and washout (right). Left panel, raster plots of calcium levels in individual anterior pituitary pericytes. Right panel, spontaneous calcium spiking profile and lack of AVP response recorded in one neural crest-derived pericyte.

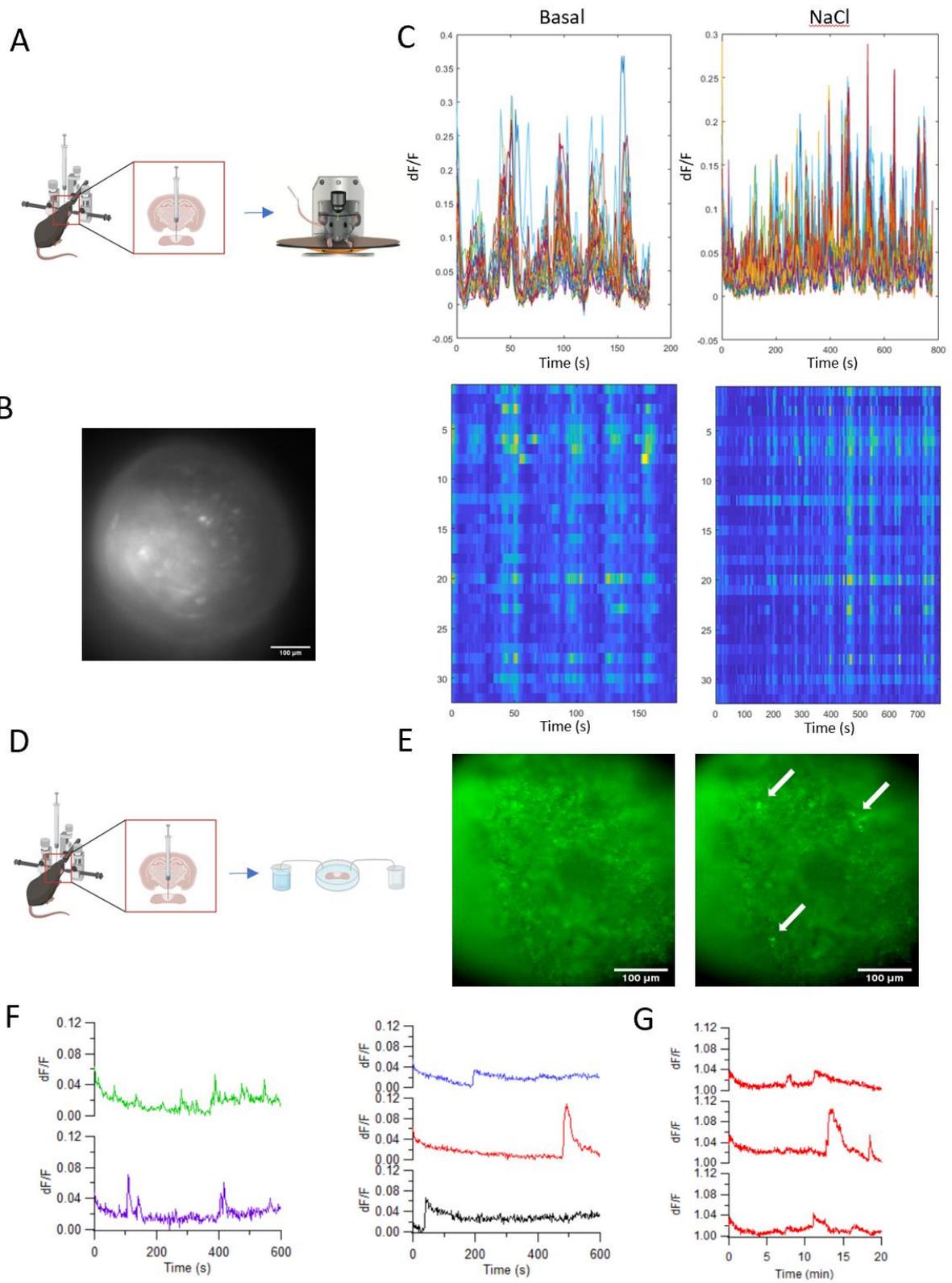


Figure 1

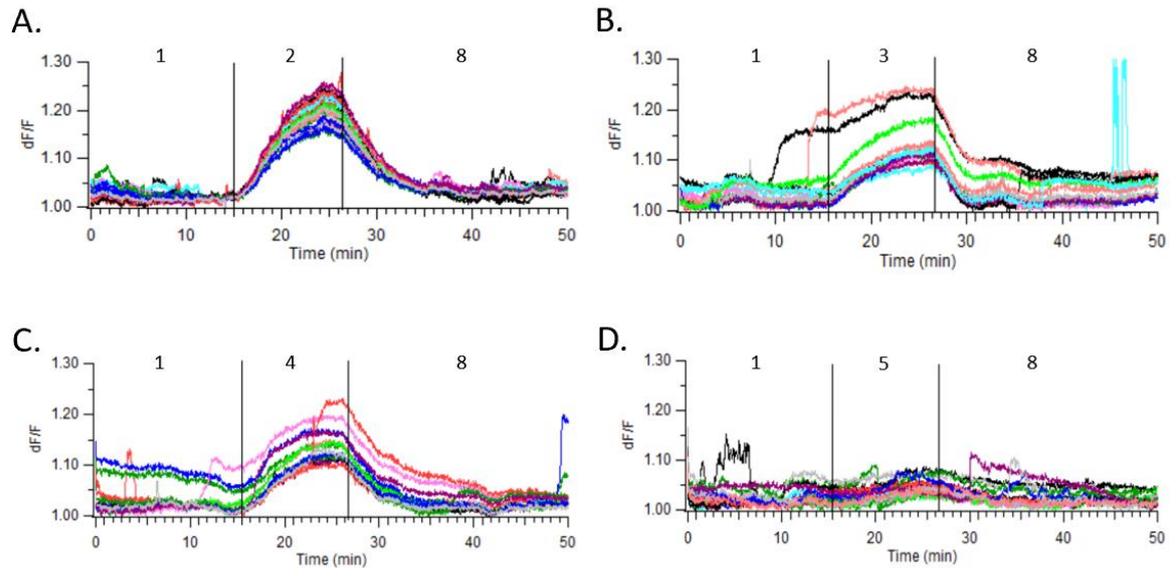


Figure 2

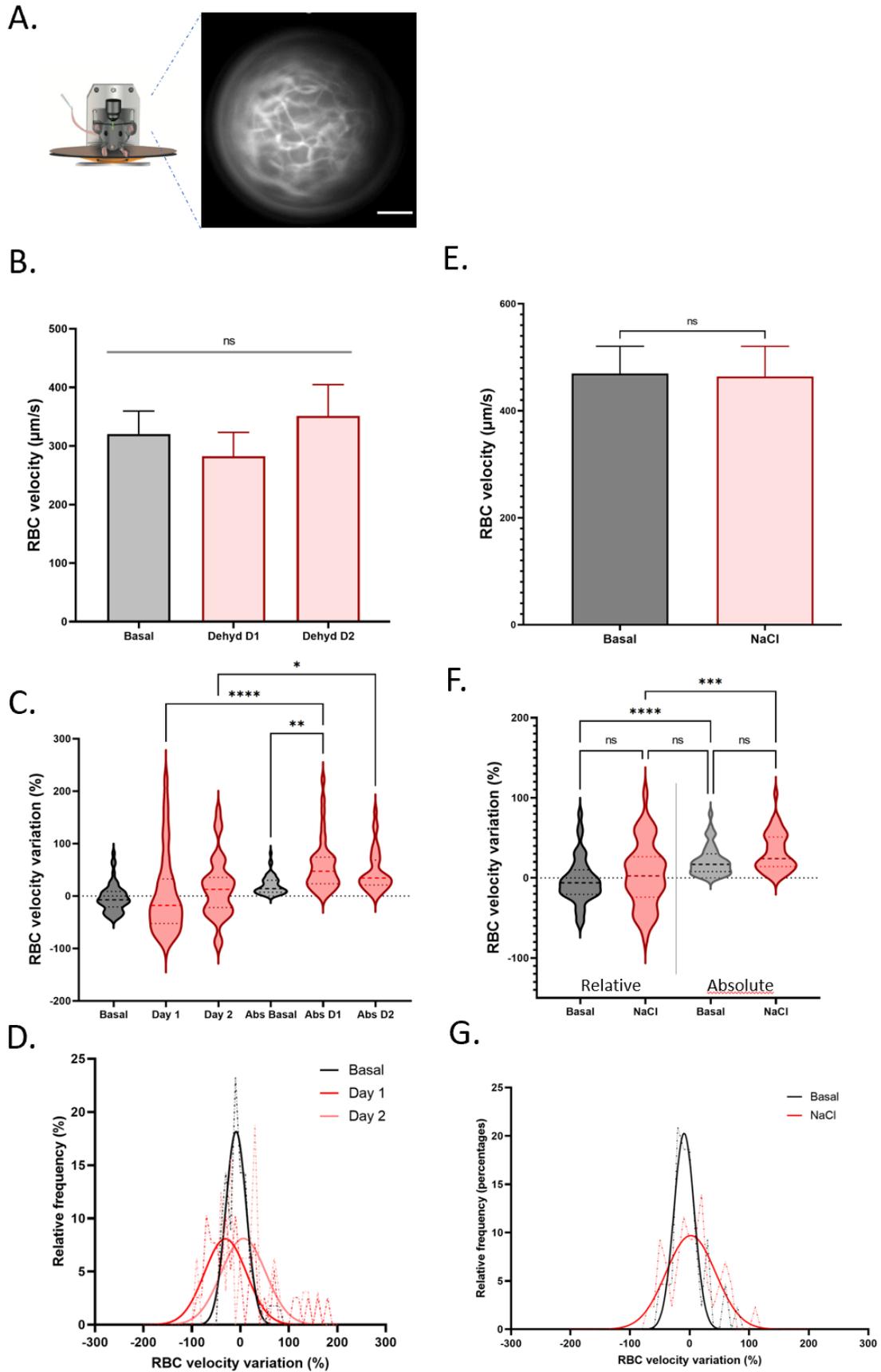


Figure 3

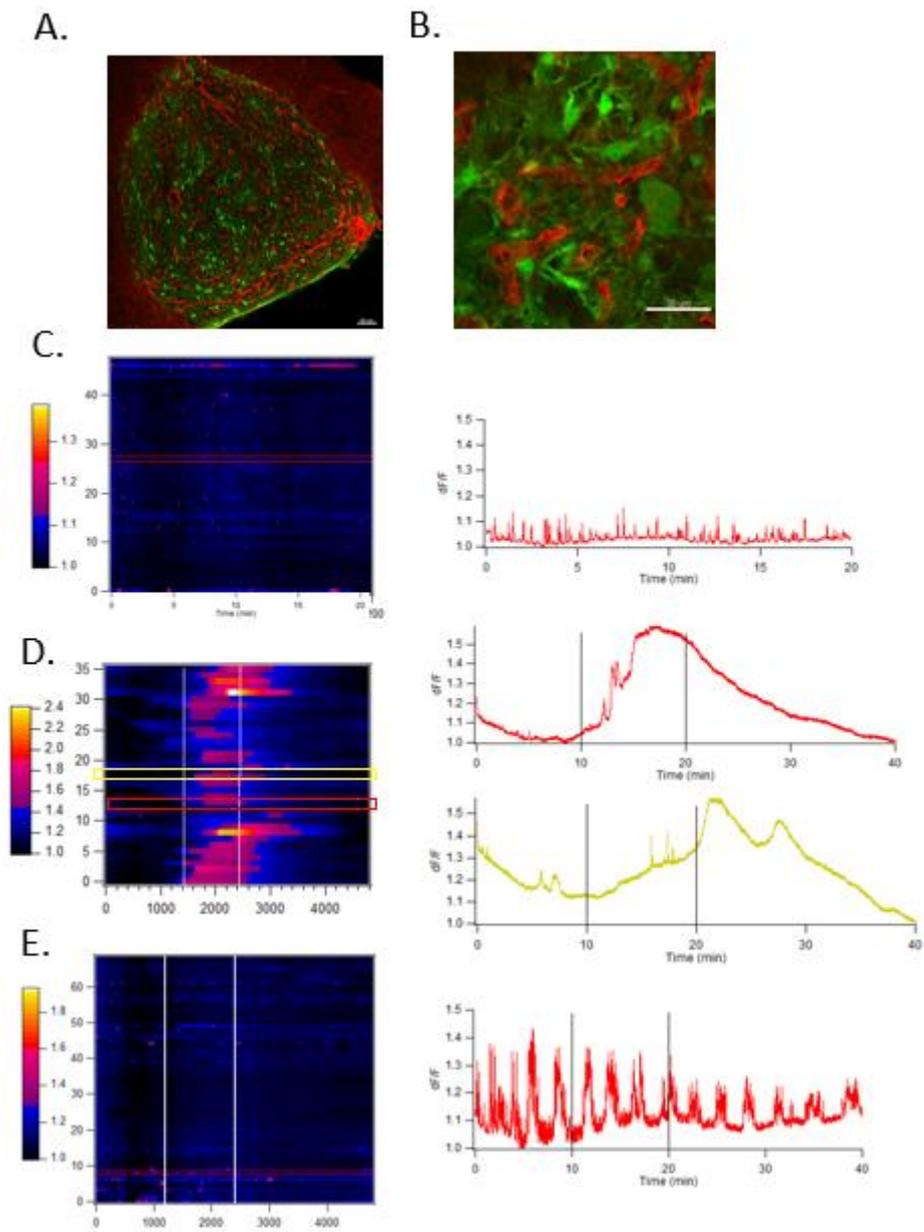


Figure 4

B. Senseur sensible à la vasopressine : V2R-cpFP

1. Matériels et méthodes

Les biosenseurs sont des outils biologiques capables de détecter, par l'émission de fluorescence, la présence de molécules en très petites quantités. Afin de pouvoir suivre la sécrétion de neurohormones, nous avons décidé de développer un senseur sensible à la vasopressine. Cela nous semblait en effet être un besoin pour bien comprendre la relation *in vivo* entre la vasopressine sécrétée et le microenvironnement neurohypophysaire lors d'une déshydratation (Voir résultats A ci-dessus). Pour ce faire, il a fallu dans un premier temps créer la séquence protéique de notre gène synthétique puis créer un plasmide contenant ce gène. Le senseur a ensuite été testé sur culture cellulaire avant d'en produire un virus adéno-associé (AAV) potentiellement capable d'infecter des animaux *in-vivo* au niveau de la neurohypophyse.

a) Création du gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine.

Afin d'obtenir les différents éléments constitutifs de notre gène synthétique, nous nous sommes basés sur les méthodes utilisées lors du développement des senseurs sensibles aux neurotransmetteurs comme l'acétylcholine ou la dopamine (Patriarchi *et al.*, 2018 ; Jing *et al.*, 2018). Nous avons choisi d'utiliser le récepteur humain de la vasopressine 2 (V2Rh), en suivant les conseils de Bernard Mouillac, spécialiste des récepteurs à la vasopressine. En effet, il s'agit d'un récepteur connu pour être présent dans les reins et possédant une bonne affinité pour la vasopressine. De plus, puisqu'il s'agit du récepteur humain, il n'est pas présent chez la souris.

Le V2Rh est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Il possède trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. D'après la littérature sur ces nouveaux senseurs de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs, la cpGFP a été introduite dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur à l'aide des linker LSSLE et LPDQL, entre les acides aminés Alanine234 et Histidine261. En effet, la liaison de la vasopressine va conduire à un changement de conformation des domaines transmembranaires et ce mouvement va permettre à la cpGFP introduite de changer de caractéristiques d'émission de fluorescence.

Une séquence Kosak a également été ajoutée. Il s'agit d'un motif d'acide nucléique qui sert de site d'initiation de la traduction des protéines ainsi qu'un flag afin de permettre de suivre notre senseur. De plus, le gène synthétique possède deux enzymes de restrictions, BamH1 et EcoR1 afin de permettre l'insertion de la séquence dans un plasmide.

BamH1

GCCACCATGG

MKTIIALS YIFCLVFADYKDDDDA

MASTTSAVPGHPSLPSLPSNSSQERPLDTRDPLLARAELALLSIVFVAVALSNGLV

LAALARRGRRGHWAPIHVFIGHLCLADLAVALFQVLPQLAWKATDRFRGPDAL

CRAVKYLQMVGM YASSYMILAMTLDRHRAICRPMLAYRHGSGAHWNRPV LVA

WAFSLLLSLPQLFIFAQRNVEGGSGVTDCWACFAEPWGRRTYVTWIALMV FVA

PTLGIAACQVLIFREIHA

LSSLE

NYIKADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLAYHYQQNTPIGDGPVLLPDNH YLSVQS

KLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVSKGEELFTGVVPILVE

LDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRY

PDHMKQHDFFKSAMPEGYIQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGID FKE

DGNILGHKLEYN

LPDQL

HVSAAVAKTVRMTLVIVVVYVLCWAPFFLVQLWAAWDPEAPLEGAPFVLLMLL

ASLNSCTNPWIYASFSSSVSSELRSLLCCARGRTPPSLGPQDESCCTASSSLAKDTS

S

Codon stop

EcoR1

Figure 18 : Gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine. Bleu : enzymes de restriction. Rose : Séquence Kosak. Jaune : Récepteur V2Rh. Gris : Linker. Vert : cpGFP

Le gène synthétique a ensuite été produit dans un vecteur plasmidique pEX qui est conçu pour surexprimer des gènes clonés dans E. coli.

b) Création d'un plasmide AAV contenant le gène synthétique du biosenseur sensible à la vasopressine.

Afin de pouvoir tester l'efficacité du biosenseur sur des cellules HEK, il a fallu procéder à différentes étapes pour exprimer le gène synthétique dans un vecteur viral AAV. Dans un premier temps, le vecteur pAAV-CAG-GFP (ref #37825 Addgene) qui nous a paru particulièrement intéressant a été sélectionné. En effet, il contient le promoteur ubiquitaire Chicken b-Actin (CAG) ainsi que l'élément régulateur post-transcriptionnel du virus de l'hépatite Woodchuck (WPRE) qui permet d'augmenter l'expression des gènes délivrés par les vecteurs viraux. De plus, il possède les sites de restrictions BamH1 et EcoR1, il est donc possible de remplacer la GFP présente par le gène synthétique. Enfin l'efficacité d'expression des AAV-CAG s'est avérée bonne à excellente dans des travaux antérieurs du laboratoire d'injections *in vivo* d'AAVs dans l'hypophyse antérieure de souris (Hoa et al. 2019).

(1) Transformations bactériennes

La transformation bactérienne est une technique qui consiste à introduire des gènes d'intérêt dans des bactéries et à amplifier les vecteurs d'intérêts. Pour créer le plasmide du biosenseur sensible à la vasopressine, différents types de bactéries ont été utilisés : des bactéries DH5 α et des bactéries NEBStable. Ces deux souches sont des bactéries compétentes dérivées d'E. coli. La particularité des bactéries NEBStable est qu'elles permettent d'éviter les recombinaisons plasmidiques en leur sein.

(a) Transformation bactérienne de pEX-V2R-cpGFP dans des bactéries DH5 α

La transformation s'effectue en milieu stérile, sous flamme de bec-benzène. 1 μ L du vecteur pEX-V2R-cpGFP est introduit dans 50 μ L de bactéries DH5 α . Après trente minutes d'attente, un choc thermique est réalisé au bain-marie à 42°C pendant trente secondes. Il permet de créer des pores dans la membrane plasmique de la bactérie et ainsi faire entrer l'ADN plasmidique

dans la cellule bactérienne. Du milieu SOC, riche en glucose, est ajouté. Les bactéries sont ensuite incubées 1h à 37°C et agitées à 300rpm afin de les faire pousser. Puis, les bactéries sont étalées sur des boîtes de culture contenant de l'agar et de l'ampicilline, afin de pouvoir sélectionner uniquement les bactéries contenant le vecteur d'intérêt, celui-ci étant résistant à cet antibiotique.

(b) Transformation bactérienne de pAAV-CAG-V2R-cpGFP dans des bactéries NEB Stable

La transformation s'effectue en milieu stérile, sous flamme de bec-benzène. Les bactéries NEB Stable sont mises sur glace pendant 10min. 1µL contenant 10ng d'ADN plasmidique de pAAV-CAG-V2R-cpGFP est ajouté aux bactéries et mélangé par retournement. La préparation est ensuite placée sur glace pendant 30 min. Un choc thermique est effectué à 42°C dans un bain-marie pendant 30 secondes puis les bactéries sont remises sur glace pendant 5min. 950µL de milieu NEB 10-beta sont ajoutés. Les bactéries sont ensuite placées à 30°C pendant 60min et agitées à 250rpm. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte et incubées sur la nuit à 37°C.

(i) Croissance bactérienne

Une fois que le matériel génétique a été introduit dans les bactéries, il est important que ces dernières se développent et se divisent afin de pouvoir extraire par la suite l'ADN plasmidique. Pour ce faire, une solution de 3mL contenant une colonie bactérienne portant l'ADN plasmidique d'intérêt et 3mL de milieu Lysogeny Broth (LB) et 3µL d'ampicilline est incubée sur la nuit à 37°C.

(ii) Extraction d'ADN plasmidique :
minipréparation

La minipréparation est une technique qui consiste à extraire des bactéries ayant subi une transformation d'une petite quantité d'ADN plasmidique. Cette minipréparation a été effectuée

à l'aide du kit QIA Prep Spin Miniprep (Quiagen). Les bactéries préalablement incubées sur la nuit à 37°C dans du milieu de culture LB sont centrifugées et le culot est suspendu une nouvelle fois dans différents tampons puis centrifugé de nouveau. Le surnageant est placé dans une colonne et après de nouvelles étapes de centrifugation et de suspension dans différents tampons, l'ADN est extrait et élué dans un tampon. La quantité d'ADN plasmidique extraite est ensuite dosée au nanodrop.

(c) Clivage des ADN plasmidiques pAAV-CAG-GFP et pEX-V2R-cpGFP

Afin d'obtenir le plasmide du senseur pAAV-CAG-V2R-cpGFP, les plasmides pAAV-CAG-GFP et pEX-V2R-cpGFP ont été clivés afin de retirer la GFP pour le premier et le vecteur pEX pour le second. Ces deux plasmides possèdent les sites de restrictions BamH1 et EcoR1, il est donc possible de les cliver au niveau de ces deux sites. Pour ce faire, 1µg d'ADN du plasmide d'intérêt, 1µL de BamH1 et 1µL d'EcoR1 avec du tampon cutsmart 10x ont été mélangés et laissés incuber 2h à 37°C.

Pour vérifier que les plasmides ont bien été clivés, nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique qui va s'effectuer sur le gel d'agarose. Les plus petites molécules vont se déplacer plus rapidement et migreront donc plus loin sur le gel que les molécules de plus grande taille. Pour faire migrer l'ADN, le gel est placé dans un tampon d'électrophorèse : le Tris Acétate EDTA (TAE). Du midori green est ajouté afin de pouvoir visualiser, sous rayonnements ultraviolets, les différents fragments d'ADN. La migration effectuée, les différents poids moléculaires sur le gel sont analysés à l'aide d'une échelle de marqueur de poids moléculaire.

(d) Ligation du vecteur pAAV-CAG et de l'insert V2R-cpGFP

(i) Extraction et purification de l'ADN sur gel d'agarose

L'ADN est extrait et purifié à l'aide du kit QUIquick Gel Extraction Kit et QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Qiagen). Les fragments d'ADN d'intérêt, le vecteur pAAV-CAG et l'insert V2R-cpGFP, présents sur le gel sont extraits à l'aide d'un scalpel et placés dans un tube. Avant d'être incubé 10 min à 50°C puis vortexé, du tampon est ajouté. Une fois le gel dissous et la mixture devenue jaune, 1 µL d'isopropanol est ajouté et l'échantillon est placé dans une colonne. Après centrifugation, le surnageant est retiré. Un nouveau tampon est ajouté dans le tube afin de laver l'ADN. Une nouvelle centrifugation est effectuée, le surnageant est retiré et l'ADN est élué dans un tampon. La concentration de l'ADN du vecteur et l'insert est ensuite dosée au nanodrop.

(ii) Ligation du vecteur pAAV-CAG et de l'insert V2R-cpGFP

Le vecteur pAAV-CAG et l'insert V2R-cpGFP ont été liés en suivant le protocole *Ligation Protocol with T4 DNA Ligase* (M0202). Dans un premier temps, le ratio vecteur/insert en fonction de la concentration en ADN et le nombre de paires de bases a été calculé à l'aide de NEBioCalculator. 2,8 µL de vecteur, 15 µL d'insert, 2,1 µL de tampon 10x et 1 µL de T4 ligase ont été ajoutés dans un tube et incubés 2h à température ambiante.

Une transformation bactérienne du plasmide pAAV-CAG-cpGFP est ensuite effectuée dans des bactéries NEB stable (2.a) puis l'ADN plasmidique est extrait des bactéries à l'aide d'une minipréparation (2.c). L'ADN récupéré est ensuite dosé au nanodrop.

Afin de vérifier que la ligation s'est bien effectuée, le plasmide pAAV-CAG-V2R-cpGFP a été clivé grâce aux enzymes de restriction EcoR1 et BamH1 (2.d) et vérifié sur gel d'agarose. Puis, les échantillons ont été envoyés à séquencer chez Neurofins.

(2) Détection de la sécrétion de vasopressine in-vitro

Pour vérifier le bon fonctionnement du senseur sensible à la vasopressine développée, différents tests sur cellules HEK magic ont été réalisés.

(a) Culture cellulaire de HEK293 et transfection

Les cellules 293 de rein embryonnaire humain (HEK293) ont été cultivées dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplémenté en sérum et antibiotiques. Puis, les cellules sont ensemencées sur des lamelles de 18mm de diamètre dans des plaques 12 puits préalablement revêtues de polyarnitine 10x. Elles sont ensuite transfectées avec 500ng ou 1µg de plasmide pAAV-CAG-V2R-cpGFP pour 180 000 cellules par puits, à l'aide de l'agent de transfection Xtreme Gene Sigma.

(b) Observation de la détection de vasopressine in-vitro

Les lamelles contenant les cellules HEK293 transfectées avec le senseur sont placées au centre d'une chambre de perfusion dans du milieu KREBS-tris filtré. Le milieu circule à un débit de 1mL/min à l'aide d'une pompe de perfusion. Il faut 4 minutes 30 secondes pour que le milieu atteigne la cuve et 6 minutes pour que la cuve soit entièrement remplie. Les lamelles sont observées à l'aide du microscope Discovery (Zeiss Discovery V.12, Carl Zeiss, Jena, Germany) avec une lampe fluorescente Lambda LS (Sutter Instrument Company, Novato, CA) et une camera SCMOS (ORCA Flash 4.0 C11440, Hamamatsu, Japan). L'acquisition s'effectue à 1Hz à l'aide du logiciel Metamorph 7.8.9 (Molecular Devices, California, USA). Différentes concentration d'AVP (1nM à 10µM) sont utilisées selon différents protocoles :

(i) 1 concentration

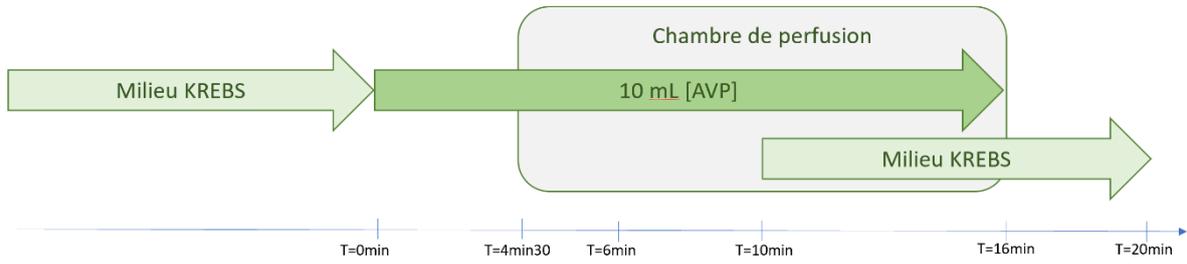


Figure 19 : Schéma représentant le protocole de perfusion d'AVP sur les cellules HEK pour une concentration d'AVP. $t=0$: départ d'AVP. $t=4\text{min}30$: arrivée d'AVP dans la chambre de perfusion. $t=6\text{min}$: Chambre remplie d'AVP. $T=10\text{min}$: départ du milieu KREBS. $t=16\text{min}$: Chambre remplie de Milieu KREBS. $T=20\text{min}$: fin d'acquisition.

(ii) Plusieurs concentrations d'AVP

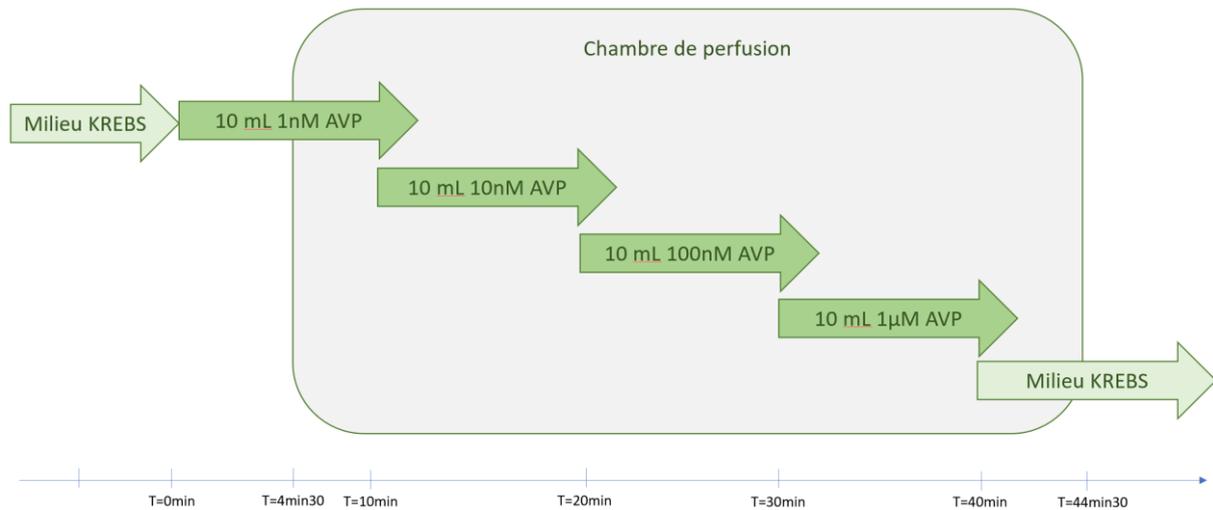


Figure 20 : Schéma représentant le protocole de perfusion d'AVP sur les cellules HEK pour différentes concentrations d'AVP. T=0 : départ d'AVP 1nM. T=4min30 : arrivée d'AVP dans la chambre de perfusion. T=6min : Chambre remplie d'AVP. T=10min : départ de 10nM AVP. T=16min : Chambre remplie 10nM AVP. T=20min : départ 100nM AVP. T=26min : Chambre remplie 100nM AVP. T=30 min : départ 1µM AVP. T=36min : chambre remplie 1µM AVP. T=40 min : départ milieu KREBS. T=50 min : fin d'acquisition.

(3) Analyse et statistiques

Les films obtenus sont dans un premier temps corrigé afin de supprimer les mouvements de liquide dans la chambre de perfusion avec le programme Matlab (Mathworks, Portola Valley, CA). L'analyse des résultats obtenus est effectuée avec ImageJ. Des régions d'intérêts sont créées autour des cellules puis l'intensité lumineuse de chaque cellule à chaque image du film est mesurée. Ces données permettent ensuite de calculer le ratio d'intensité de fluorescence F/F_0 et les graphiques et statistiques sont obtenus grâce au logiciel GraphPad Prism 9.2.0.

2. Résultats

a) Développement du biosenseur sensible à la vasopressine

Dans un premier temps, nous avons sélectionné le récepteur à la vasopressine V2 humain et déterminé la meilleure position pour incorporer la cpGFP dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur (voir matériels & méthodes). Nous avons choisi de l'insérer entre l'alanine234 et l'histidine 261 (Figure 21 A) pour essayer d'obtenir l'emplacement où la liaison de la vasopressine au récepteur qui va induire un grand changement de conformation du récepteur et ainsi permettre un changement de l'émission de fluorescence de la cpGFP. Puis, nous avons inséré notre construction dans le vecteur viral pAAV-CAG-GFP et ce à la place de la GFP, afin d'obtenir notre plasmide (Figure 21 B).

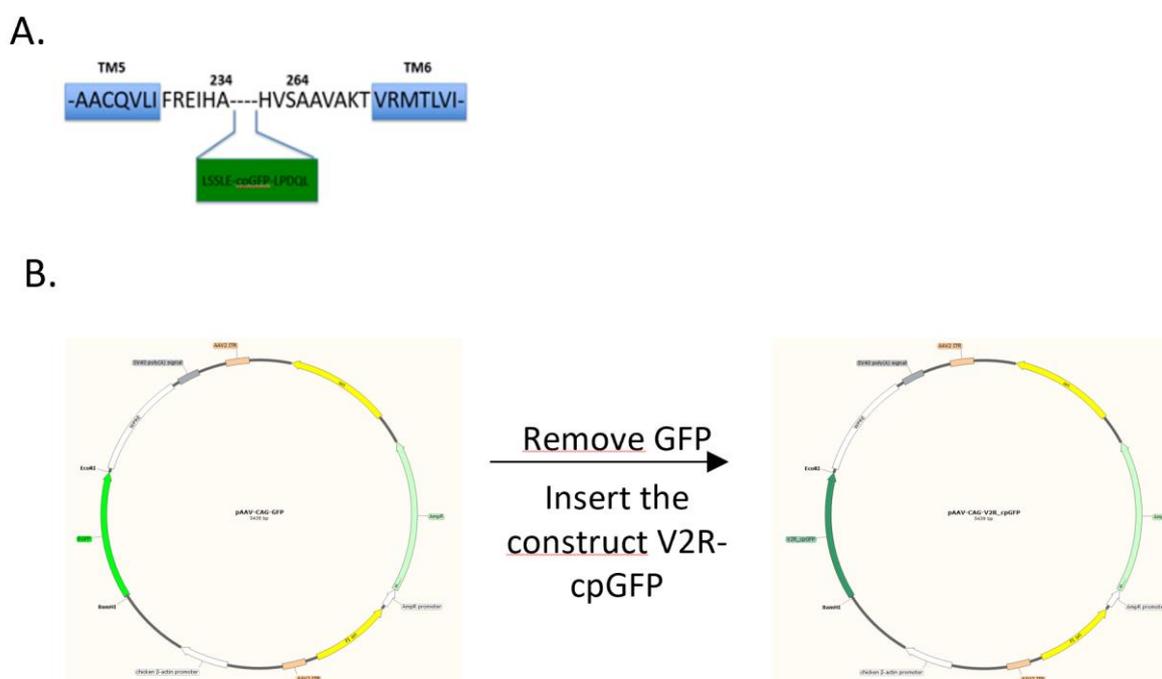
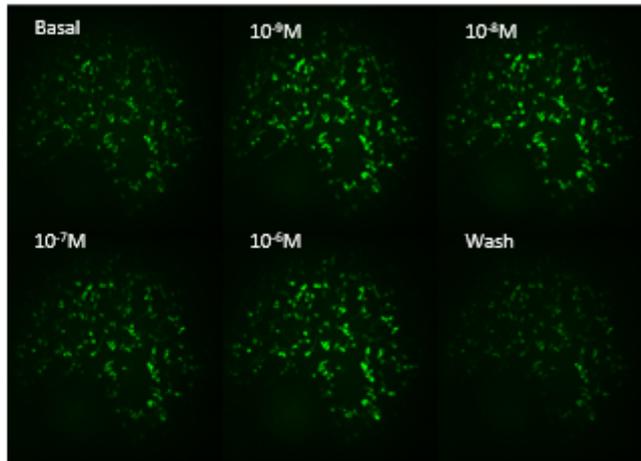


Figure 21 : Construction du biosenseur. A. Site d'insertion de la cpGFP dans le récepteur V2Rh. B. Schéma représentant le vecteur viral du biosenseur, avant et après insertion de la construction V2R-cpGFP

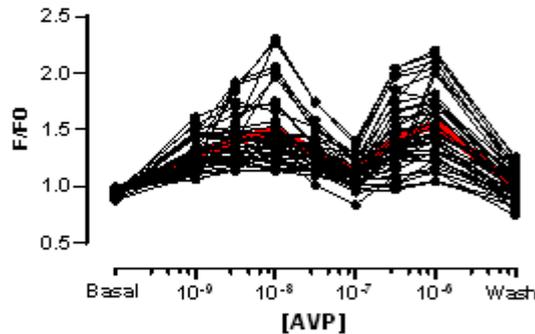
b) Caractérisation du senseur sensible à la vasopressine

La transfection de 500ng de plasmide exprimant le biosenseur dans des cellules HEK293 montre une expression du récepteur à la membrane (Figure 22 A). Afin de déterminer la sensibilité de l'AVP sur le biosenseur, nous avons perfusé différentes concentration d'AVP (1nM à 1 μ M) dans la chambre de perfusion. On constate une augmentation du ratio de l'intensité de fluorescence F/F_0 lorsque l'AVP va se lier au senseur. On constate que l'augmentation est plus forte, de 30% en moyenne pour 10nM et 1 μ M d'AVP perfusé (Figure 22 C). Cependant, on peut constater que certaines cellules vont présenter un maximum de fluorescence pour une concentration à 10nM d'AVP (courbes noires) tandis que d'autres répondront plus fortement pour une concentration de 1 μ M d'AVP (courbes rouges) (Figure 22 D). D'autres tests effectués mettent en évidence que le biosenseur présente une plus forte intensité de fluorescence pour une concentration à 10nM. Bien qu'en moyenne, les cellules voient leur fluorescence augmenter de 30%, certaines vont augmenter de 100-150% (Figure 22 E).

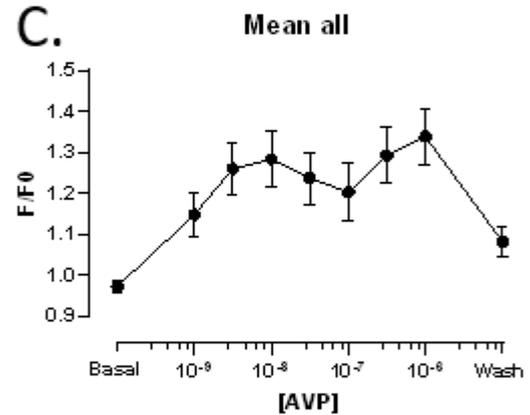
A.



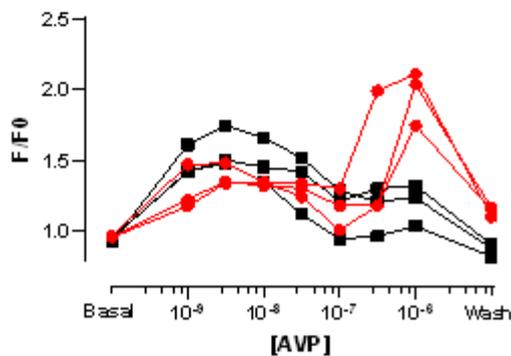
B.



C.



D.



E.

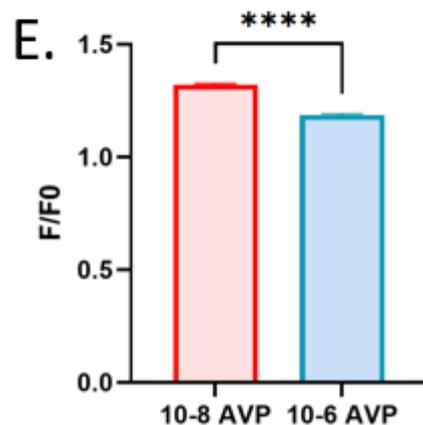


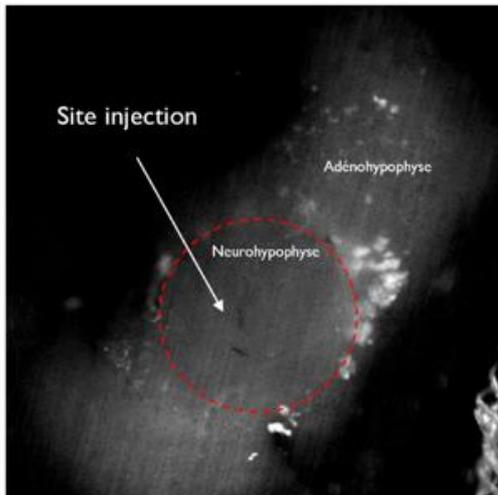
Figure 22 : Caractérisation du senseur AVP. A. Expression et réponse du senseur V2R-cpGFP à la membrane des cellules HEK en condition basal (milieu KREBS), avec application de 1nM à 1µM d'AVP et après rinçage. B. Réponse d'intensité de fluorescence des cellules HEK lors d'une perfusion de différentes concentrations d'AVP. C. Réponse d'intensité de fluorescence moyenne des cellules HEK. D. Profil de réponse d'intensité de fluorescence de 6 cellules lors d'une perfusion d'AVP. E. Réponse d'intensité de fluorescence des cellules lors d'une perfusion à 10nM ou 1µM d'AVP, (n= 434 cellules ; p < 0.0001, t-test).

c) Essais d'expression du biosenseur sensible à la vasopressine dans la neurohypophyse

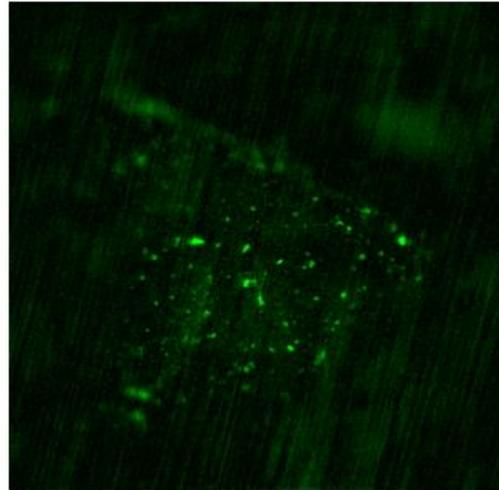
Le biosenseur étant capable de répondre à différentes concentrations d'AVP dans des cellules HEK293 étudiées *in vitro*, nous avons ensuite produit à partir de la construction un vecteur viral pouvant infecter les tissus sous le contrôle du promoteur CAG. L'injection du biosenseur s'effectue dans la neurohypophyse à l'aide des coordonnées stéréotaxiques. Trois semaines plus tard, la neurohypophyse est extraite afin de procéder à des enregistrements *ex-vivo*.

Malheureusement, des problèmes d'infections ont eu lieu lors de l'injection stéréotaxique des souris par le biosenseur (figure 23 A, n=10). Après dilution au $1/10^{\circ}$ du virus, l'infection est possible (Figure 23 B) mais l'activité est absente lors d'une perfusion d'AVP à 10nM (non montré) ou 1 μ M (Figure 23 C).

A.



B.



C.

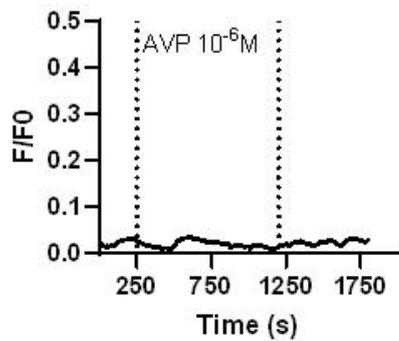


Figure 23 : Expression du senseur dans la neurohypophyse. A. Image représentant une hypophyse entière. Le site d'injection du senseur V2R-cpGFP est présent dans la neurohypophyse (délimité en pointillé rouge). B. Infection de la neurohypophyse avec le senseur V2R-cpGFP dilué au $1/10^{\circ}$. C. Réponse d'intensité de fluorescence F/F0 lors d'une stimulation d' $1\mu\text{M}$ d'AVP sur hypophyse entière.

V. Discussion

Comprendre et identifier comment les neurohormones sont sécrétées et relarguées dans la circulation sanguine au niveau des jonctions neurohémales relève d'un enjeu de taille puisqu'il en va du maintien de l'homéostasie et de la régulation de fonctions physiologiques vitales. Par exemple, la régulation hydrique du corps s'effectue par une action de l'AVP sur la membrane du tube collecteur rénal mais les mécanismes sous-jacents, notamment la sécrétion de l'AVP dans la NH et son entrée dans la circulation sanguine au niveau des capillaires fenêtrés, restent encore à être élucidés. Ma thèse a consisté à décrypter le fonctionnement des terminaisons neuronales vasopressinergiques dans leur microenvironnement tissulaire afin d'en comprendre leurs caractéristiques *in-vivo* et d'élucider leur relation avec la dynamique des capillaires sanguins. L'une des particularités de ce système permettant la régulation hydrique est le fait qu'il se compose de trois étages qui agissent à la fois en synergie mais très probablement de manière indépendante, faisant alors intervenir de nombreux acteurs. En effet, les corps cellulaires des neurones AVP sont situés dans l'hypothalamus, dans le PVN et le NSO. Les terminaisons neuronales sont situées dans l'hypophyse où la sécrétion d'AVP et le transfert vers la circulation sanguine va avoir lieu pour permettre à l'AVP de mener son action au niveau des reins.

Neurones à vasopressine : de l'hypothalamus à la neurohypophyse

Lors d'une déshydratation, les récepteurs osmosensibles vont transmettre les informations dans le PVN et le NSO, permettant ainsi la synthèse et la sécrétion d'AVP dans la neurohypophyse. Les connaissances acquises aujourd'hui sur la sécrétion d'AVP reposent essentiellement sur des études électrophysiologiques des neurones à AVP dans le NSO sur un modèle de rat anesthésié (Leng *et al.*, 2015 ; Leng *et al.*, 2008 ; Leng and Russell, 2019).

De ce fait, j'ai donc décidé de développer une approche *in-vivo* permettant d'étudier l'activité des terminaisons AVP au sein de leur environnement neurohypophysaire, permettant ainsi de garder un système entier afin de ne pas perdre les processus de régulations physiologiques.

Afin de répondre au mieux à cette question, j'ai dans un premier temps utilisé des souris AVP-Cre, me permettant ainsi d'exprimer une GCaMP uniquement dans les terminaisons AVP en procédant à une injection virale stéréotaxique dans la neurohypophyse. Cependant, peu de temps après la mise en place des premières expériences, la lignée a dérivé m'obligeant à changer de stratégie. De plus, il a été montré que lorsqu'on ajoute la cassette IRES(2)-Cre en aval du

gène codant pour l'AVP, l'expression du neuropeptide dans ces souris diminue (Cheng *et al.*, 2019), ce qui peut avoir un impact sur l'expression de la GCaMP dans les terminaisons vasopressinergiques permettant l'enregistrement de leur activité calcique. Afin de pallier ces aléas, j'ai donc utilisé des souris WT en infectant par injection virale d'AAV9-CAG-GCaMP6s les PVN afin de marquer uniquement les terminaisons neuronales dans la neurohypophyse. Cette méthode ne m'a pas permis de discriminer les neurones ocytoxinergiques et vasopressinergiques mais j'ai pu étudier l'activité globale des terminaisons nerveuses dans la NH. Toutefois, l'indicateur calcique utilisé n'était pas optimal pour étudier les terminaisons neuronales puisque, s'il y avait bel et bien une infection des neurones, aucune activité n'était observable dans la grande majorité des cas. J'ai donc opté pour un nouvel indicateur calcique plus performant, présentant une meilleure affinité pour le calcium et une plus forte émission de fluorescence avec un meilleur ratio signal sur bruit, le GCaMP8s (Zhang *et al.*, 2020), qui s'est révélé *in fine* être un meilleur outil. Cependant, j'ai dû effectuer la majorité de ces expérimentations *ex-vivo*, sur hypophyse entière ou en tranche de neurohypophyse, car l'étude de l'activité calcique requiert une lourde chirurgie, impliquant l'implantation d'une aiguille de lentille — GRIN lens — au-dessus de la NH. La glande étant située aux coordonnées Omm latéral par rapport au bregma, il était impossible dans la plupart des cas de passer à côté du sinus supérieur sagittal, provoquant alors une hémorragie interne et induisant la mort de l'animal post-opératoire dans 60-80% des cas. Afin d'éviter ce sinus, il serait intéressant de mener de nouvelles expérimentations en inclinant la GRIN dans la tête de l'animal comme cela a été récemment appliqué pour l'enregistrement de neurones hypothalamiques *in-vivo* (Moore *et al.*, 2022).

Malgré ces différentes contraintes, j'ai réussi à obtenir une unique souris dans laquelle j'ai pu observer des variations dans l'activité calcique des terminaisons neuronales neurohypophysaires, montrant une coordination des évènements calciques en condition basale qui persiste suite à une injection de NaCl 10% en sous-cutané mais avec un profil plus continu (Fig. 1C, article). Ces résultats sont en concordance avec ceux étudiés dans le NSO (Leng *et al.* 2008 ; Leng and Russell, 2019 ; Leng *et al.*, 2015). Cependant, de nouvelles expérimentations seraient importantes pour vraiment distinguer les différences dans les patterns d'activité de la réponse des terminaisons neuronales après une stimulation hyperosmotique qui commençait à se mettre en place dans cette souris étudiée. En effet, il serait intéressant de suivre l'activité sur une plus longue durée d'enregistrement et/ou en réponse à une déshydratation plus sévère, sur

plusieurs jours, pour savoir si le pattern d'activité des neurones varie dans les différentes situations.

De manière intéressante, l'étude de l'activité calcique des terminaisons neuronales sur tranches d'hypophyse ne montre pas la coordination entre les différentes terminaisons (Fig. 1F, 1G, article). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que l'étude se fait sur un système dissocié de l'hypothalamus et que l'on perd ainsi les régulations physiologiques. En effet, des signaux calciques synchrones ont été observés sur tranches de PVN (Wu *et al.*, 2018), ce qui pourrait expliquer la coordination des événements *in-vivo* mais pas *ex-vivo* dans les terminaisons neurohypophysaires.

L'AVP sécrétée va occuper l'espace extracellulaire entre les terminaisons et les capillaires de la NH avant d'entrer dans la circulation par les fenestrations. De ce fait, je me suis demandée si l'AVP pouvait avoir un effet sur les terminaisons elles-mêmes et il apparait qu'une perfusion de 10 nM d'AVP augmente l'activité des terminaisons (figure 2A, article) et que cet effet est contrecarré avec les antagonistes des récepteurs V1a et OxR. Il existe donc un rétrocontrôle positif exercé au sein même de la neurohypophyse permettant d'augmenter la sécrétion de vasopressine. Un phénomène semblable est retrouvé au niveau du NSO. En effet, l'augmentation de l'activité des neurones à AVP va conduire à une sécrétion d'AVP par les dendrites des neurones, provoquant une vasoconstriction des vaisseaux et une hypoxie locale induisant alors un rétrocontrôle positif sur les neurones vasopressinergiques (Roy *et al.*, 2021). L'origine de ce rétrocontrôle positif exercé par l'AVP au niveau de la NH devra être caractérisé ultérieurement, ainsi que son impact sur le niveau d'AVP circulant.

La vasopressine : régulateur de la dynamique de son microenvironnement vasculaire au sein de la neurohypophyse

L'AVP sécrétée est à l'interface entre les terminaisons neuronales et la micro-vascularisation et l'une des questions majeures est comment les neurohormones sont délivrées dans les capillaires fenêtrés. L'étude de la vitesse du flux sanguin dans la neurohypophyse a montré que lors d'une déshydratation, les capillaires pris dans leur ensemble maintiennent une vitesse constante, aux alentours de 300µm/s. Cet effet permet certainement de protéger la neurohypophyse des effets liés à des modifications importantes de vitesse comme il a été montré dans les îlots du pancréas (Ullsten *et al.*, 2020). Mais, si on les regarde de manière

indépendante, on constate que leur vitesse va augmenter ou diminuer, permettant probablement d'apporter l'oxygène nécessaire pour entraîner la stimulation des terminaisons AVP et ainsi potentialiser la sécrétion d'AVP, comme il l'a été suggéré par de précédentes expériences *ex-vivo* (Cazalis *et al.*, 1987 ; Shibuki, 1989). Les mécanismes liés au ralentissement ou à l'accélération de la vitesse du flux sanguin sont pour le moment inconnus mais il existe des acteurs pouvant intervenir dans cette régulation. En effet, j'ai montré qu'une stimulation d'AVP sur les péricytes dérivés de la crête neurale (souris *Wnt1-Cre* croisées avec des souris exprimant un marqueur ROSA26 de lignage cellulaire) induit une augmentation de leur activité calcique et ainsi certainement une contraction de ces cellules, ce qui devrait induire une vasoconstriction des capillaires et donc un ralentissement du flux sanguin. De plus, ce même phénomène a été observé dans le NSO puisque lors d'une sécrétion dendritique d'AVP, une vasoconstriction des vaisseaux a été observée (Roy *et al.*, 2021). Il est également possible que d'autres types de péricytes soient impliqués dans ces phénomènes de vasoconstriction et de vasodilatation, comme les péricytes possédant le marqueur NG2 par exemple. Un autre acteur qui pourrait intervenir dans la régulation de la dynamique du flux sanguin est le pituicyte. Ces cellules, qui peuvent être comparées aux cellules gliales, enveloppent les terminaisons des neurones magnocellulaires (Morris, 1976) et sont donc à l'interface entre la sécrétion d'AVP et la vascularisation. Il a été montré que les pituicytes vont sécréter des facteurs tels que le VEGF, critiques pour contrôler la perméabilité des capillaires dans la neurohypophyse (Anbalagan *et al.*, 2018). L'augmentation de la vitesse du flux sanguin pourrait être liée à ce facteur puisque le VEGF a la capacité de dilater des vaisseaux et d'augmenter ainsi la vitesse du flux sanguin dans l'oreille de souris (Ashina *et al.*, 2015). De ce fait, mes résultats montrent que l'AVP potentialise l'activité des terminaisons mais également celle de péricytes. Il serait donc intéressant de regarder si cette action est directe ou si elle passe par les pituicytes (Hatton *et al.*, 1992). Un screening complet pourrait être intéressant à réaliser pour savoir si des récepteurs à la vasopressine sont présents sur ces cellules ou sur d'autres résidents de la neurohypophyse. Un récent scRNA-seq a été réalisé permettant d'identifier sept types cellulaires distincts dans la neurohypophyse (Chen *et al.*, 2020).

Biosenseur : Rapporteur de sécrétion

Afin d'étudier les modulations produites par la vasopressine au sein de la jonction neurohémale entre les neurones à vasopressine et les capillaires sanguins neurohypophysaires, nous avons décidé de créer un biosenseur sensible à l'AVP. De ce fait, il serait possible de suivre sa

sécrétion en temps réel, de pouvoir fournir une estimation de la quantité libérée à la jonction neurohémale et ainsi de corrélérer aisément chez l'animal vivant l'impact de la vasopressine sur le flux sanguin neurohypophysaire (projet principal de ma thèse, résultats A).

Pour répondre à ces besoins, nous nous sommes basés sur les constructions des senseurs sensibles à la dopamine (Patriarchi *et al.*, 2018) ou à l'acétylcholine (Jing *et al.*, 2018) pour l'adapter à la vasopressine. Ces constructions reposent sur l'insertion d'une cpGFP dans la troisième boucle intracellulaire des récepteurs couplés à une protéine G humaine. Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur, un changement de conformation se produit au niveau des hélices 5 et 6 du récepteur, permettant un changement des caractéristiques d'émission de fluorescence de la cpGFP introduite.

Toutefois, pour permettre un bon suivi des neurotransmetteurs ou neurohormones, il est indispensable d'obtenir un bon ratio de fluorescence émise par rapport à la fluorescence basale. Il est donc nécessaire d'identifier l'emplacement optimal au sein de la boucle ICL3 du récepteur pour que le changement de conformation induit par la fixation du ligand entraîne un changement important et détectable d'émission de fluorescence de la cpGFP. Par exemple, avant d'obtenir la bonne construction pour le senseur sensible à la dopamine, Patriarchi *et al.* ont créé et analysé 585 variants de senseurs dans des cellules HEK avant d'obtenir une réponse positive. Jing *et al.*, ont quant à eux testé 723 variants dans des cellules HEK avant d'obtenir le bon senseur sensible à l'acétylcholine. Dans notre cas, nous nous sommes basés sur les connaissances de Bernard Mouillac de l'IGF sur le récepteur à la vasopressine V2 pour estimer le meilleur site d'insertion possible, qui serait situé entre les acides aminés Alanine234 et Histidine261.

Mes résultats ont permis de montrer que la construction que nous avons établie était en capacité de détecter la libération de vasopressine sur des cellules HEK puisqu'on observait une augmentation de l'émission de fluorescence lorsque l'AVP se liait au récepteur et que la fluorescence diminuait pour revenir à un niveau basal lorsque l'AVP n'était plus présente dans le milieu. Cependant, l'injection virale du senseur dans la neurohypophyse de souris n'a pas permis de suivre la libération d'AVP puisqu'aucune fluorescence n'était émise après stimulation à l'AVP *ex-vivo*. Cette absence de réponse peut être liée à plusieurs facteurs comme un problème lors de la construction de l'AAV qui ne permet pas une bonne infection dans le tissu ou encore que l'insertion de la cpGFP dans le récepteur à la vasopressine V2 humaine

n'aboutit pas à un changement de conformation suffisant pour détecter des changements d'émission de la fluorescence de la cpGFP dans la neurohypophyse de modèles murins.

Afin d'accéder à des outils permettant de suivre la libération de vasopressine pour étudier au mieux les modulations de l'AVP sur la jonction neurohémale neurohypophysaire, il serait intéressant de tester de nouvelles constructions du senseur, en choisissant un ou plusieurs nouveaux sites d'insertion de la cpGFP. De plus, de nouveaux senseurs sont sans cesse créés, dont un senseur à l'ocytocine (Qian *et al.*, 2022). Ce senseur possède une très forte affinité à l'ocytocine mais répond également, de manière moins spécifique, à la vasopressine. Il serait intéressant d'étudier plus en détail ce senseur et, à partir de lui, de créer deux nouveaux senseurs capables d'être plus spécifiques de l'OT mais également de l'AVP. Cela permettrait ainsi de pouvoir discriminer ces deux neurohormones, produites dans le même tissu.

Le développement de senseurs, basé sur l'insertion d'une cpGFP dans un RCPG, permet d'ouvrir des voies encore peu explorées dans la détection et dynamique de neuropeptides, ou neuromodulateurs (Wu *et al.*, 2022) dans le modèle animal *in-vivo*, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques, ou encore chez l'Homme (Tabak *et al.*, 2022). En effet, leur développement pourrait permettre d'identifier les dynamiques réelles de libération de neuropeptides au niveau de la jonction neuro-hémale des neurones magnocellulaires à vasopressine, comme espéré pour mon projet de thèse, ou à ocytocine qui suscite l'intérêt de Preethi Rajamannar, chez Gil Levkowitz, pour son projet de thèse sur le poisson zèbre (programme PhD commun CNRS-WIS qui a également financé ma bourse de thèse pendant 3 ans sur un projet commun entre les laboratoires Mollard et Levkowitz), mais également des neurones parvocellulaires (GnRH, CRH, TRH, GHRH, ...). En effet, les dynamiques de libération de ces neuropeptides ne sont basées actuellement que sur leur approximation pour des mesures d'activité *in-vivo* de ces neurones au niveau du soma et de leur modélisation (Leng *et al.*, 2017) ou encore par la réponse périphérique du neuropeptide avec, par exemple, le profil des pulses de LH sécrétés par l'hypophyse et considéré comme le reflet des pulses de GnRH (Herbison, 2018 ; Clarkson *et al.*, 2017).

De plus, le développement de ces senseurs permettrait de comprendre le rôle local des neuropeptides sécrétés dans leur microenvironnement tissulaire. En effet, cette action locale a été caractérisée comme étant de type « volume transmission », tant dans la population des neurones magnocellulaires qu'avec d'autres types de neurones dans un environnement proche.

Cependant, ce « volume transmission » n'est pas encore bien caractérisé (Son *et al.*, 2013). Ces senseurs permettraient donc d'apporter des informations sur la quantité de neuropeptides libérés et d'apporter des compléments d'information sur mes travaux de thèse concernant le système vasculaire neurohypophysaire, les terminaisons des neurones à AVP, mais également sur la sécrétion somato-dendritique de vasopressine et ocytocine (Brown *et al.*, 2020).

Perspectives cliniques : le diabète insipide

Comprendre comment fonctionne les mécanismes de sécrétion d'AVP et sa mise en circulation dans le système vasculaire est d'une grande importance pour certaines pathologies comme le diabète insipide. En effet, c'est une maladie qui touche 1/25000 personnes et qui peut être liée à une déficience dans la synthèse d'AVP au niveau de l'hypothalamus, de sécrétion au niveau de l'hypophyse, ou encore à une résistance à l'AVP au niveau des reins, provoquant alors un syndrome polyurique. Aujourd'hui cette pathologie est soignée avec un traitement à vie, dans la plupart des cas, à base de desmopressine qui est un médicament de synthèse mimant les effets de l'AVP. Mais, dans 27% des cas, les patients prenant ce traitement vont souffrir d'hyponatrémie, pouvant alors conduire à des complications (Atila *et al.*, 2022). C'est dans ce cadre que mes résultats de thèse et que les futurs travaux qui seront produits sur ce sujet prennent leur importance. En effet, en caractérisant les mécanismes de sécrétion et les acteurs impliqués dans cette régulation comme les péricytes ou potentiellement les pituicytes, de nouvelles stratégies permettant de réguler la synthèse d'AVP pourraient apparaître, donnant alors aux patients un meilleur traitement.

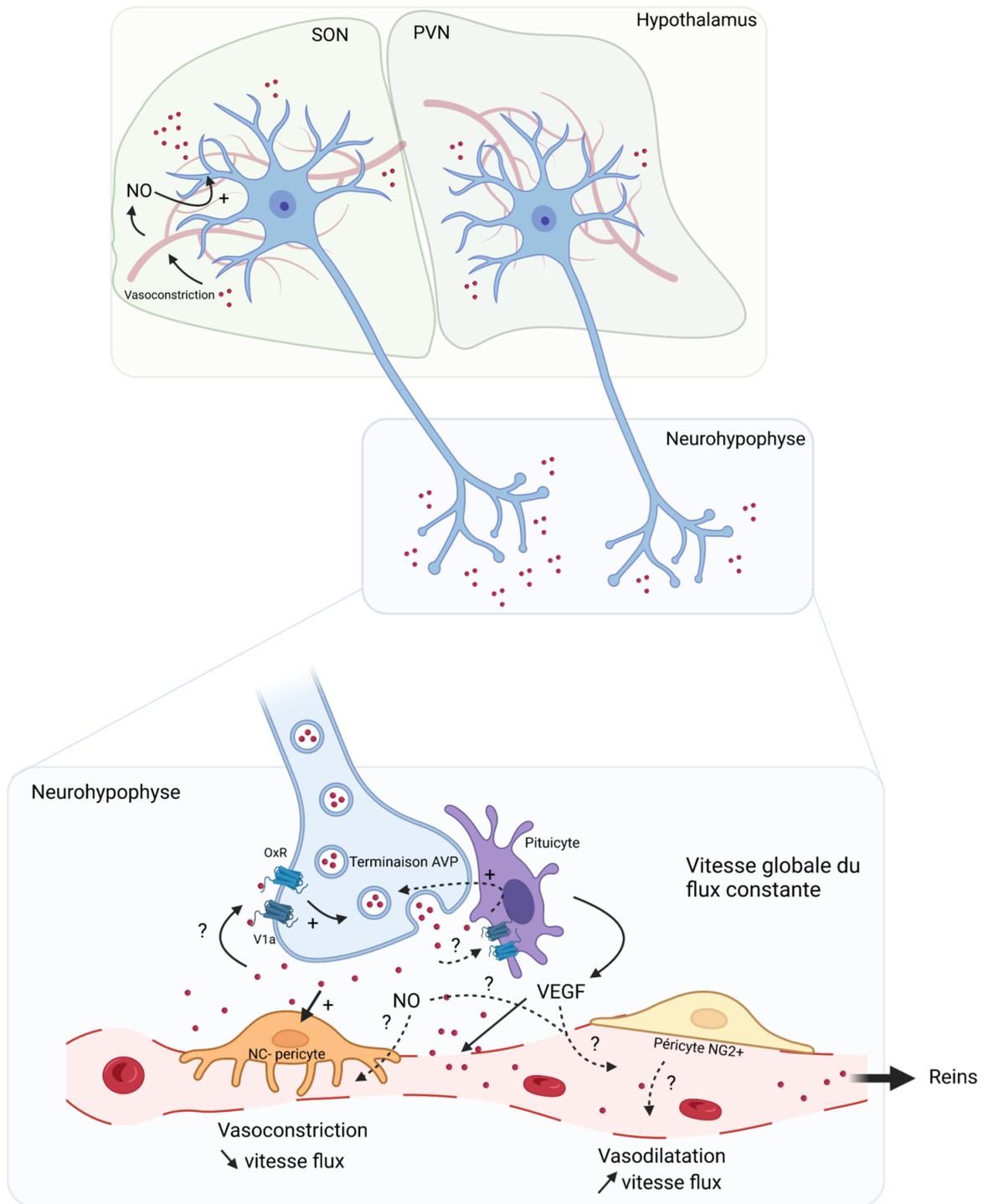


Figure 24 : Schéma récapitulatif de l'action de l'AVP et d'acteurs du microenvironnement de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire lors d'une demande hydrique avec un focus sur la jonction neuro-hémale neurohypophysaire. Adapté de Roy *et al.*, 2021 ; Anbagalan *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2020 et de mes travaux de thèse.

Bibliographie

A

- Akerboom, Jasper, Jonathan D.Vélez Rivera, María M. Rodríguez Guilbe, Elisa C.Alfaro Malavé, Hector H. Hernandez, Lin Tian, S. Andrew Hires, Jonathan S. Marvin, Loren L. Looger, and Eric R. Schreiter. 2009. “Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (10): 6455–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807657200>.
- Alarcon-Martinez, Luis, Muge Yemisci, and Turgay Dalkara. 2021. “Pericyte Morphology and Function.” *Histology and Histopathology* 36 (6): 633–43. <https://doi.org/10.14670/HH-18-314>.
- Alarcon-Martinez, Luis, Sinem Yilmaz-Ozcan, Muge Yemisci, Jesse Schallek, Kıvılcım Kılıç, Alp Can, Adriana Di Polo, and Turgay Dalkara. 2018. “Capillary Pericytes Express α -Smooth Muscle Actin, Which Requires Prevention of Filamentous-Actin Depolymerization for Detection.” *ELife* 7: 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.34861>.
- Alexander W.R, Schlant R.C, Fuster V, O’Rourke R.A, Roberts R, and Sonnenblick E. Hurst’s the heart, arteries and veins. 9th edition ed. 1998 ; McGraw-Hill Health Professional Division. New York.
- Allt, G., and J. G. Lawrenson. 2001. “Pericytes: Cell Biology and Pathology.” *Cells Tissues Organs* 169 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1159/000047855>.
- Almaça, Joana, Jonathan Weitz, Rayner Rodriguez-Diaz, Elizabeth Pereira, and Alejandro Caicedo. 2018. “The Pericyte of the Pancreatic Islet Regulates Capillary Diameter and Local Blood Flow.” *Cell Metabolism* 27 (3): 630-644.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.016>.
- Altura BM, Altura BT. Actions of vasopressin, oxytocin, and synthetic analogs on vascular smooth muscle. *Fed Proc.* 1984 Jan;43(1):80-6. PMID: 6690341.
- Amer, S., and J. A. Brown. 1995. “Glomerular Actions of Arginine Vasotocin in the in Situ Perfused Trout Kidney.” *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 269 (4 38-4). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.4.r775>.
- Anbalagan, Savani, Ludmila Gordon, Janna Blechman, Ryota L. Matsuoka, Preethi Rajamannar, Einav Wircer, Jakob Biran, et al. 2018. “Pituicyte Cues Regulate the

Development of Permeable Neuro-Vascular Interfaces.” *Developmental Cell* 47 (6): 711-726.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.017>.

Antoni, Ferenc. 1993. “Vasopressinergic Control of Pituitary Adrenocorticotropin Secretion Comes of Ages.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 14 (2): 76–122.

Antunes, J. L., P. W. Carmel, E. M. Housepian, and M. Ferin. 1978. “Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in Human Pituitary Blood.” *Journal of Neurosurgery* 49 (3): 382–86. <https://doi.org/10.3171/jns.1978.49.3.0382>.

Ashina, Kohei, Yoshiki Tsubosaka, Koji Kobayashi, Keisuke Omori, and Takahisa Murata. 2015. “VEGF-Induced Blood Flow Increase Causes Vascular Hyper-Permeability in Vivo.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (2): 590–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.014>.

Atila, Cihan, Paul Benjamin Loughrey, Aoife Garrahy, Bettina Winzeler, Julie Refardt, Patricia Gildroy, Malak Hamza, et al. 2022. “Central Diabetes Insipidus from a Patient’s Perspective: Management, Psychological Co-Morbidities, and Renaming of the Condition: Results from an International Web-Based Survey.” *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8587 (22): 1–10. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(22\)00219-4](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(22)00219-4).

Aukland, Knut, Bruce F Bower, and Robert W Berliner. 1964. “Measurement of Local Blood Flow with Hydrogen Gas.” *Circulation Research* 14: 164–87.

B

Baker, B.I., 1981. Biological role of the pars intermedia in lower vertebrates, Ciba Found. Symp. In: Evered, D., Lawrenson, G. (Eds.), Ciba Foundation Symposium 81-Peptides of the Pars Intermedia. Pitman Medical, London, pp. 166–179

Balland, Eglantine, Julie Dam, Fanny Langlet, Emilie Caron, Sophie Steculorum, Andrea Messina, S Rasika, et al. 2015. “Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain.” *Cell Metab* 19 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015.Hypothalamic>.

Bankir, Lise. 2001. “Antidiuretic Action of Vasopressin: Quantitative Aspects and Interaction between V1a and V2 Receptor-Mediated Effects.” *Cardiovascular Research* 51 (3): 372–90. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00328-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00328-5).

- Barberis, C., B. Mouillac, and T. Durroux. 1998. "Structural Bases of Vasopressin/Oxytocin Receptor Function." *Journal of Endocrinology* 156 (2): 223–29. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1560223>.
- Bargmann, Wolfgang. 1949. "Über Die Neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus Und Hypophyse." *Klinische Wochenschrift* 27: 617–22.
- Barretto, Robert P.J., Bernhard Messerschmidt, and Mark J. Schnitzer. 2009. "In Vivo Fluorescence Imaging with High-Resolution Microlenses." *Nature Methods* 6 (7): 511–12. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1339>.
- Bisset, G. W., and H. S. Chowdrey. 1988. "Control of Release of Vasopressin By Neuroendocrine Reflexes." *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 73 (6): 811–72. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1988.sp003223>.
- Bocarsly, Miriam E., Wan-chen Jiang, Chen Wang, Joshua T. Dudman, Na Ji, and Yeka Aponte. 2015. "Minimally Invasive Microendoscopy System for in Vivo Functional Imaging of Deep Nuclei in the Mouse Brain." *Biomedical Optics Express* 6 (11): 4546. <https://doi.org/10.1364/boe.6.004546>.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1987. "The Hypothalamus of the Human Adult: Chiasmatic Region." *Anatomy and Embryology* 175 (3): 315–30. <https://doi.org/10.1007/BF00309845>.
- Brown, Colin H., Mike Ludwig, Jeffrey G. Tasker, and Javier E. Stern. 2020. *Somato-Dendritic Vasopressin and Oxytocin Secretion in Endocrine and Autonomic Regulation. Journal of Neuroendocrinology*. Vol. 32. <https://doi.org/10.1111/jne.12856>.
- Brownstein, Michael J, James T Russel, and Harold Gainer. 1980. "Synthesis, Transport, and Release of Posterior Pituitary Hormones." *Science* 207: 373–78.
- Burbach, J. P.H., S. M. Luckman, D. Murphy, and H. Gainer. 2001. "Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System." *Physiological Reviews* 81 (3): 1197–1267. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1197>.
- Burford, G D, R E J Dyball, R L Moss, and B T Pickering. 1974. "Synthesis of Both Neurohypophysial Hormones in Both the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Rat." *Journal of Anatomy* 117: 261–69.

- Cassoni, Paola, Tiziana Marrocco, Benedetta Bussolati, Elena Allia, Luca Munaron, Anna Sapino, and Gianni Bussolati. 2006. "Oxytocin Induces Proliferation and Migration in Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cells and Human Breast." *Mol Cancer* 4 (6): 351–60. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0024>.
- Cattaneo, M.G., B. Chini, and L.M. Vicentini. 2008. "Oxytocin Stimulates Migration and Invasion in Human Endothelial Cells." *British Journal of Pharmacology* 153: 728–36. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707609>.
- Cazalis, Monique, Govindan Dayanithi, and Jean J. Nordmann. 1987. "Hormone Release from Isolated Nerve Endings of the Rat Neurohypophysis." *J. Physiol* 390: 55–70.
- Chen, Qiyu, Dena Leshkowitz, Janna Blechman, and Gil Levkowitz. 2020. "Single-Cell Molecular and Cellular Architecture of the Mouse Neurohypophysis." *ENeuro* 7 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0345-19.2019>.
- Chen, Tsai Wen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreiter, et al. 2013. "Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity." *Nature* 499 (7458): 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Cheng, Arthur, Samuel Fung, and Hai-Ying Cheng. 2019. "Limitations of the Avp-IRES-Cre (JAX #023530) and Vip-IRES-Cre (JAX #010908) Models for Chronobiological Investigations." *Journal of Biological Rhythms*, 1–31.
- Ciofi, Philippe, Maurice Garret, Olivier Lapirot, Pierrette Lafon, Anne Loyens, Vincent Prévot, and Jon E. Levine. 2009. "Brain-Endocrine Interactions: A Microvascular Route in the Mediobasal Hypothalamus." *Endocrinology* 150 (12): 5509–19. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0584>.
- Clarkson, Jenny, Su Young Han, Richard Piet, Timothy McLennan, Grace M. Kane, Jamie Ng, Robert W. Porteous, et al. 2017. "Definition of the Hypothalamic GnRH Pulse Generator in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (47): E10216–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713897114>.
- Coote, J H. 2004. "A Role for the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus in the Autonomic Control of Heart and Kidney." *Exp Physiol* 90 (2): 169–73.

<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2004.029041>.

Cummins, I. Clarke & T. 1982. “The Temporal Relationship between Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) and Luteinizing Hormone (LH) Secretion in Ovariectomized Ewes.” *Endocrinology* 111 (5): 9–25.

D

Ding, Rubai, Diane C Darland, Michael S Parmacek, and Patricia A D Amore. 2004. “Reveal Molecular Mechanisms of Smooth Muscle / Pericyte Differentiation.” *Stem Cells and Development* 13: 509–20.

Dore-duffy, Paula. 2008. “Pericytes : Pluripotent Cells of the Blood Brain Barrier.” *Current Pharmaceutical Design* 14: 1581–93.

Dore-duffy, Paula, Andre Katychev, Xueqian Wang, and Eric Van Buren. 2006. “CNS Microvascular Pericytes Exhibit Multipotential Stem Cell Activity.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26: 613–24. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600272>.

Douglas, A. J. 2001. “Uterine Contractile Activity Stimulates Supraoptic Neurons in Term Pregnant Rats Via a Noradrenergic Pathway.” *Endocrinology* 142 (2).

Du, Wenting, Javier E. Stern, and Jessica A. Filosa. 2015. “Neuronal-Derived Nitric Oxide and Somatodendritically Released Vasopressin Regulate Neurovascular Coupling in the Rat Hypothalamic Supraoptic Nucleus.” *Journal of Neuroscience* 35 (13): 5330–41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3674-14.2015>.

Duffet, Loïc, Seher Kosar, Mariangela Panniello, Bianca Viberti, Edward Bracey, Anna D Zych, Arthur Radoux-mergault, et al. 2022. “A Genetically Encoded Sensor for in Vivo Imaging of Orexin Neuropeptides.” *Nature Methods* 19 (February): 231–41.

Duquenne, Manon, Cintia Folgueira, Cyril Bourouh, Marion Millet, Anisia Silva, Jérôme Clasadonte, Monica Imbernon, et al. 2021. “Leptin Brain Entry via a Tanycytic LepR–EGFR Shuttle Controls Lipid Metabolism and Pancreas Function.” *Nature Metabolism* 3 (8): 1071–90. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00432-5>.

F

- Fernández-Klett, Francisco, Nikolas Offenhauser, Ulrich Dirnagl, Josef Priller, and Ute Lindauer. 2010. "Pericytes in Capillaries Are Contractile in Vivo, but Arterioles Mediate Functional Hyperemia in the Mouse Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (51): 22290–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011321108>.
- Fidler Lim, Nancy, Martha C. Nowycky, and Richard J. Bookman. 1990. "Direct Measurement of Exocytosis and Calcium Currents in Single Vertebrate Nerve Terminals." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/344449a0>.
- Francis, Paul T., Alan M. Palmer, Michael Snape, and Gordon K. Wilcock. 1999. "The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress." *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 66 (2): 137–47. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>.

G

- Ghosh, Kunal K., Laurie D. Burns, Eric D. Cocker, Axel Nimmerjahn, Yaniv Ziv, Abbas El Gamal, and Mark J. Schnitzer. 2011. "Miniaturized Integration of a Fluorescence Microscope." *Nature Methods* 8 (10): 871–78. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1694>.
- Gould, Ian Gopal, Philbert Tsai, David Kleinfeld, and Andreas Linninger. 2017. "The Capillary Bed Offers the Largest Hemodynamic Resistance to the Cortical Blood Supply." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37 (1): 52–68. <https://doi.org/10.1177/0271678X16671146>.
- Grattan, David R. 2015. "The Hypothalamo-Prolactin Axis." *Journal of Endocrinology* 226 (2): T101–22. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0213>.
- Gross, P. M., and A. Weindl. 1987. "Peering through the Windows of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7 (6): 663–72. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.120>.
- Gutnick, Amos, Janna Blechman, Jan Kaslin, Lukas Herwig, Heinz-georg Belting, Markus Affolter, Joshua L Bonkowsky, and Gil Levkowitz. 2011a. "Formation of the Neurovascular Interface of the Pituitary." *Dev Cell* 21 (4): 642–54.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.004>.We.

———. 2011b. “The Hypothalamic Neuropeptide Oxytocin Is Required for Formation of the Neurovascular Interface of the Pituitary.” *Developmental Cell* 21 (4): 642–54. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.004>.We.



Hall, Catherine N., Clare Reynell, Bodil Gesslein, Nicola B. Hamilton, Anusha Mishra, Brad A. Sutherland, Fergus M. Oâ Farrell, Alastair M. Buchan, Martin Lauritzen, and David Attwell. 2014. “Capillary Pericytes Regulate Cerebral Blood Flow in Health and Disease.” *Nature* 508 (1): 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>.

Hariharan, Ashwini, Nick Weir, Colin Robertson, Liqun He, Christer Betsholtz, and Thomas A. Longden. 2020. “The Ion Channel and GPCR Toolkit of Brain Capillary Pericytes.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 (December): 1–45. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.601324>.

Harris, G. W. 1948. “Hypothalamus and Pituitary Gland with Special Reference to the Posterior Pituitary and Labour.” *British Medical Journal* 1 (4546): 339–42. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4546.339>.

Hasser, Eileen M, Vernon S Bishop, and Meredith Hay. 1997. “Interactions between Vasopressin and Baroreflex Control of the Sympathetic Nervous System.” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 24: 102–8.

Hatton, G. I., R. J. Bicknell, J. Hoyland, R. Bunting, and W. T. Mason. 1992. “Arginine Vasopressin Mobilises Intracellular Calcium via V1-Receptor Activation in Astrocytes (Pituicytes) Cultured from Adult Rat Neural Lobes.” *Brain Research* 588 (1): 75–83. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91346-G](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91346-G).

Hatton, G. I., L. S. Perlmutter, A. K. Salm, and C. D. Tweedle. 1984. “Dynamic Neuronal-Glial Interactions in Hypothalamus and Pituitary: Implications for Control of Hormone Synthesis and Release.” *Peptides* 5 (SUPPL. 1): 121–38. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90271-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90271-7).

Hedge, G. A., M. B. Yates, R. Marcus, and F. E. Yates. 1966. “Site of Action of Vasopressin in Causing Corticotropin Release.” *Endocrinology* 79 (2): 328–40.

<https://doi.org/10.1210/endo-79-2-328>.

Herbison, Allan E. 2018. “The Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator.” *Endocrinology* 159 (11): 3723–36. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00653>.

Hofer, H. (1958). *Zur morphologie der circumventricularen organe des zwischentirns der saugtiere. Deut Zool Ges Verhandl*, 8, 202–251.)

Hoa, Ombeline, Chrystel Lafont, Pierre Fontanaud, Anne Guillou, Yasmine Kemkem, Rhonda D. Kineman, Raul M. Luque, Tatiana Fiordelisio Coll, Paul Le Tissier, and Patrice Mollard. 2019. “Imaging and Manipulating Pituitary Function in the Awake Mouse.” *Endocrinology* 160 (10): 2271–81. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00297>.

I

Ingram, C D, R K Snowball, and R Mihai. 1996. “Circadian Rhythm of Neuronal Activity in Suprachiasmatic Nucleus Slices from the Vasopressin-Deficient Brattleboro Rat.” *Neuroscience* 75 (2): 635–41.

Israel, Jean Marc, Stéphane H. Oliet, and Philippe Ciofi. 2016. “Electrophysiology of Hypothalamic Magnocellular Neurons in Vitro: A Rhythmic Drive in Organotypic Cultures and Acute Slices.” *Frontiers in Neuroscience* 10 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00109>.

Itoi, K. 2004. “Regulatory Mechanisms of Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin Gene Expression in the Hypothalamus.” *Journal of Neuroendocrinology* 16: 348–55.

J

Jansson, Leif, and Per Ola Carlsson. 2019. “Pancreatic Blood Flow with Special Emphasis on Blood Perfusion of the Islets of Langerhans.” *Comprehensive Physiology* 9 (2): 799–837. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160050>.

Jansson, Leif, and Claes Hellerström. 1981. “A Rapid Method of Visualizing the Pancreatic Islets for Studies of Islet Capillary Blood Flow Using Non-radioactive Microspheres.” *Acta Physiologica Scandinavica* 113 (3): 371–74. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1981.tb06909.x>.

- Jaquins-Gerstl, Andrea, and Adrian C. Michael. 2015. "A Review of the Effects of FSCV and Microdialysis Measurements on Dopamine Release in the Surrounding Tissue." *Analyst* 140 (11): 3696–3708. <https://doi.org/10.1039/c4an02065k>.
- Jares-Erijman, Elizabeth A., and Thomas M. Jovin. 2003. "FRET Imaging." *Nature Biotechnology* 21 (11): 1387–95. <https://doi.org/10.1038/nbt896>.
- Jedidi, H., Z. Jedidi, and A. Beckers. 2014. "Une Histoire d'hypophyse Evolution Des Représentations et Des Concepts Au Cours Du Temps." *Revue Medicale de Liege* 69 (2): 89–93.
- Jennings, Joshua H., Randall L. Ung, Shanna L. Resendez, Alice M. Stamatakis, Johnathon G. Taylor, Jonathan Huang, Katie Veleta, et al. 2015. "Visualizing Hypothalamic Network Dynamics for Appetitive and Consummatory Behaviors." *Cell* 160 (3): 516–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.026>.
- Jhamandas, J.H. 1989. "Diagonal Band Projection towards the Hypothalamic Supraoptic Nucleus: Light and Electron Microscopic Observations in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 282: 15–23.
- Jing, Miao, Peng Zhang, Guangfu Wang, Jiesi Feng, Lukas Mesik, Jianzhi Zeng, Huoqing Jiang, et al. 2018. "A Genetically Encoded Fluorescent Acetylcholine Indicator for in Vitro and in Vivo Studies." *Nature Biotechnology* 36 (8): 726–37. <https://doi.org/10.1038/nbt.4184>.
- Johnson, Alan Kim, and Paul M. Gross. 1993. "Sensory Circumventricular Organs and Brain Homeostatic Pathways." *The FASEB Journal* 7 (8): 678–86. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.8.8500693>.



- Jung, Hyun Jun, and Tae Hwan Kwon. 2016. "Molecular Mechanisms Regulating Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 311 (6): F1318–28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00485.2016>.
- Kanbay, Mehmet, Sezen Yilmaz, Neris Dincer, Alberto Ortiz, Alan A. Sag, Adrian Covic, Laura G. Sánchez-Lozada, et al. 2019. "Antidiuretic Hormone and Serum Osmolarity Physiology and Related Outcomes: What Is Old, What Is New, and What Is Unknown?"

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104 (11): 5406–20. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-01049>.
- Kaplan, Solomon Alexander. 2007. “The Pituitary Gland: A Brief History.” *Pituitary* 10 (4): 323–25. <https://doi.org/10.1007/s11102-007-0050-x>.
- Kaplitt, Michael, Paola Leone, Richard Samulski, Xiao Xiao, Donald Pfaff, Karen O’Malley, and Matthew During. 1994. “Leng-Term Gene Expression and Phenotypic Correction Using Adeno-Associated Virus Vectors in the Mammalian Brain.” *Nature Genetics* 8: 148–54.
- Kawamura, Hajime, Tetsuya Sugiyama, David M. Wu, Masato Kobayashi, Shigeki Yamanishi, Kozo Katsumura, and Donald G. Puro. 2003. “ATP: A Vasoactive Signal in the Pericyte-Containing Microvasculature of the Rat Retina.” *Journal of Physiology* 551 (3): 787–99. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047977>.
- Kc, Prabha, and Thomas E Dick. 2010. “Respiratory Physiology & Neurobiology Modulation of Cardiorespiratory Function Mediated by the Paraventricular Nucleus &.” *Respiratory Physiology & Neurobiology* 174 (1–2): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.08.001>.
- Kemeny, Andras A, Jan A Jakubowski, Emil Pasztor, Anthony A Jefferson, and Richard Wojcikiewicz. 1985. “Reduction of Blood Flow in the Adenohypophysis of Rats by Bromocriptine.” *J Neurosurg* 63: 120–24.
- Kim, Tyson N., Patrick W. Goodwill, Yeni Chen, Steven M. Conolly, Chris B. Schaffer, Dorian Liepmann, and Rong A. Wang. 2012. “Line-Scanning Particle Image Velocimetry: An Optical Approach for Quantifying a Wide Range of Blood Flow Speeds in Live Animals.” *PLoS ONE* 7 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038590>.
- Kimura, T., Y. Makino, F. Saji, M. Takemura, T. Inoue, T. Kikuchi, Y. Kubota, et al. 1994. “Molecular Characterization of a Cloned Human Oxytocin Receptor.” *European Journal of Endocrinology* 131 (4): 385–90. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1310385>.
- Kiss, Alexander & Mikkelsen, Jens. (2005). Oxytocin - Anatomy and functional assignments: A minireview. *Endocrine regulations*. 39. 97-105.
- Koenig, Michael L., Debra L. Yourick, and James L. Meyerhoff. 1996. “Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Attenuates Glutamate-Stimulated Increases in Calcium in Primary Neuronal Cultures.” *Brain Research* 730 (1–2): 143–49. <https://doi.org/10.1016/S0006->

8993(96)00433-7.

Kostyo, J. L. & Goodman, H. Kostyo, J. L. & Goodman, H. M. (1999) *Hormonal Control of Growth* (Oxford Univ. Press, Oxford).

L

Lafont, Chrystel, Michel G. Desarménien, Mathieu Cassou, François Molino, Jérôme Lecoq, David Hodson, Alain Lacampagne, et al. 2010. “Cellular in Vivo Imaging Reveals Coordinated Regulation of Pituitary Microcirculation and GH Cell Network Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9): 4465–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902599107>.

Laszlo, Ferenc, Csaba Varga, Imre Pavo, and Janos Gardi. 2000. “Vasopressin Receptor-Mediated Activation of HPA Axis by Acute Ethanol Stress in Rats.” *Physiol Regulatory Integrative Comp* 280: 458–65.

Leng, Gareth, R E Blackburn, and J A Russell. 1989. “Role of Anterior Peri-Third Ventricular Structures in the Regulation of Supraoptic Neuronal Activity and Neurohypophysial Hormone Secretion in the Rat.” *Journal of Neuroendocrinology* I (1): 35–46.

Leng, Gareth, Colin H Brown, Philip M Bull, David Brown, Sinead Scullion, James Currie, Ruth E Blackburn-munro, et al. 2001. “Responses of Magnocellular Neurons to Osmotic Stimulation Involves Coactivation of Excitatory and Inhibitory Input : An Experimental and Theoretical Analysis.” *Journal of Neuroscience* 21 (17): 6967–77.

Leng, Gareth, Colin H Brown, and John A Russell. 1999. “Physiological Pathways Regulating the Activity of Magnocellular Neurosecretory Cells.” *Progress in Neurobiology* 57 (98): 625–55.

Leng, Gareth, Colin Brown, Nancy Sabatier, and Victoria Scott. 2008. “Population Dynamics in Vasopressin Cells.” *Neuroendocrinology* 88 (3): 160–72. <https://doi.org/10.1159/000149827>.

Leng, Gareth, Celine Caquineau, and Nancy Sabatier. 2005. “Regulation of Oxytocin Secretion.” *Vitamins and Hormones* 71 (05): 27–58. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)71002-5](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)71002-5).

Leng, Gareth, Rafael Pineda, Nancy Sabatier, and Mike Ludwig. 2015a. “The Posterior

- Pituitary, from Geoffrey Harris to Our Present Understanding.” *Journal of Endocrinology* 226 (2): T173–85. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087>.
- . 2015b. “The Posterior Pituitary, from Geoffrey Harris to Our Present Understanding.” *Journal of Endocrinology* 226 (2): T173–85. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0087>.
- Leng, Gareth, and John A. Russell. 2019. “The Osmoresponsiveness of Oxytocin and Vasopressin Neurones: Mechanisms, Allostasis and Evolution.” *Journal of Neuroendocrinology* 31 (3): 1–17. <https://doi.org/10.1111/jne.12662>.
- Leng, Trystan, Gareth Leng, and Duncan J. MacGregor. 2017. “Spike Patterning in Oxytocin Neurons: Capturing Physiological Behaviour with Hodgkin-Huxley and Integrate-and-Fire Models.” *PLoS ONE* 12 (7): 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180368>.
- Li, Qing, and Donald G. Puro. 2001. “Adenosine Activates ATP-Sensitive K⁺ Currents in Pericytes of Rat Retinal Microvessels: Role of A1 and A2a Receptors.” *Brain Research* 907 (1–2): 93–99. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02607-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02607-5).
- Li, Ying, Alexander Mathis, Benjamin F. Grewe, Jessica A. Osterhout, Biafra Ahanonu, Mark J. Schnitzer, Venkatesh N. Murthy, and Catherine Dulac. 2017. “Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice.” *Cell* 171 (5): 1176–1190.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>.
- Lichardus B, Albrecht I, Ponec J, Linhart L. Water deprivation for 24 hours increases selectively blood flow in posterior pituitary of conscious rats. *Endocrinologia Experimentalis*. 1977 ;11(2):99-104. PMID: 301825.
- Lipschitz, D. L., W. R. Crowley, W. E. Armstrong, and S. L. Bealer. 2005. “Neurochemical Bases of Plasticity in the Magnocellular Oxytocin System during Gestation.” *Experimental Neurology* 196 (2): 210–23. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.003>.
- Lohmeier, Thomas E. 2003. “Neurohypophysial Hormones.” *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285 (24): 715–17.
- Lolait, Stephen. 1992. “Cloning and Characterization of a Vasopressin V2 Receptor and Possible Link to Nephrogenic Diabetes Insipidus.” *Nature* 357: 336–39. [file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/p21/xiong1993.pdf](file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan%20PhD/p21/xiong1993.pdf).
- Ludwig, Mike, and Gareth Leng. 2006. “Dendritic Peptide Release and Peptide-Dependent Behaviours.” *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2): 126–36.

<https://doi.org/10.1038/nrn1845>.

M

- Macfarlane, N A A. 1974. “Effects of Hypophysectomy in the Euryhaline on Sodium and Water Exchanges in the Euryhaline Flounder, *Platichthys Flesus*.” *General and Comparative Endocrinology* 22: 77–89.
- Marieb, Elaine N., Hoehn, Katja, 2008. *Anatomy & Physiology* by [Benjamin Cummings, 2008] (Hardcover) 3rd edition [Hardcover]
- Marvin, Jonathan S., Bart G. Borghuis, Lin Tian, Joseph Cichon, Mark T. Harnett, Jasper Akerboom, Andrew Gordus, et al. 2013. “An Optimized Fluorescent Probe for Visualizing Glutamate Neurotransmission.” *Nature Methods* 10 (2): 162–70. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2333>.
- Mazanet, Rosemary, and Clara Franzini-Armstrong. 1982. “Scanning Electron Microscopy of Pericytes in Rat Red Muscle.” *Microvascular Research* 23 (3): 361–69. [https://doi.org/10.1016/S0026-2862\(82\)80008-3](https://doi.org/10.1016/S0026-2862(82)80008-3).
- McKinley, Michael J., M. L. Mathai, R. M. McAllen, R. C. McClear, R. R. Miselis, G. L. Pennington, L. Vivas, J. D. Wade, and B. J. Oldfield. 2004. “Vasopressin Secretion: Osmotic and Hormonal Regulation by the Lamina Terminalis.” *Journal of Neuroendocrinology* 16 (4): 340–47. <https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01184.x>.
- Michau, Aurélien, Chrystel Lafont, Paula Bargi-Souza, Yasmine Kemkem, Anne Guillou, Magalie A. Ravier, Gyslaine Bertrand, et al. 2022. “Metabolic Stress Impairs Pericyte Response to Optogenetic Stimulation in Pancreatic Islets.” *Frontiers in Endocrinology* 13 (June): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.918733>.
- Millet, Rachel, Axel Rossi, Aurélie Ploquin, Alberto L. Epstein, Anna Greco, and Anna Salvetti. 2013. “Les Vecteurs AAV Pour Le Transfert de Gène in Vivo Ou Comment Un Petit Virus Devient Grand.” *Virologie* 17 (5): 343–53. <https://doi.org/10.1684/vir.2013.0534>.
- Mishra, Anusha, James P. Reynolds, Yang Chen, Alexander V. Gourine, Dmitri A. Rusakov, and David Attwell. 2016. “Astrocytes Mediate Neurovascular Signaling to Capillary Pericytes but Not to Arterioles.” *Nature Neuroscience* 19 (12): 1619–27.

<https://doi.org/10.1038/nn.4428>.

- Miyata, Seiji. 2015. “New Aspects in Fenestrated Capillary and Tissue Dynamics in the Sensory Circumventricular Organs of Adult Brains.” *Frontiers in Neuroscience* 9 (OCT): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00390>.
- Miyata, Seiji, and Glenn I. Hatton. 2002. “Activity-Related, Dynamic Neuron-Glial Interactions in the Hypothalamo-Neurohypophysial System.” *Microscopy Research and Technique* 56 (2): 143–57. <https://doi.org/10.1002/jemt.10012>.
- Miyata, Seiji, Hideki Tsujioka, Masanobu Itoh, Wataru Matsunaga, Hirofumi Kuramoto, and Toshikazu Kiyohara. 2001. “Time Course of Fos and Fras Expression in the Hypothalamic Supraoptic Neurons during Chronic Osmotic Stimulation.” *Molecular Brain Research* 90 (1): 39–47. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00072-9).
- Moore, Aleisha M., Lique M. Coolen, and Michael N. Lehman. 2022. “In Vivo Imaging of the GnRH Pulse Generator Reveals a Temporal Order of Neuronal Activation and Synchronization during Each Pulse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2117767119>.
- Morita, Shoko, and Seiji Miyata. 2012. “Different Vascular Permeability between the Sensory and Secretory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brain.” *Cell and Tissue Research* 349 (2): 589–603. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1421-9>.
- Morris, J F. 1976. “Distribution of Neurosecretory Granules among the Anatomical Compartments of the Neurosecretory Processes of the Pituitary Gland: A Quantitative Ultrastructural Approach to Hormone Storage in the Neural Lobe.” *J. Endocr.* 68: 225–34.

N

- Nagy, Andras. 2000. “Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring.” *Genesis* 26 (2): 99–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B).
- Nakai, Junichi, Masamichi Ohkura, and Keiji Imoto. 2001. “A High Signal-to-Noise Ca²⁺ Probe Composed of a Single Green Fluorescent Protein.” *Nature Biotechnology* 19: 137–41. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(02\)70014-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(02)70014-9).

Nowycky, Martha C., Elizabeth P. Seward, and Natalya I. Chernevskaia. 1998. "Excitation-Secretion Coupling in Mammalian Neurohypophysial Nerve Terminals." *Cellular and Molecular Neurobiology* 18 (1): 65–80. <https://doi.org/10.1023/A:1022575126738>.

O

Oh, Jihae, Chiwoo Lee, and Bong Kiun Kaang. 2019. "Imaging and Analysis of Genetically Encoded Calcium Indicators Linking Neural Circuits and Behaviors." *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 23 (4): 237–49. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2019.23.4.237>.

Okumoto, Sakiko. 2010. "Imaging Approach for Monitoring Cellular Metabolites and Ions Using Genetically Encoded Biosensors." *Current Opinion in Biotechnology* 21 (1): 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.009>.

Orloff, Jack, and Joseph Handler. 1967. "The Role of Adenosine 3', 5'-Phosphate in the Action of Antidiuretic Hormone." *American Journal of Medicine* 42: 757–68.

Ostrowski, Nancy L, Scott Young III, Mark Knepper, and Stephen Lolait. 1993. "Expression of Vasopressin V1a and V2 Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Liver and Kidney of Embryonic, Developing, and Adult Rats." *Endocrinology* 133 (4): 1849–59.

Ozaki, Y., M. Nomura, J. Saito, C. E. Luedke, L. J. Muglia, T. Matsumoto, S. Ogawa, Yoichi Ueta, and D. W. Pfaff. 2004. "Expression of the Arginine Vasopressin Gene in Response to Salt Loading in Oxytocin Gene Knockout Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 16 (1): 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01119.x>.

P

Padmanabhan, Vasantha, Kristin McFadden, David T. Mauger, Fred J. Karsch, and A. Rees Midgley. 1997. "Neuroendocrine Control of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Secretion. I. Direct Evidence for Separate Episodic and Basal Components of FSH Secretion." *Endocrinology* 138 (1): 424–32. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4892>.

Page, R. B., M. Gropper, E. Woodard, J. Townsend, S. Davis, and R. M. Bryan. 1990. "Role of Catecholamines in Regulating Ovine Median Eminence Blood Flow." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 258 (5 27-5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.5.r1242>.

- Patriarchi, Tommaso, Jounhong Ryan Cho, Katharina Merten, Mark W. Howe, Aaron Marley, Wei Hong Xiong, Robert W. Folk, et al. 2018a. “Ultrafast Neuronal Imaging of Dopamine Dynamics with Designed Genetically Encoded Sensors.” *Science* 360 (6396). <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>.
- . 2018b. “Ultrafast Neuronal Imaging of Dopamine Dynamics with Designed Genetically Encoded Sensors.” *Science* 360 (6396). <https://doi.org/10.1126/science.aat4422>.
- Peter, R. E. and Fryer, J. N. 1983. Endocrine functions of the hypothalamus of actinopterygians. In Davis, R. E. and Northcutt, R. G. (eds.) *Fish Neurobiology*, vol. 2, pp. 165–201. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press
- Peppiatt, Claire M., Clare Howarth, Peter Mobbs, and David Attwell. 2006. “Bidirectional Control of CNS Capillary Diameter by Pericytes.” *Nature* 443 (7112): 700–704. <https://doi.org/10.1038/nature05193>.
- Pfeiffer, Thomas, Yuening Li, and David Attwell. 2021. “Diverse Mechanisms Regulating Brain Energy Supply at the Capillary Level.” *Current Opinion in Neurobiology* 69: 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.010>.
- Pinto, Lucas, and Yang Dan. 2015. “Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior.” *Neuron* 87 (2): 437–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.021>.
- Pnevmatikakis, Eftychios A., and Andrea Giovannucci. 2017. “NoRMCorre: An Online Algorithm for Piecewise Rigid Motion Correction of Calcium Imaging Data.” *Journal of Neuroscience Methods* 291: 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.07.031>.
- Pointe, Joe La. 1977. “Comparative Physiology of Neurohypophysial Hormone Action on the Vertebrate Oviduct-Uterus.” *Integrative and Comparative Biology* 17 (4): 763–73. <https://doi.org/10.1093/icb/17.4.763>.
- Poulain, D. A, and J. B Wakerley. 1982. “Commentary Electrophysiology of Hypothalamic Magnocellular Neurones Secreting.” *Neuroscience* 7 (4): 773–808.
- Poulain D, & Jard S. Peptides neurohypophysaires: vasopressine et ocytocine. Dans : Neuropeptides et neuromédiateurs. Epelbaum J., Paris, Eds INSERM, p. 229-338, 1995.
- Prevot, V., N. Bellefontaine, M. Baroncini, A. Sharif, N. K. Hanchate, J. Parkash, C. Campagne,

and S. de Seranno. 2010. “Gonadotrophin-Releasing Hormone Nerve Terminals, Tanycytes and Neurohaemal Junction Remodelling in the Adult Median Eminence: Functional Consequences for Reproduction and Dynamic Role of Vascular Endothelial Cells.” *Journal of Neuroendocrinology* 22 (7): 639–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02033.x>.

Q

Qian, Tongrui, Huan Wang, Peng Wang, Lan Geng, Long Mei, Takuya Osakada, Yan Tang, et al. 2022. “Compartmental Neuropeptide Release Measured Using a New Oxytocin Sensor.” *BioRxiv*.

R

Raff, Hershel. 1993. “Interactions between Neurohypophysial Hormones and the ACTH-Adrenocortical Axis.” *Annals New York Academy of Sciences* 689: 411–25.

Richard, Philippe, Françoise Moos, Govindan Dayanithi, Laurent Gouzènes, and Nancy Sabatier. 1997. “Rhythmic Activities of Hypothalamic Magnocellular Neurons: Autocontrol Mechanisms.” *Biology of the Cell* 89 (9): 555–60. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(98\)80159-7](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(98)80159-7).

Robert, Jessica, and Éric Clauser. 2005. “Les Récepteurs de La Vasopressine: Structure Fonctionnelle et Transduction Signalétique Dans Les Cellules Cibles.” *Journal de La Societe de Biologie* 199 (4): 351–59. <https://doi.org/10.1051/jbio:2005037>.

Robinson, Linda J., and Thomas FJ Martin. 1998. “Docking and Fusion in Neurosecretion.” *Current Opinion in Cell Biology* 10 (4): 483–92. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(98\)80063-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(98)80063-X).

Rocca, Julius. 1997. “Galen and the Ventricular System.” *Journal of the History of the Neurosciences* 6 (3): 227–39. <https://doi.org/10.1080/09647049709525710>.

Romanò, Nicola, Anne Guillou, David J. Hodson, Agnès O. Martin, and Patrice Mollard. 2017. “Multiple-Scale Neuroendocrine Signals Connect Brain and Pituitary Hormone Rhythms.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (9): 2379–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616864114>.

- Rouget, C. (1873). Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 5, 603–663.
- Roy, Ranjan K., Ferdinand Althammer, Alexander J. Seymour, Wenting Du, Vinicia C. Biancardi, Jordan P. Hamm, Jessica A. Filosa, Colin H. Brown, and Javier E. Stern. 2021. “Inverse Neurovascular Coupling Contributes to Positive Feedback Excitation of Vasopressin Neurons during a Systemic Homeostatic Challenge.” *Cell Reports* 37 (5): 109925. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109925>.
- Rozen, F, C Russo, D Banville, and H. H Zingg. 1995. “Structure and Expression of the Bovine Oxytocin Receptor Gene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1): 200–204. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.1037>.
- Rucker, Hubert K., Howard J. Wynder, and W. Eric Thomas. 2000. “Cellular Mechanisms of CNS Pericytes.” *Brain Research Bulletin* 51 (5): 363–69. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00260-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00260-9).

S

- Sanborn, Barbara M., Chun Ying Ku, Sergiy Shlykov, and Lidiya Babich. 2005. “Molecular Signaling through G-Protein-Coupled Receptors and the Control of Intracellular Calcium in Myometrium.” *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 12 (7): 479–87. <https://doi.org/10.1016/j.jsigi.2005.07.002>.
- Schaeffer, Marie, Fanny Langlet, Chrystel Lafont, François Molino, David J. Hodson, Thomas Roux, Laurent Lamarque, et al. 2013. “Rapid Sensing of Circulating Ghrelin by Hypothalamic Appetite-Modifying Neurons.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4): 1512–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>.
- Scharrer, E. 1927. “Die Lichtempfindlichkeit Blinder Elritzen. (Untersuchungen Über Das Zwischenhirn Der Fische I.)” *Eingegangen Am* 7(1): 1–38.
- Scharrer, Ernst, and Berta Scharrer. 1936. “Über Drüsen-Nervenzellen Und Neurosekretorische Organe Bei Wirbellosen Und Wirbeltieren.”
- Schönfelder, U., A. Hofer, M. Paul, and R. H.W. Funk. 1998. “In Situ Observation of Living Pericytes in Rat Retinal Capillaries.” *Microvascular Research* 56 (1): 22–29.

<https://doi.org/10.1006/mvre.1998.2086>.

Shibuki, Katsuei. 1989. “Calcium-Dependent and Ouabain-Resistant Oxygen Consumption in the Rat Neurohypophysis.” *Brain Research* 487 (1): 96–104. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90944-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90944-X).

Sisó, Sílvia, Martin Jeffrey, and Lorenzo González. 2010. “Sensory Circumventricular Organs in Health and Disease.” *Acta Neuropathologica* 120 (6): 689–705. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0743-5>.

Son, Sook Jin, Jessica A. Filosa, Evgeniy S. Potapenko, Vinicia C. Biancardi, Hong Zheng, Kaushik P. Patel, Vicky A. Tobin, Mike Ludwig, and Javier E. Stern. 2013. “Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk between Neurosecretory and Preautonomic Networks.” *Neuron* 78 (6): 1036–49. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.025>.

Steinmetz, Nicholas A., Christina Buetfering, Jerome Lecoq, Christian R. Lee, Andrew J. Peters, Elina A.K. Jacobs, Philip Coen, et al. 2017. “Aberrant Cortical Activity in Multiple GCaMP6-Expressing Transgenic Mouse Lines.” *ENeuro* 4 (5): 1–15. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0207-17.2017>.

Swaab, D. F., F. Nijveldt, and C. W. Pool. 1975. “Distribution of Oxytocin and Vasopressin in the Rat Supraoptic and Paraventricular Nucleus.” *Journal of Endocrinology* 67 (3): 461–62. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0670461>.

T

Tabak, Benjamin A., Gareth Leng, Angela Szeto, Karen J. Parker, Joseph G. Verbalis, Toni E. Ziegler, Mary R. Lee, Inga D. Neumann, and Armando J. Mendez. 2022. “Advances in Human Oxytocin Measurement: Challenges and Proposed Solutions.” *Molecular Psychiatry*, no. July. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01719-z>.

Tamayo, Alejandro, Luciana Mateus Gonçalves, Rayner Rodriguez-Diaz, Elizabeth Pereira, Melissa Canales, Alejandro Caicedo, and Joana Almaça. 2022. “Pericyte Control of Blood Flow in Intraocular Islet Grafts Impacts Glucose Homeostasis in Mice.” *Diabetes* 71 (8): 1679–93. <https://doi.org/10.2337/db21-1104>.

Theodosios, Dionysia T., Dominique A. Poulain, and Stéphane H.R. Oliet. 2008. “Activity-

Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions.” *Physiological Reviews* 88 (3): 983–1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>.

Thornton SN, Norgren R. 2016. The neurobiology of thirst and sodium appetite. In: Pfaff DW, Volkow ND, editors. *Neuroscience in the 21st century*. New York: Springer.

Tilton, Ronald G. 1991. “Capillary Pericytes : Perspectives and Future Trends.” *Journal of Electron Microscopy Technique* 344: 327–44.

Tritsch, Nicolas X., and Bernardo L. Sabatini. 2012. “Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum.” *Neuron* 76 (1): 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.023>.

U

Ullsten, Sara, Daniel Espes, My Quach, Malin Fex, Monica Sandberg, and Per Ola Carlsson. 2020. “Highly Blood Perfused, Highly Metabolically Active Pancreatic Islets May Be More Susceptible for Immune Attack.” *Physiological Reports* 8 (13): 1–11. <https://doi.org/10.14814/phy2.14444>.

V

Varga and G.S. Greenwald, *Endocrinology*, 1979, 104 1525-1531

Verbalis, Joseph G., Michael P. Mangione, and Edward M. Stricker. 1991. “Oxytocin Produces Natriuresis in Rats at Physiological Plasma Concentrations.” *Endocrinology* 128 (3): 1317–22. <https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1317>.

Vigneaud, Vincent Du. 1953. “The Synthesis of an Octapeptide Amide With the Hormonal Activity of Oxytocin.” *Journal of the American Chemical Society*, 75 (19): 4879–80.

W

Weindl, Adolf. 1973. “Barrier Properties of the Subcommissural.” *Arch Neurol* 29: 16–22.

Williams, Mark J., and Bryon Adinoff. 2008. “The Role of Acetylcholine in Cocaine Addiction.” *Neuropsychopharmacology* 33 (8): 1779–97. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301585>.

- Williamson, Joseph R., Ronald G. Tilton, Charles Kilo, and Simon Yu. 1980. “Immunofluorescent Imaging of Capillaries and Pericytes in Human Skeletal Muscle and Retina.” *Microvascular Research* 20 (2): 233–41. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(80\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0026-2862(80)90010-2).
- Wittkowski, Werner, and Helga Brinkmann. 1974. “Changes of Extent of Neuro-Vascular Contacts and Number of Neuro-Glial Synaptoid Contacts in the Pituitary Posterior Lobe of Dehydrated Rats.” *Anatomy and Embryology* 146 (2): 157–65. <https://doi.org/10.1007/BF00315592>.
- Wu, Yu Er, Ryosuke Enoki, Yoshiaki Oda, Zhi Li Huang, Ken Ichi Honma, and Sato Honma. 2018. “Ultradian Calcium Rhythms in the Paraventricular Nucleus and Subparaventricular Zone in the Hypothalamus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (40): E9469–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804300115>.
- Wu, Zhijian, Aravind Asokan, and R. Jude Samulski. 2006. “Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy.” *Molecular Therapy* 14 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>.
- Wu, Z., Lin, D. & Li, Y. Pushing the frontiers: tools for monitoring neurotransmitters and neuromodulators. *Nat Rev Neurosci* **23**, 257–274 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00577-6>

Y

- Yang, Guangming, Jing Xu, Tao Li, Jia Ming, Wei Chen, and Liangming Liu. 2010. “Role of V1a Receptor in AVP-Induced Restoration of Vascular Hyporeactivity and Its Relationship to MLCP-MLC20 Phosphorylation Pathway.” *Journal of Surgical Research* 161 (2): 312–20. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.01.005>.
- Yoshimura, Ryoichi. 1993. “Localization of Oxytocin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Brain.” *Society* 133 (3): 1239–46.

Z

- Zacharias, David A., Geoffrey S. Baird, and Roger Y. Tsien. 2000. “Recent Advances in Technology for Measuring and Manipulating Cell Signals.” *Current Opinion in Neurobiology* 10 (3): 416–21. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00101-X).

- Zambach, Stefan Andreas, Changsi Cai, Hans Christian Cederberg Helms, Bjørn Olav Hald, Yiqiu Dong, Jonas Christoffer Fordsmann, Reena Murmu Nielsen, et al. 2021. “Precapillary Sphincters and Pericytes at First-Order Capillaries as Key Regulators for Brain Capillary Perfusion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (26). <https://doi.org/10.1073/pnas.2023749118>.
- Zhang, Y, M Rózsa, D Bushey, J Zheng, D Reep, G J Broussard, A Tsang, et al. 2020. “JGCaMP8: A New Suite of Fast and Sensitive Calcium Indicators.” *Janelia*, 8.
- Zhang, Yan, Márton Rózsa, Yajie Liang, Daniel Bushey, Ziqiang Wei, Jihong Zheng, Daniel Reep, et al. 2021. “Fast and Sensitive GCaMP Calcium Indicators for Imaging Neural Populations.” *BioRxiv*, 2021.11.08.467793. <https://doi.org/10.1101/2021.11.08.467793>.
- Ziv, Yaniv, Laurie D. Burns, Eric D. Cocker, Elizabeth O. Hamel, Kunal K. Ghosh, Lacey J. Kitch, Abbas El Gamal, and Mark J. Schnitzer. 2013. “Long-Term Dynamics of CA1 Hippocampal Place Codes.” *Nature Neuroscience* 16 (3): 264–66. <https://doi.org/10.1038/nn.3329>.