

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THÈSE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR
EN SCIENCES BIOLOGIQUES
SPECIALITE: CYTOLOGIE-HISTOLOGIE

par
Ouahiba BENMESSAOUD-MESBAH

THEME

DISTRIBUTION DE L'AQUAPORINE-4 DANS LE SYSTÈME HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSAIRE DE LA SOURIS C57BL6 ET LES EFFETS DE LA STIMULATION OSMOTIQUE

Soutenue publiquement le 15 avril 2012 devant le jury composé de:

Mme BENDJELLOUL. M	Professeur à l'USTHB	Président
Mme DORBANI-MAMINE. H	Professeur à l'USTHB	Directeur de thèse
Mme HARDIN-POUZET . H	Professeur, INSERM à Paris	Co-directeur de thèse
Mme AMIRAT. Z	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mme OUALI-HASSENAOUI S.	Maitre de conférence à l'USTHB	Examineur
Mr RENDON. A	Professeur émérite INSERM à Paris	Examineur

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I-Régulation de l'homéostasie hydro-électrolytique.....	4
1-Régulation à l'échelle de l'organisme.....	4
1-1-Variation de la natrémie.....	4
1-2-Variation du volume du milieu extracellulaire.....	5
2-Régulations endocrine et neuroendocrine de l'équilibre hydro électrolytique	7
2-1-Le système rénine-angiotensine-aldostérone	7
2-2-le facteur atrial natriurétique (FAN) ou peptide natriuétique auriculaire (ANP).....	7
II-Le système hypothalamo-neurohypophysaire.....	8
1-Organisation générale du SHNH.....	8
1-1-Noyaux hypothalamiques.....	8
1-1-1-Les noyaux supraoptiques (NSO).....	8
1-1-2-Les noyaux paraventriculaires (NPV).....	9
1-1-3-Les voies afférentes du SHNH.....	10
1-2-La neurohypophyse	11
1-2-1-L'éminence médiane (EM).....	11
1-2-2-Le lobe nerveux (ln) ou postérieur de l'hypophyse (post-hypophyse).....	12
2-Biosynthèse et fonctions physiologiques des hormones neurohypophysaires.....	15
2-1-organisation des gènes AVP et OT.....	16
2-2-Etapes de biosynthèse	16
2-3- Fonctions physiologiques	17
3- Modulation et contrôle de la fonction neuroendocrine.....	19
3-1-Le système de l'osmorégulation	19
3-2-Plasticité morphologique du SHNH.....	21
3-2-1-Les facteurs moléculaires impliqués dans la plasticité morphologique.....	23
3-2-1-1-Les molécules du cytosquelette et de la matrice extracellulaire.....	23
3-2-1-2 Autres facteurs moléculaires impliqués dans la plasticité morphologique	24
III-La famille des aquaporines.....	27
1-Découverte.....	27
2-Structure moléculaire des AQP.....	27
3-Les aquaporines dans le système nerveux central (SNC)	28
4-Distribution de l'AQP -4 dans les organes sensoriels et périphériques.....	29
5-Distribution cellulaire et subcellulaire de l'AQP -4 dans le système nerveux central.....	30
6- Rôles physiologiques de l'AQP-4.....	32
7-Mécanismes de régulation des aquaporines dans le SNC.....	34
IV- Interaction de l'AQP-4 avec le complexe des dystrophines.....	36

CHAPITRE MATERIEL ET METHODES

I-Animaux et conditions d'expérimentation	40
II-Méthodes	40
1-Fixation par perfusion et préparation des échantillons.....	40
2-Confection des coupes.....	41
2-1-Coupes au cryostat.....	41
2-2-Coupes au vibratome.....	41
3-Techniques immunohistochimiques.....	41
3-1-Marquage par immunofluorescence.....	42
3-1-1-Simple marquage.....	43
3-1-2-Double marquage.....	43
3-2-Marquage par immunoperoxydase en pré-inclusion.....	44
4-Traitement des coupes marquées à la peroxydase pour la microscopie électronique.....	45
4-1-Post-fixation au tétr oxyde d'osmium (OSO ₄).....	45
4-2-impregnation dans une résine araldite.....	45
4-3-Inclusion des coupes (à plat).....	45
4-4-Confection des coupes ultrafines.....	45

CHAPITRE RESULTATS

I-Distribution et cytoarchitecture des neurones magnocellulaires à vasopressine et à ocytocine et effet de la surcharge saline	46
1-Les neurones magnocellulaires dans les noyaux supraoptiques.....	46
2-Les neurones magnocellulaires dans les noyaux paraventriculaires.....	46
3-Projections des neurones magnocellulaires dans l'émence médiane	47
4-Projections des neurones magnocellulaires dans le lobe nerveux hypophysaire.....	47
II-Expression et distribution de l'AQP-4 gliale et vasculaire: effets de la surcharge saline	48
1-Dans les noyaux hypothalamiques.....	48
1-1-Au niveau des NSO.....	48
1-2-Au niveau des NPV.....	49
2- Dans la neurohypophyse.....	49
2-1-Au niveau de l'émence médiane.....	49
2-2-Au niveau du lobe nerveux hypophysaire.....	50
III-Expression et distribution de l'AQP-4 dans les neurones magnocellulaires : impact de la surcharge saline	51
1-Dans les noyaux hypothalamiques.....	51
1-1-Au niveau des NSO.....	51
1-2-Au niveau des NPV.....	51
2-Dans la neurohypophyse.....	52
2-1-Au niveau de l'émence médiane.....	52
2-2-Au niveau du lobe nerveux hypophysaire	52
IV-Aspects de plasticité du lobe nerveux hypophysaire dans les conditions de stimulation osmotique: aspects ultrastructuraux	53
V-Distribution subcellulaire de l'AQP-4, dans le lobe nerveux de	

l'hypophyse : impact de la surcharge saline.....	54
---	-----------

CHAPITRE DISCUSSION

I-Distribution des neurones magnocellulaires à avp et à ot, au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire et effets de la surcharge saline.....	57
---	-----------

II-Expression de l'AQP-4 dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'Hypothalamus et les effets de la stimulation osmotique	58
---	-----------

III-Expression de l'AQP-4 au niveau de la neurohypophyse et les effets de la surcharge saline.....	62
---	-----------

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	66
--	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	68
---	-----------

INTRODUCTION

L'homéostasie hydro-osmotique est essentielle à la vie et de tout temps, les scientifiques se sont penchés sur les mécanismes de sa régulation. La vasopressine fut découverte et isolée dans les années 1950 pour ses propriétés antidiurétiques (Du Vigneaud *et al.*, 1953), ce qui lui a valu le nom d'Hormone Antidiurétique (ADH). En effet, son rôle est essentiel pour l'organisme et lui permet de contrôler l'expansion de son volume extracellulaire en eau et son osmolarité plasmatique (Dunn *et al.*, 1973; Robertson, 1985). Chez la plupart des mammifères, l'hormone sécrétée est l'arginine vasopressine (AVP).

Par ailleurs, une autre hormone très proche en structure de la vasopressine, l'ocytocine (OT) participe à l'homéostasie hydrominérale grâce à sa fonction antidiurétique (Chou *et al.*, 1995) et surtout par son effet stimulant sur la natriurèse (Conrad *et al.*, 1986; Verbalis *et al.*, 1991).

Ces deux neuropeptides sont synthétisés principalement, dans les neurones magnocellulaires (NMC) des noyaux supra-optiques (NSO) et paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus. Ils sont ensuite transportés le long des axones de ces neurones jusqu'à leurs terminaisons dans le lobe postérieur de l'hypophyse (Swaab *et al.*, 1975 ; Vandersande and Dierickx, 1975). Ces produits sont contenus dans des granules, en attente de leur libération dans la circulation générale, en réponse à une activation électrique (Cowley *et al.*, 1988). En effet, en cas d'augmentation de l'osmolarité du milieu extracellulaire, des neurones hypothalamiques hautement spécialisés, les osmorécepteurs centraux, détectent les variations de la concentration des solutés du liquide extracellulaire et émettent des influx excitateurs pour les neurones magnocellulaires qui libèrent alors, la vasopressine (Bourque *et al.*, 1994 ; Oliet and Bourque, 1994; Bourque and Oliet, 1997).

Par ailleurs, les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) (Bourque, 1998 ; Hussy *et al.*, 2000) et la neurohypophyse (Hussy *et al.*, 2001; Rosso and Mienville, 2009) sont intrinsèquement osmosensibles.

La découverte d'une famille de canaux à eau, les aquaporines (Agre *et al.*, 1993; Preston *et al.*, 1992), a été récompensée par un prix Nobel de chimie en 2003, décerné au Professeur Peter Agre. Depuis, chez les mammifères, 13 membres de cette famille ont été répertoriés et leur distribution est ubiquitaire. Ils sont dénommés, par abréviation AQP et sont classés par ordre de leur découverte, de l'AQP-0 à l'AQP-12 (Verkman, 2005).

Dans le rein, l'AQP-2 est responsable de la diffusion passive de l'eau et de sa réabsorption par le tube collecteur. A ce niveau, son expression est régulée par la vasopressine (Knepper *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1995, Nielsen *et al.*, 2002; Fenton and Moeller, 2007).

Dans le cerveau, trois principales AQP sont identifiées chez les mammifères. Ce sont l'AQP-1, l'AQP-4 et l'AQP-9. L'AQP-4 est le canal dominant dans ce tissu. Historiquement, l'AQP4 est la première AQP détectée par hybridation *in situ* dans le parenchyme cérébral (Jung *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1994). L'AQP-4 serait impliquée dans différentes fonctions physiologiques, en rapport avec l'homéostasie de l'eau et de la pression osmotique dans le tissu cérébral.

En général, dans le tissu nerveux, l'AQP-4 est localisée au niveau des pieds astrocytaires péri-vasculaires. Les auteurs ont introduit alors la notion de polarité d'expression de ce canal. Dans cet environnement, on lui attribue un rôle dans le contrôle de la barrière hémato-encéphalique (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

Dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), l'expression de l'AQP-4 est aussi principalement gliale, en particulier au niveau des astrocytes. Cependant, contrairement aux autres régions du cerveau étudiées, elle se caractérise par l'absence de polarité. Cette disposition particulière de l'AQP4 dans ces noyaux hypothalamiques a permis à ces auteurs de lui attribuer des fonctions spécifiques, telles que le contrôle du volume cérébral et l'osmoréception centrale (Wells, 1998; Badaut *et al.*, 2000; Badaut *et al.*, 2002).

Les AQP sont en général localisées sur la membrane plasmique des cellules mais elles sont plus rarement décrites dans celle des organites intracellulaires. Cependant, certains travaux ont rapporté l'expression de l'AQP-9 au niveau des mitochondries dans les astrocytes et les neurones (Badaut *et al.*, 2004; Lindland *et al.*, 2004) et celle de l'AQP1 dans la membrane des granules de sécrétion de l'hypophyse (Arnaoutova *et al.*, 2008). Ces auteurs suggèrent que l'AQP1 serait importante dans les processus de sécrétion et de biogenèse de ces granules. Par ailleurs, l'AQP4 a, elle aussi, été détectée dans la membrane des granules à sécrétion régulée, du pancréas exocrine (Cho *et al.*, 2002) et de la glande parotide (salivaire), (Matsuki *et al.*, 2005).

La recherche de l'expression de l'AQP-4 dans le SHNH, a fait l'objet de nombreuses investigations, en particulier dans les noyaux hypothalamiques (NSO, NPV). Du point de vue fonctionnel, le rôle de l'AQP4 dans l'osmoreception est largement rapporté. Il reste que l'importance de l'AQP-4 dans de nombreuses fonctions de ce système reste à explorer,

notamment, dans la plasticité morphologique (Nicchia *et al.*, 2003) et dans la neurosecrétion (Niermann *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002).

Ainsi, notre travail de thèse se propose d'étudier l'expression de l'AQP4 et sa distribution, au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire, chez la souris C57BL6. Cette étude a été abordée par la technique de l'immunofluorescence selon le principe du simple et double marquage immunohistochimique.

Par ailleurs, l'exploration de cette nouvelle famille de protéines (les aquaporines), dans l'hypophyse est relativement récente. En effet, ce n'est qu'en 2007, que Kuwahara et collaborateurs ont, pour la première fois, caractérisé les différents types d'AQP dans l'hypophyse de rat. Ainsi sur les neuf types d'AQP (AQP-1 à 9) recherchés, par RT-PCR et par immunohistochimie, seules quatre AQP sont présentes. Il s'agit de l'AQP1, AQP3, AQP4 et l'AQP5.

Depuis, d'autres études se sont intéressées à l'expression de l'AQP4, dans l'hypophyse et les résultats obtenus ont fait l'objet de publications très récentes (Kuwahara *et al.*, 2010 ; Pocsai *et al.*, 2010). Ces résultats n'ont été jusqu'à présent rapportés que chez le rat, et leur distribution non encore bien établie. Aussi, nous sommes- nous proposés dans le présent travail de rechercher cette expression dans l'hypophyse de souris, par la technique d'immunoperoxydase.

De plus, nous avons recherché pour la première fois, la distribution de l'AQP-4, dans le lobe nerveux hypophysaire, à l'échelle subcellulaire. Ce lobe est intéressant car il représente le pôle effecteur du SHNH. Il est le site de libération des neurohormones (AVP et OT) et se situe en dehors de la barrière hémato-encéphalique.

Par ailleurs, nous avons comparé l'expression de l'AQP-4, dans le SHNH, entre la souris normalement hydratée (contrôle) et la souris soumise à une stimulation osmotique, par boisson d'une solution de NaCl à 2%, (surcharge saline), pendant une durée de huit jours. Cette dernière approche, nous permettra de faire une analyse morpho-fonctionnelle afin de comprendre les implications fonctionnelles de l'AQP-4, dans le SHNH.

I-REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE HYDRO-ELECTROLYTIQUE

L'homéostasie hydrominérale est essentielle à la vie et de tous temps les scientifiques se sont penchés sur les mécanismes de sa régulation. Ainsi, il est nécessaire de passer en revue les rappels sur le rôle primordial de l'ion sodium dans l'homéostasie hydrique avant d'aborder la régulation endocrine et neuroendocrine.

1-Régulation à l'échelle de l'organisme

1-1-Variation de la natrémie

L'ion sodium est l'ion majoritaire du liquide extracellulaire. Il joue un rôle fondamental dans le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme. L'abondance et le pouvoir osmotique de l'ion sodium dans le liquide extracellulaire, lui confèrent un rôle central dans la répartition de l'eau entre les compartiments intra- et extracellulaires de l'organisme. Cet ion circule librement entre les secteurs intra-vasculaire et interstitiel.

Quelque soit le tissu, la concentration d'ions sodium à l'intérieur des cellules est très inférieure à celle du compartiment extracellulaire. La quantité plasmatique de sodium extracellulaire (natrémie) peut subir de réelles modifications par le biais de pertes ou de gains en sodium. Cependant, cette natrémie tend à rester stable grâce à des ajustements immédiats du volume d'eau.

Dans l'organisme, les déséquilibres sévères de la natrémie, peuvent compromettre le pronostic vital de l'organisme. En effet, les déséquilibres aigus de la natrémie provoquent des mouvements d'eau entre les secteurs intra- et extracellulaires selon le gradient de pression osmotique, responsables respectivement d'une déshydratation ou d'un œdème cellulaire, auxquels le tissu nerveux est particulièrement sensible (**figure 1**).

En outre, il existe des mécanismes cellulaires d'adaptation aux modifications de la natrémie. En effet, l'hyponatrémie induit au niveau des cellules cérébrales, une diminution de l'osmolarité intracellulaire (hypotonicité plasmatique), par sortie de substances osmotiquement actives, ce qui permet de rétablir l'œdème cérébral (**figure1A**), (Faubel and Toff, 1999).

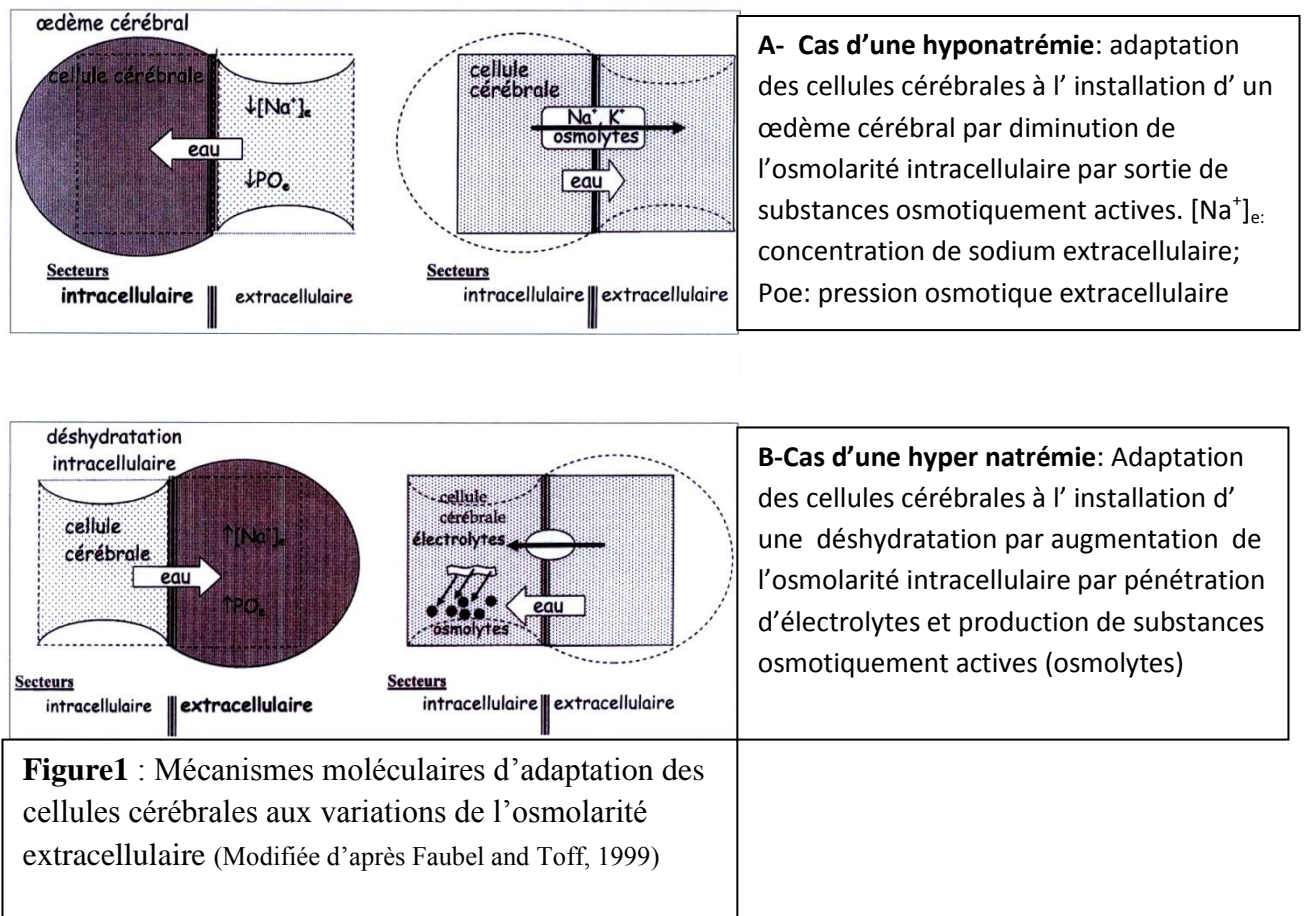
A l'inverse, l'hypernatrémie, suite à la déshydratation intracellulaire qu'elle installe, induit au niveau de ces cellules, une augmentation de l'osmolarité intracellulaire (hypertonycité plasmatique), par pénétration d'électrolytes et production de substances osmotiquement actives (osmolytes).

Si l'hypernatrémie s'installe progressivement, des mécanismes d'adaptations s'installent. Dans un premier temps, la contraction du volume cérébral, induite par l'hypernatrémie crée un gradient hydrostatique favorable à un mouvement du liquide

céphalorachidien vers l'interstitium cérébral, en augmentant ainsi son volume. Dans un second temps, les cellules cérébrales extraient des ions sodium, chlore et potassium de l'interstitium et produisent des osmolytes (MacIntire *et al.*, 2005). Ces mécanismes augmentent l'osmolarité de la cellule et diminuent ainsi, le différentiel osmotique entre les secteurs intra- et extracellulaires, limitant les transferts d'eau (**figure1B**).

Etant donné le rôle fondamental du sodium dans le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme et des échanges constants avec le milieu extérieur (alimentation, sécrétions digestives, sudorales, etc...), des mécanismes complexes de régulation de la natrémie sont mis en œuvre.

Plusieurs aires spécifiques du système nerveux central sont impliquées dans le contrôle de la prise de sel et sont responsables de l'ajustement de la réponse, en fonction des besoins de l'organisme (Daniels and Fluharty, 2004).



1-2-Variation du volume du milieu extracellulaire

Si le sodium ne franchit pas les membranes cellulaires, l'eau en revanche, est susceptible de circuler librement entre les compartiments intra- et extracellulaires, selon le gradient de pression osmotique en relation directe avec la natrémie (Dibartola, 2000; Guyton and Hall, 2000).

Au niveau de l'organisme, l'osmose est le processus de diffusion nette d'eau au travers des membranes cellulaires semi-perméables résultant d'une différence du nombre de molécules entre les compartiments intra- et extracellulaire. En effet, des particules non diffusibles en solution, qu'il s'agisse de molécules ou d'ions, exercent dans leur solvant une pression de nature hydrostatique, la pression osmotique. Cette pression est déterminée par le nombre de particules par unité de volume liquidien qui représente l'osmolarité (milliosmoles par litre) de la solution. Cette concentration peut s'exprimer également par rapport au poids de la solution, il s'agit alors d'osmolalité (milliosmoles par kilogramme). L'existence d'une différence d'osmolarité entre les deux compartiments intra- et extracellulaires est à l'origine d'un gradient de pression osmotique qui engendre des mouvements d'eau du secteur de moindre osmolarité vers le secteur de plus forte osmolarité. Dans les conditions physiologiques, la différence d'osmolarité étant extrêmement faible, le flux net d'eau au travers des membranes cellulaires, est nul.

L'apparition d'un gradient de pression osmotique est liée aux variations de l'osmolarité du seul secteur extracellulaire, mises en évidence par les modifications de l'osmolarité plasmatique. L'ion sodium étant l'ion majoritaire du secteur extracellulaire et celui qui subit le plus d'échanges avec le milieu extérieur (tube digestif, glandes sudoripares, rein, etc...), ce sont essentiellement, les variations de la natrémie qui modifient l'osmolarité plasmatique, la pression osmotique et induisent, en conséquences, des mouvements d'eau entre les compartiments extra- et intracellulaires (Goy-Thollot *et al.*, 2005).

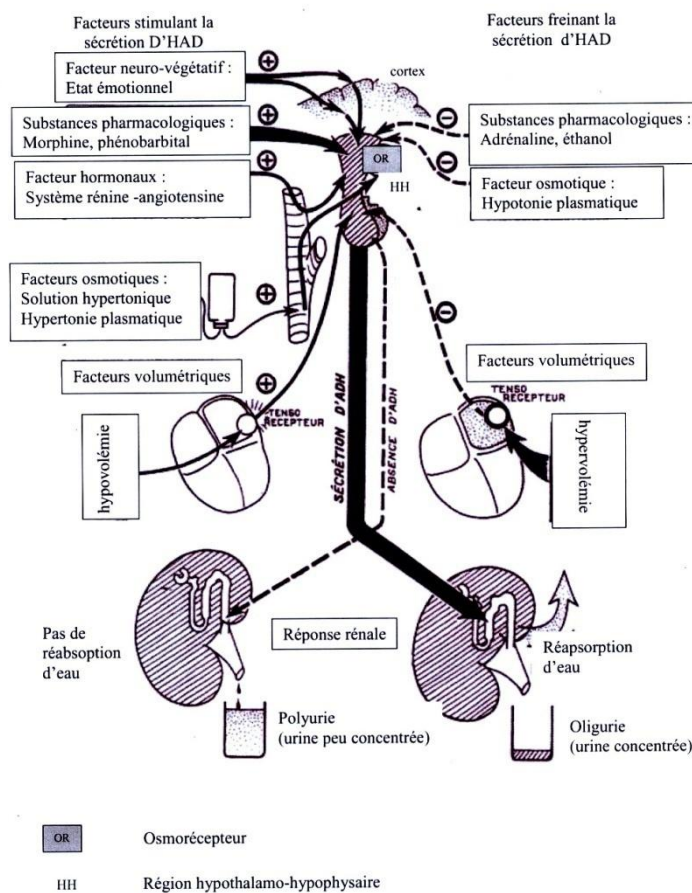


Figure 2: facteurs qui influencent la sécrétion de la vasopressine (Simon, 2008)

2-Réglulations endocrine et neuroendocrine de l'équilibre hydro-électrolytique

La régulation de l'équilibre hydro-électrolytique fait intervenir divers mécanismes nerveux et hormonaux qui vont, essentiellement, agir au niveau du rein favorisant ou s'opposant à l'excrétion du sodium et/ou de l'eau. De plus, cette régulation est liée à celle de la pression artérielle et de la volémie (**figures 2 et 3**).

2-1-Le système rénine-angiotensine-aldostérone

L'aldostérone est le principal facteur de régulation rénale de la concentration des ions sodium dans le liquide extracellulaire. En effet, l'aldostérone favorise la réabsorption rénale de sodium (Guyton and Hall, 2000) (**figure 2**).

Lors de la régulation de l'équilibre hydrosodé, la sécrétion d'aldostérone, par le cortex surrénalien, est déclenchée par l'angiotensine II issue de l'activation du système rénine-angiotensine. La sécrétion de rénine par les cellules myoépithéliales de la paroi des artéioles afférentes des glomérules rénaux est le point de départ de la cascade réactionnelle aboutissant à la formation d'angiotensine II. Sa mise en jeu est induite par une diminution du volume du liquide extracellulaire qui est perçue par des barorécepteurs (**figure 3**).

Le système rénine –angiotensine stimule la sécrétion de la vasopressine par le SHNH induisant une réabsorption d'eau rénale, responsable de la réduction de quantité d'urine émise (oligurie), (**figure2**). Ces mécanismes participent au déclenchement de la soif.

2-2-Le peptide natriurétique auriculaire (ANP)

Ce peptide est synthétisé dans les cellules atriales cardiaques (oreillette), en réponse à une expansion volumique des oreillettes (volémie).

En effet, une hypovolémie est détectée par les récepteurs à basse pression (grosses veines, oreillettes), ce qui conduit à une diminution de la sécrétion d'ANP et à une augmentation de la sécrétion de vasopressine. Ceci entraîne une réabsorption d'eau par le rein et le déclenchement de la soif. Inversement, une hypervolémie, stimule la production d'ANP par les oreillettes et inhibe la sécrétion de vasopressine, au niveau du SHNH. Ces mécanismes aboutissent à une production importante d'urine (polyurie) peu concentrée (**figures 2 et 3**), (Guyton and Hall, 2000).

La régulation neuroendocrine de la balance hydro-électrolytique fait intervenir principalement, le système hypothalamo-neurohypophysaire (SHNH). Ce système nous intéresse tout particulièrement, et sera développé dans le chapitre suivant.

II-LE SYSTEME HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAIRE

1-Organisation générale du SHNH

Le SHN est constitué de neurones magnocellulaires répartis en deux populations neuronales qui synthétisent deux neurohormones, la vasopressine (VP) et l'ocytocine (OT). Les corps cellulaires et les dendrites de ces neurones sont regroupés principalement dans les noyaux supraoptiques(NSO) et paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus. (**Figure 4**)

L'existence de groupes accessoires de neurones de type magnocellulaire, projetant vers le lobe nerveux hypophysaire (appelé aussi posthypophyse) a été démontré dans l'aire préoptique, l'hypothalamus latéral, le noyau périfornical et le noyau circularis (Sherlock *et al.*, 1975; Kelly and Swanson, 1980). Dans tous ces noyaux, les deux types de neurones coexistent dans des proportions variables selon les espèces.

L'architecture précise du SHNH a été particulièrement bien décrite chez le rat (Rhodes *et al.*, 1981; Sofroniew and Glasmann, 1981). L'anatomie générale reste très semblable chez la souris avec, néanmoins, quelques particularités (voir plus bas).

1-1-Noyaux hypothalamiques

1-1-1-Les noyaux supraoptiques (NSO)

Ce sont des noyaux pairs, localisés dans la partie ventrale de l'hypothalamus et placés de part et d'autre du chiasma optique. Chez la souris, l'examen anatomique des NSO a montré que chaque noyau peut s'étendre sur une profondeur approximative de 350-400µm. Leur forme est large (250µm) et aplatie (40µm) en amont (extrémité rostrale) et change graduellement, pour devenir plus étroite (65µm) et plus profonde (125µm) en aval (extrémité caudale) (Sharif-Naeimi *et al.*, 2008).

Les NSO sont homogènes, car ils sont exclusivement composés de neurones magnocellulaires (NMC). Les corps cellulaires de ces neurones et leurs dendrites constituent la majeure partie de ces noyaux. Les dendrites et leur ramifications s'étendent vers la surface ventrale du cerveau et s'étendent dans la lame gliale ventrale (ventral glial lamina, VGL) (Dyball et Kempay, 1982). Les corps cellulaires et les dendrites des neurones magnocellulaires sont proches les uns des autres et séparés par de fins prolongements astrocytaires.

Les NMCs se distinguent en deux populations cellulaires selon la neurohormone qu'ils secrètent; l'arginine- vasopressine (AVP) ou l'ocytocine (OT). La distribution des neurones à AVP et à OT dans les NSO a été rapportée d'abord chez le rat (Swaab *et al.*, 1975 ; Vandesande et Dierickx, 1975; Rhodes *et al.*, 1981) et bien plus tard chez la souris (Pow et Morris, 1989; Pirnik et Kiss, 2005 ; Sharif-Naeimi *et al.*, 2008). Les résultats ont montré une grande similitude dans la distribution de ces deux types de NMCs. En effet, les neurones à AVP sont principalement localisés dans la région caudale et préférentiellement sur le côté ventral des NSO. Les neurones à OT sont plus concentrés dans la région rostrale et sur la face

dorsale du NSO. Néanmoins, cette répartition est particulière chez la souris (C57BL) et se caractérise par une forte prédominance des neurones à AVP (77%) (Sharif-Naeimi *et al.*, 2008), contre seulement 69% chez le rat wistar (Swaab *et al.*, 1975).

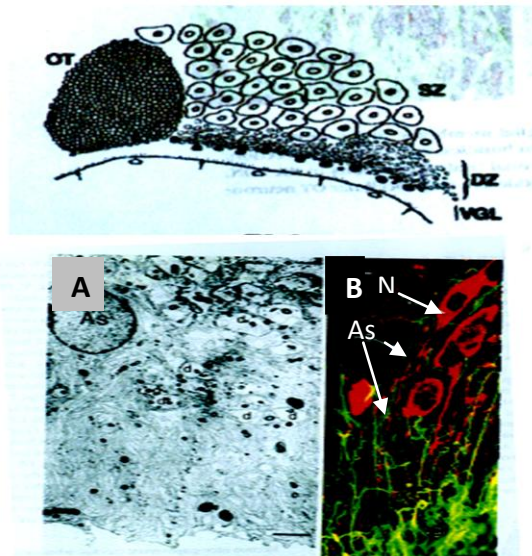


Figure 5:
1- Diagramme de l'organisation cytoarchitecturale des composantes gliale et neuronale, des noyaux supraoptiques, de l'hypothalamus de rat.
2- A. Cytoarchitecture des astrocytes (As) et des dendrites des neurones magnocellulaires, au niveau de la lame gliale ventrale (VLG), en ultrastructure.
B- Apposition entre les corps cellulaires des neurones magnocellulaires (N en rouge) et les prolongements astrocytaires (AS, en vert), par immunofluorescence.
(Hatton, 2002)

Dans la lame gliale ventrale (VGL) (**figure 5**), à côté des dendrites, se trouvent des cellules gliales principalement de type astrocyte. Parmi ces astrocytes, on distingue deux types majeurs; l'astrocyte fibreux et l'astrocyte protoplasmique. Le premier présente une forme radiaire et des prolongements longs et épais orientés ventro-dorsalement qui se terminent en fins processus astrocytaires qui s'insinuent entre les éléments neuronaux du NSO. Ce type d'astrocyte exprime la

protéine fibrillaire gliale acide (glial fibrillary acidic protein, GFAP) et la vimentine, composants des filaments intermédiaires du cytosquelette de ces cellules (Boffanti *et al.*, 1993; Bobak and Salm, 1996). Le second type est représenté par l'astrocyte protoplasmique, de forme stellaire et à prolongements courts et fins entourant les éléments neuronaux (Montagnese *et al.*, 1988; Bonfanti *et al.*, 1993). D'autres cellules gliales, telles les oligodendrocytes et la microglie, sont plutôt rares.

1-1-2-Les noyaux paraventriculaires (NPV)

Les NPV sont situés de part et d'autre du troisième ventricule et, contrairement au NSO, ils sont hétérogènes du fait de la présence de deux types de neurones, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires.

Les neurones parvocellulaires sont représentés par un corps cellulaire plus petit (10-15µm) et les fibres projettent dans (i) le système porte hypophysaire, via l'éminence médiane externe ou ventrale (Vandesande *et al.*, 1977). Ces neurones sont des neurones à corticotropin-Releasing Hormone (CRH), qui expriment la vasopressine, surtout après surrénalectomie, et qui contribueraient à la régulation de la sécrétion d'hormone adrenocorticotrope (ACTH), (ii) le tronc cérébral (noyau parabrachial, raphé, noyau du tractus solitaire (NTS), noyau dorsal du vague), dans la moelle épinière et aussi dans les aires limbiques notamment, dans le noyau du lit de la strie terminale et le septum latéral olfactif (Swanson and Sawchenko, 1983).

Dans la partie magnocellulaire du NPV les neurones à VP sont placés préférentiellement sur la face caudale et latéralement alors que les neurones à OT sont plus sur la face rostrale et médiane. Leurs axones quittent le NPV de façon latérale puis ventrale. Ils passent ensuite, près du NSO de façon ventrale, se projettent vers la face dorsale de l'éminence médiane et rejoignent le lobe nerveux hypophysaire (ou post-posthypophyse). Des collatérales des neurones magnocellulaires du NPV restent dans le NPV ou à proximité, dans la région périfornicale, dans l'éminence médiane, le noyau médian de l'amygdale et le septum latéral (Hatton *et al.*, 1985). En ce qui concerne les collatérales qui se terminent dans les NPV, ils semblent qu'elles contactent des neurones contenant le même neuropeptide.

Dans les NPV, les dendrites des neurones magnocellulaires, s'étendent de façon médiane et traversent la zone des neurones parvocellulaires et arrivent jusqu'à l'épendyme du troisième ventricule (Armstrong *et al.*, 1980).

1-1-3-Les voies afférentes du SHNH

L'activité des NMCs est sous contrôle d'afférences, en provenance notamment de certains noyaux hypothalamiques, de l'aire préoptique, du septum, du bulbe olfactif et des structures limbiques (Burbach *et al.*, 2001). Celles-ci sont organisées en synapses autour des corps cellulaires et des dendrites de ces neurones.

Parmi ces afférences, certaines sont stimulantes ou excitatrices: (1) de nature glutamatérgiques (El-Madjoubi *et al.*, 1996; 1997), d'origine intra-hypothalamique, (2) de nature catécholaminérgiques, issues du tronc cérébral et du bulbe rachidien, qui terminent principalement, sur les neurones à AVP mais aussi sur ceux à OT (Tribollet *et al.*, 1985; Day and Sibbald, 1988;), ainsi qu'en provenance des NTS. Ainsi, la noradrénaline, libérée par ces terminaisons, exerce un effet différent suivant les concentrations, probablement lié à la mise en jeu de sous types de récepteurs différents (Bealer and Crowley, 1998). Il existe, par ailleurs, une innervation sérotoninérgique, issue des noyaux du raphé, arrivant sur les noyaux magnocellulaires, préférentiellement sur les neurones à OT (Sawchenko *et al.*, 1983). Cette innervation est modeste, comparée à l'innervation noradrénérgique mais elle exerce un effet stimulateur sur la libération de l'AVP (Faull *et al.*, 1993) et aussi sur celle de l'OT (Mikkelsen *et al.*, 1999).

D'autres afférences du NSO sont inhibitrices, de nature GABAérgiques (acide gamma amino butyrique), (Theodosios *et al.*, 1986; El Madjoubi *et al.*, 1997), comme celles en provenance de la bande diagonale de Broca (DBB). Egalement, les corps mamillaires envoient des projections de type histaminergique qui activent les neurones magnocellulaires à AVP, par le biais des récepteurs H1 et qui inhibent les neurones à OT, par le biais de récepteurs H2 (Haas et Reiner, 1988; Weiss *et al.*, 1989). Ces afférences histaminergiques ont été impliquées dans les mécanismes mis en jeu lors de la grossesse, de la parturition, de la lactation, et de la déshydratation.

1-2-La neurohypophyse

Sur le plan anatomique, la neurohypophyse est composée de trois parties, l'éminence médiane (unfundibulum), la tige pituitaire ou tige unfundibulaire et du lobe nerveux ou postérieur de l'hypophyse (post-hypophyse). Cette dernière partie est communément appelée, à elle seule la neurohypophyse (NH). L'ensemble représente un site de projection majeur des axones des neurones en provenance des noyaux hypothalamiques (NSO et NPV).

1-2-1-L'éminence médiane (EM)

Elle est localisée à la base du troisième ventricule (3V) et organisée en trois couches superposées du 3V vers l'extérieur: la couche épendymaire, bordant le 3V, l'EM interne (EMI) ou dorsale et l'EM externe (EME) ou ventrale.

L'EMI est composée des prolongements des axones des neurones magnocellulaires, en provenance des NSO et des NPV et en projection vers le lobe nerveux de l'hypophyse. A ce niveau sont libérées, par exocytose, les deux neurohormones, AVP et OT, directement dans la circulation générale. L'EME contient les terminaisons des axones des neurones parvocellulaires, en provenance des NPV, qui contactent les capillaires du système de la circulation porte hypophysaire et libèrent les facteurs hypophysiotropes (Van Den Pol, 1982; Swanson and Sawchenko, 1983). A côté de ces éléments nerveux, l'EM renferme des cellules gliales, les épendymocytes de l'épithélium épendymaire, bordant le 3V et des cellules gliales spécialisées, les tanicytes. Selon la classification de Wittkowski (1980), cette dernière population se subdivise en deux sous populations:

- (1) les tanicytes épendymaires ou sub-épendymaires, en étroite connexion avec d'une part, la surface de la paroi épendymaire et d'autre part, avec les vaisseaux sanguins cérébraux. Cette connexion permet la mise en relation du liquide cérébro-spinal ventriculaire avec la circulation sanguine, grâce à leurs longs prolongements.

Durant leur trajet dans l'EME, les prolongements de ces tanicytes se ramifient et se terminent en face de la lame basale bordant l'espace péri-vasculaire, du système porte, en formant des pieds péri-vasculaires. De plus, ces prolongements forment fréquemment des paquets, qui parcourent le tractus des projections axoniques, allant vers le lobe nerveux hypophysaire et établissent souvent, des contacts étroits avec ces éléments nerveux (contacts synaptoïdes).

(2) les tanicytes astrocytaires (Schiebler and Zaborsky, 1975) souvent appelés aussi astrocytes, sont caractérisés par leurs prolongements courts, qui se terminent en pieds péri-vasculaires. Cette sous population de tanicytes ressemble morphologiquement, aux pituicytes protoplasmiques, du lobe nerveux hypophysaire.

Les deux sous population de tanicytes ont, en commun, leur immunoréactivité positive à la protéine fibrillaire gliale acide (Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP), composante majeure des filaments intermédiaires du cytosquelette. Du fait de leur distribution, les tanicytes seraient impliqués dans les échanges entre le 3V et les vaisseaux du système porte neurohypophysaire. Leur disposition radiale suggère leur implication dans le guidage des neurones hypothalamiques en développement (Kazlowsky and Coates, 1985).

Les changements morphologiques (plasticité), qui accompagnent l'activité de sécrétion dans l'EM, feraient intervenir les tanicytes, qui joueraient un rôle dans la stabilisation mécanique, grâce à l'édifice (échafaudage) organisé par les tanicytes. De plus, leur possibilité de remodelage, suggère leur implication dans la régulation de la neurosécrétion. Enfin, ces cellules seraient également impliquées, comme les autres cellules gliales, dans le processus tampon sur le potassium extracellulaire (Wittowski, 1998).

1-2-2-Le lobe nerveux (LN) ou postérieur de l'hypophyse (post-hypophyse)

Ce lobe, à côté des deux autres lobes (antérieur (antéhypophyse) et intermédiaire), constitue la glande hypophysaire ou pituitaire. D'origine embryologique différente, le LN hypophysaire est à l'origine du concept de neurosécrétion et de l'émergence de la discipline de neuroendocrinologie. En effet, l'examen histologique de cette glande, a permis une découverte majeure en endocrinologie, puisqu'elle se révélait constituée d'éléments glandulaires de type nerveux. Ce concept a conduit à la notion de neurone endocrine libérant des neurohormones (Scharrer et scharrer, 1937 et 1940; Dale, 1957).

Les axones magnocellulaires aboutissent au lobe nerveux de l'hypophyse. Ainsi, leurs terminaisons arrivent en contact avec les capillaires sanguins fenêtrés où sont libérées l'AVP et l'OT, qui passent alors, dans la circulation sanguine générale.

L'organisation ultra structurale du LN a été largement décrite (Morris, 1976; Tweedle, 1983; Nordmann, 1983; Wittkowski, 1986; Morris *et al.*, 1987; Morris *et al.*, 1988; Toescu and Morris, 1990). Ce lobe est composé:

- D'éléments nerveux, représentés par les ramifications des fibres axoniques non myélinisées des neurones magnocellulaires, en provenance des NSO et NPV. Ces ramifications se distinguent par leur aspect et les organites qui les composent, et forment trois sortes d'éléments:

(i) Des prolongements d'axones d'aspect clair et riches en éléments du cytosquelette (microtubules et neurofilaments) mais pauvres en granules de neurosécrétion (GNS), lesquels sont caractérisés par leurs contenus denses aux électrons (cœur dense). Ces

granules sont riches en neurohormones (AVP ou OT), lesquelles sont élaborées dans les corps cellulaires des neurones magnocellulaires et transportées, par un flux axonal rapide, vers les terminaisons nerveuses (TNs) du LN de l'hypophyse.

(ii) Des dilatations subterminales ou corps de Herring («*swelling*»), plus larges et enrichies en GNS, à cœur dense et présentent de nombreux lysosomes, des vacuoles et des mitochondries.

(iii) Des terminaisons nerveuses (TN) ou «*nerve endings*», qui renferment, en plus des GNS, des mitochondries et de très nombreuses microvésicules d'aspect clair (MV), regroupées en amas. Ces MVs sont assimilées à des vésicules synaptiques communément rencontrées dans les autres terminaisons nerveuses (Navone *et al.*, 1989).

Leur origine est controversée. Pour les uns, les MVs résultent de l'endocytose compensatoire de l'exocytose des GNSs (Douglas *et al.*, 1970), pour d'autres, les MVs et les GNS sont deux organites distincts (Navone *et al.*, 1989). Leurs rôles ne sont toujours pas élucidés. Cependant, il a été rapporté dans certains travaux, que la stimulation de la sécrétion des neurohormones, au niveau du LN isolé, n'induit en aucun cas, l'augmentation des MVs (Nordmann and Morris, 1976; Morris *et al.*, 1981). Au contraire, elle induit une augmentation du nombre d'une population de large vésicules appelées vacuoles, caractérisées par leur aspect transparent aux électrons (clair, électrolucent). Ainsi, il a été suggéré que ces vacuoles plutôt que les MVs participent à la compensation des membranes des GNS, après exocytose. Toutefois, les MVs seraient impliquées dans l'homéostasie du calcium dans les terminaisons nerveuses (Morris *et al.*, 1981).

-Une composante gliale: Élément majeur, la composante gliale constitue 25-30% du volume total du tissu, non neuronal. Elle est majoritairement représentée par un type d'astrocytes appelés pituicytes (Nordmann, 1977). Se basant sur les observations faites au microscope photonique, certains auteurs suggèrent que les pituicytes seraient représentés par, au moins, deux types; Le type protoplasmique et le type fibreux (Nordmann, 1977; Wittkowsky, 1986).

(i) Le pituicyte protoplasmique est le plus fréquent et se caractérise par un corps cellulaire avec un cytoplasme plutôt abondant et d'aspect clair. Son noyau est grand et de forme généralement arrondie ou parfois ovale. Sa chromatine est plus ou moins dense aux électrons. Ce type de cellule se caractérise par des prolongements cellulaires courts (Wittkowsky, 1986).

(ii) Le pituicyte fibreux se distingue par son corps cellulaire plus petit, son noyau ovalaire et surtout par ses longs prolongements cytoplasmiques. Cependant, cette classification ne s'avère pas très rigoureuse à cause des variations de formes et de tailles que peuvent prendre les deux types de pituicytes.

Par ailleurs, l'analyse ultra structurale de pituicytes, n'a pas plus aidé à la caractérisation et la classification des pituicytes. En effet, les résultats obtenus ont

conduit à différentes classifications. Selon certains auteurs, un seul et unique type cellulaire de base, avec de multiples aspects (Krsulovic and Bruckner, 1969).

Cependant, d'autres auteurs, sont plus nombreux à différencier un type intermédiaire de pituicyte, entre le type protoplasmique et le type fibreux (Wittkowski, 1998).

Les pituicytes fibreux se caractérisent par de longs prolongements ramifiés dans lesquels des éléments du cytosquelette, les filaments intermédiaires, sont nombreux et organisés de façon parallèle. L'immunomarquage des pituicytes grâce au GFAP, confirme cette différence (Redecker *et al.*, 1987).

Au contraire, le pituicyte protoplasmique exhibe un corps cellulaire riche en cytoplasme et en organites. Ses prolongements sont, au contraire, courts et souvent dépourvus de filaments du cytosquelette. Le corps cellulaire du pituicyte protoplasmique présente un appareil de Golgi bien développé et des granules de sécrétion, indiquant un important pouvoir de sécrétion. Il contient aussi, un réticulum endoplasmique lisse, en forme de tubule, de vésicule et de citerne et prédomine dans le corps cellulaire des pituicytes. A l'inverse, le réticulum endoplasmique rugueux est plutôt rare. De multiples granules osmiophiles, à cœur dense, inclusion lipidique et granule lipoprotéique, varient d'une cellule à l'autre et d'une espèce à l'autre (Wittkowski, 1980 et 1998).

Les microtubules et les filaments intermédiaires du cytosquelette sont aussi présents en proportions variables.

La plupart des pituicytes, indépendamment de leur classification, envoient des prolongements qui, soit enveloppent les axones soit, entrent en contact avec les capillaires sanguins fenêtrés. Dans ce cas, ces terminaisons de prolongements de pituicyte ("*endfeet*") forment une interface entre les terminaisons nerveuses et la lame basale péri vasculaire (Belenki et Polenov, 1963).

Sur le plan ultra structural, les prolongements des pituicytes ressemblent aux corps cellulaires de ces mêmes cellules. Des contacts de type «synaptoïdes» sont décrits entre les pituicytes et les fibres nerveuses. Ces contacts pseudo synaptiques diffèrent des vraies synapses par l'absence d'élément post-synaptique et par la présence seule d'un élément pré-synaptique. Néanmoins, cette juxtaposition entre les deux éléments, neuronal et glial est favorable aux échanges de signaux, indispensables à leur communication. Ainsi, par exemple, la taurine libérée par le pituicyte et transportée vers les fibres nerveuses, constitue une voie de signalisation. Dans l'autre sens, les neuropeptides libérés par les fibres nerveuses peuvent influencer l'activité des pituicytes (Hatton, 2002). Ces contacts synaptoïdes augmentent après stimulation du système par déshydratation et contribuent donc, à son activation (Wittkowsky et Brikmann, 1974).

La vascularisation du LN est très développée. Elle est représentée par des capillaires sanguins fenestrés, entourés par des cellules péri-vasculaires type péricytes. La fenestration de ces capillaires signifie que le LN est situé en dehors de la barrière hémato-encéphalique. Un espace péri-vasculaire entoure les capillaires sanguins et en est séparé par une lame basale.

En plus de tous ces éléments, le LN contient d'autres cellules comme la microglie, des macrophages et des fibroblastes (Nordmann, 1977; Pow *et al.*, 1989).

Le LN reçoit, en plus des fibres et des terminaisons neuroendocrines, en provenance des NSO et NPV, d'autres fibres nerveuses d'origine différentes: GABAérgiques (Buijs *et al.*, 1987) ou à enképhaline (Van Leeuwen *et al.*, 1983), catécholaminérgiques.

De plus, d'autres peptides peuvent co-localiser avec l'AVP, l'OT et leurs neurophysines.

Parmi ces peptides la galanine occupe une place particulière. Elle est exprimée par les neurones à AVP et son expression augmente lors d'une déshydratation (Landry *et al.*, 1997).

Ce peptide est aussi trouvé dans les pituicytes (Kawasaki *et al.*, 2007). Ce peptide jouerait de multiples rôles, notamment dans la plasticité morphologique (Shen *et al.*, 2001).

D'autres molécules, comme les opioïdes, par exemple, la dynorphine, sont co-exprimées dans les granules. Les opioïdes inhibent la sécrétion des hormones en se liant aux membranes des pituicytes ou celles des terminaisons nerveuses (Tsushima *et al.*, 1993).

L'Adénosine et l'ATP sont aussi présentes à côté des neuropeptides, dans les granules à cœur dense et sont libérés simultanément, avec l'AVP. L'ATP endogène et exogène exercent une modulation de la sécrétion hormonale.

2-Biosynthèse et fonctions physiologiques des hormones neurohypophysaires

L'AVP et l'OT sont deux nonapeptides (PM 1000 Da) connus dès le début du XX^e siècle, comme les principes actifs responsables des effets périphériques des extraits post-hypophysaires. Ces deux hormones ont été isolées, caractérisées chimiquement et synthétisées dans les années 1950, alors que la découverte de leur origine neuronale hypothalamique apportait la touche finale au concept de neurosécrétion. Dans les années 1970, les systèmes à vasopressine et à ocytocine se voyaient définitivement caractérisés sur le plan anatomique grâce à l'avènement des méthodes immunocytochimiques.

A l'inverse des neurotransmetteurs aminérgiques, qui sont synthétisés, recyclés et accumulés localement dans des microvésicules au niveau des terminaisons nerveuses, les neuropeptides présentent des mécanismes de biosynthèse et de sécrétion différents. Ils sont largement impliqués dans la découverte du processus de neurosécrétion. En effet, si la transcription et la traduction de ces neuropeptides se déroulent dans les corps cellulaires des NMCs de l'hypothalamus, leur maturation se fait dans les granules de neurosécrétion. Cette maturation intra-granulaire s'effectue pendant le transport axonal qui les fait aboutir au niveau des terminaisons nerveuses dans le lobe nerveux de la glande hypophysaire. A ce niveau, les deux neurohormones sont libérées par exocytose directement, dans la circulation générale, à travers l'endothélium fenêtré des capillaires sanguins.

Selon l'hormone sécrétée, on arrive à distinguer des neurones à AVP (vasopressinérgiques) et des neurones à OT (ocytocinérgiques). Contrairement au cas des microvésicules synaptiques, la sécrétion à partir des granules de neurosécrétion est rarement provoquée par un unique potentiel d'action mais requiert un train de potentiels (Douglas and Poisner, 1964; Nordmann *et al.*, 1987; Gainer and Wray, 1994). La propagation de l'onde de dépolarisation jusqu'aux terminaisons nerveuses, entraîne l'ouverture des canaux calciques,

d'où un influx de Ca^{++} et une augmentation du Ca^{++} intracellulaire Cette augmentation provoque l'exocytose des granules de neurosecrétion.

Les deux mécanismes de sécrétion peuvent coexister au sein d'un même neurone, notamment quand celui-ci co-exprime un neurotransmetteur et un neuropeptide.

2-1-Organisation des gènes AVP et OT (figure 6) (Burbach *et al.*, 2001)

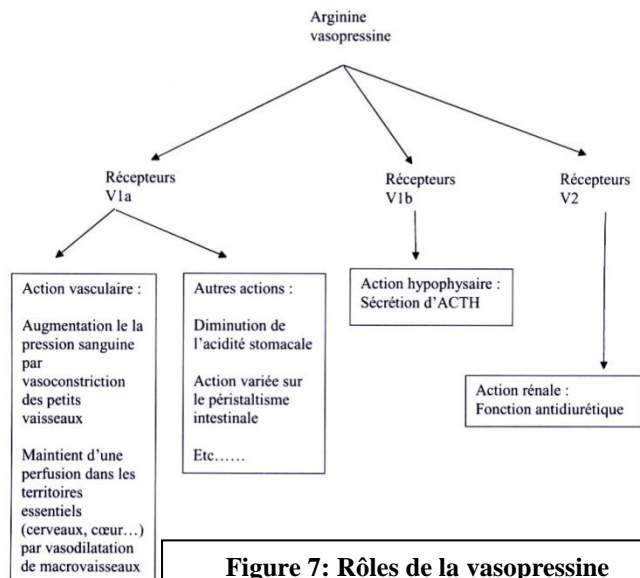
Ces gènes sont localisés sur le même chromosome, à très peu de distance l'un de l'autre et en position tête-bêche. Le gène AVP code pour une pré-pro-hormone de 166 acides aminés constituée d'un peptide signal, rapidement clivé lors de la biosynthèse, immédiatement suivi de la séquence de l'AVP (comportant 9 acides aminés reliés par un pont disulfure entre 1 et 6), qui est séparée par 3 acides aminés de la séquence de la neurophysine (NP-II). La NP-II est un peptide qui reste lié à l'AVP et sera libéré avec elle par exocytose. La partie terminale de la pré-pro-vasopressine est un glycopeptide de 39 acides aminés dont on ignore le rôle biologique éventuel. Le gène OT code de façon similaire pour un précurseur qui contient également une neurophysine (NP-I). Cependant la pré-pro-OT ne présente pas de glycopeptide. La structure primaire de l'OT ne diffère de celle de l'AVP que par deux acides aminés, en position 3 et 8.

2-2-Etapes de biosynthèse

Après transcription des ARNm des pré-pro-hormones par les ribosomes du réticulum endoplasmique granulaire, les protéines précurseurs résultantes sont emballées à leur sortie de l'appareil de Golgi dans des vésicules à cœur dense et subissent plusieurs étapes de maturation. Cette étape de maturation consiste en particulier, en l'élimination du peptide signal, la formation des ponts disulfures et pour l'AVP, les premières étapes de glycosylation. Au cours de ce processus, les neurophysines serviraient de protéines chaperonnes et permettraient l'adressage des neurohormones. Le clivage final du peptide et de sa neurophysine a lieu dans les granules de sécrétion, impliquant des enzymes protéases spécifiques

2-3- Fonctions physiologiques (figure 7)

La diversité des fonctions physiologiques des hormones neurohypophysaires, est corrélée à la distribution des récepteurs de la VP et de l'OT. En effet, les neurones magnocellulaires, en tant que cellules endocrines, exercent leurs fonctions grâce à la présence sur leurs cellules cibles, de récepteurs spécifiques (tableau).



**Figure 7: Rôles de la vasopressine
Barberis *et al.*, 1998**

Les récepteurs spécifiques pour la VP sont répertoriés et forment trois familles de récepteurs; V1, V2 et V3. Le récepteur V1 ou V1a est spécifique de l'AVP et active les phospholipases C, D et A2, augmentant ainsi la concentration intracellulaire en calcium et en protons (Briley *et al.*, 1994). Il est exprimé dans le foie, le muscle lisse des parois vasculaires, le cerveau et notamment l'hypothalamus mais aussi dans la neurohypophyse ;

Le récepteur V2 couplé à une protéine Gs induit la production d'AMPc par l'activation de l'adénylate cyclase. Ce récepteur est exclusivement localisé

dans le rein. Enfin, le récepteur V3 (également appelé V1b) stimule la phospholipase C et conduit à une augmentation du calcium intracellulaire. Ce dernier récepteur est surtout exprimé à la surface des cellules corticotropes de l'adenohypophyse, dans de multiples régions cérébrales, en particulier sur les neurones à AVP du NSO. De plus, on le retrouve dans les tissus périphériques tels que les muscles lisses des parois vasculaires, le rein, le thymus, les poumons, l'utérus et les glandes mammaires (Lolait *et al.*, 1995).

Le récepteur à l'OT est, lui aussi, couplé à la phospholipase C et provoque une augmentation du calcium intracellulaire. Ce récepteur possède une affinité peu différente pour l'OT et l'AVP, ce qui le rend peu sélectif pour les peptides neurohypophysaires. Il est exprimé dans l'utérus, les glandes mammaires et le système nerveux central et, comme autorécepteur, sur les neurones OT.

Les récepteurs pour l'AVP et le récepteur pour l'OT (OTR), appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Barberis *et al.*, 1998).

Les principales fonctions attribuées à l'AVP et à l'OT sont: le maintien de la balance hydrominérale, la vasoconstriction, la régulation corticotrope et la reproduction. En ce qui concerne l'équilibre hydrominéral, une des réponses physiologiques consiste à moduler l'excrétion de sel et l'eau par le néphron. Ces mécanismes natriurétiques et antidiurétiques sont régulés par les concentrations plasmatiques en OT et AVP et donc par leur taux de synthèse et de libération par les neurones magnocellulaires (Reeves et Andreoli, 1992). En effet, la stimulation des récepteurs V2, situés sur la membrane basale des cellules principales

des tubules collecteurs du rein, provoque une augmentation de l'AMPc qui va induire la translocation des canaux hydriques, les aquaporines (AQP-2), vers la membrane apicale de ces cellules et entraîne, par conséquent, la réabsorption de l'eau. L'OT, quant à elle, exerce au niveau du rein, un rôle natriurétique par l'intermédiaire de ses récepteurs présents sur la macula densa et les tubules proximaux (Windle *et al.*, 1996).

Lors d'une hémorragie, on constate une augmentation de la concentration d'AVP plasmatique, à des niveaux suffisants pour causer une vasoconstriction, grâce aux récepteurs V1 et V3 présents sur le muscle lisse des parois vasculaires pour atténuer l'hypotension. Cependant, hormis ce cas extrême, il ne semble pas que l'AVP exerce une activité de régulation de la pression artérielle (Hirsh *et al.*, 1993).

L'AVP libérée par les neurones parvocellulaires des NPV, dans le système porte au niveau de l'éminence médiane externe, stimule l'axe corticotrope et induit la libération d'ACTH via les récepteurs V3.

Il existe deux grands axes physiologiques qui sont immédiatement mobilisés et interagissent en situation de stress.

Les neurones parvocellulaires localisés dans la zone médiane des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (NPV), constituent l'axe hypothalamo-hypophysio- surrénalien ou axe corticotrope. Ces neurones intègrent les informations issues de diverses afférences des centres supérieurs et en réponse, libèrent dans l'éminence médiane la corticolibérine (corticotropin releasing hormone, CRH) et l'AVP. Ces produits sont transportés, via l'éminence médiane externe, par l'intermédiaire du système porte hypophysaire, vers les cellules corticotropes de l'adénohypophyse. L'AVP, via les récepteurs V1b ou V3, agit en synergie avec le CRH en potentialisant son action stimulatrice sur la synthèse et la libération de la corticotropine (ACTH: adencorticotropic hormone). L'ACTH passe dans la circulation générale et agit au niveau des cellules de la couche réticulo-fasciculée du cortex surrénalien et stimule la synthèse et la libération de glucocorticoïdes (le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rat) (Makara, 1992).

Dans ce système, suite à un stress hyperosmotique (surcharge saline) le taux basal d'ARNm de l'AVP augmente alors que celui de la CRH diminue. Par conséquent, l'AVP pourrait jouer un rôle dominant dans la régulation de la sécrétion de l'ACTH, en situation de stress (Raff, 1993; Amaya *et al.*, 2001). Plusieurs voies de contrôle sont discutées et permettent aux neurones magnocellulaires, à vasopressine et à ocytocine, des NPV, d'influencer l'activité des neurones parvocellulaires (Zelena *et al.*, 2003; Engelmann *et al.*, 2004).

L'ocytocine est principalement impliquée dans la parturition et la lactation (Young *et al.*, 1998). Elle est libérée de façon importante par la NH et l'expression de ses récepteurs spécifiques augmente fortement au niveau du myomètre utérin, au moment de la parturition. Cela provoque des contractions puissantes et aide à l'expulsion des petits. Quant au rôle de l'OT dans la lactation, il est double puisqu'elle permet l'éjection du lait en stimulant la contraction des cellules myoépithéliales des canaux galactophores mais elle agit aussi sur la production du lait en stimulant la libération de la prolactine. Des travaux récents, réalisés sur des femelles dépourvues d'expression d'OT et de

leur récepteur ont montré que ces dernières ont une gestation et une mise bas normales mais qu'elles sont incapables d'allaiter leurs portées (Russell *et al.*, 2003). Ces résultats confortent le rôle primordial de l'OT dans la lactation mais mettent en doute son rôle dans la parturition.

Enfin, par leurs projections collatérales vers le SNC, les neurones magnocellulaires hypothalamiques sont impliqués dans la régulation de certains comportements sexuels et de la mémoire. Dans ce cas, l'OT et l'AVP n'exercent plus leurs fonctions en tant que neurohormones mais plutôt comme neurotransmetteurs (Giuliano and Rampin, 2000).

3- Modulation et contrôle de la fonction neuroendocrine

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité neurosecrétice des neurones magnocellulaires (Viero and Dayanithi, 2008) (**figure 8**). Parmi, ces facteurs les neuromédiateurs (GABA et glutamate), constituent la voie de régulation principale. En effet, ils sont transmis par les afférences nerveuses, en particulier en provenance des structures nerveuses osmosensibles. Ces structures et le système magnocellulaire qu'elles contrôlent, constituent ensemble le circuit d'osmosensibilité.

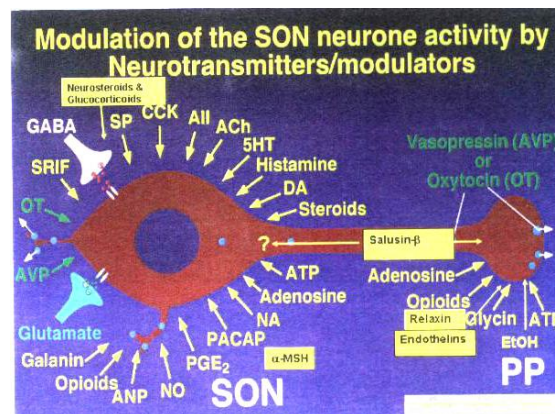


Figure 8: Facteurs modulateurs de l'activité des neurones magnocellulaires, dans les noyaux supraoptiques (SON) et le lobe nerveux de la glande pituitaire (PP) (diagramme modifié par Viero and Dayanithi, 2008)

3-1-Le système de l'osmorégulation

Le mécanisme de contrôle de l'osmosensibilité des neurones à AVP et à OT est complexe (Bourque *et al.*, 1994; Oliet and Bourque, 1994; Bourque and Oliet, 1997; Bourque, 1998; Hussy *et al.*, 2000; Honda, 2003).

Les afférences osmotiques centrales constituent la voie de l'osmosensibilité extrinsèque. En effet, le SHNH reçoit des projections issues de l'organe subfornical (SFO), de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et de l'aire préoptique médiane (MnPO).

De plus, les neurones magnocellulaires des noyaux hypothalamiques sont directement osmosensibles, c'est l'osmorégulation intrinsèque.

Plus récemment, Hussy et collaborateurs (2002) ont pu démontrer que la neurohypophyse est également osmosensible et peut ainsi contrôler localement la sécrétion des neurohormones. Deux mécanismes sont

responsables de cette sensibilité intrinsèque des neurones magnocellulaires (**figure 9**).

Le premier représente les mécanorécepteurs, présents sur la membrane plasmique des NMC, responsables de la transduction du signal (osmoreception) directement aux neurones (Bourque *et al.*, 1994; Oliet et Bourque, 1994; Bourque et Oliet, 1997; Bourque, 1998). Ce sont des canaux cationiques perméables à la fois au Na⁺ et au K⁺ (Stretch-inactivated cationic channels), responsables des propriétés électriques et des potentiels de membrane des neurones. La probabilité d'ouverture de ces canaux augmente avec la réduction du volume cellulaire, induite par un stimulus hyperosmotique, ce qui provoque la dépolarisation de la membrane et stimule la décharge hormonale.

A l'inverse, dans le cas d'un stimulus hypoosmotique, l'augmentation du volume cellulaire provoque la fermeture de ces canaux et une hyperpolarisation de la membrane avec un effet inhibiteur sur la neurosecrétion.

Le second mécanisme de l'osmorégulation des NMCs, implique les cellules gliales (**figure 9, Hussy, 2002**). Les astrocytes du NSO et les pituicytes de la NH sont capables d'accumuler spécifiquement la taurine, un acide aminé qui est un produit de la dégradation de la méthionine et de la cystéine (Pow, 1993; Miyata *et al.*, 1997, Rosso *et al.*, 2004).

Le rôle de la taurine dans le cerveau n'est pas encore tout à fait établi. Néanmoins, on sait que sa sécrétion est osmo-dépendante, ce qui laisse suggérer son implication dans le contrôle du volume cellulaire (Pasantés-Morales and Schousboe, 1997). Dans le SHNH, la libération de la taurine est constante dans les conditions basales (iso-osmotiques), augmente lors d'un stress hypo-osmotique (stimulation) et diminue en milieu hyper-osmotique (inhibition) (Deleuze *et al.*, 1998, 2000; Hussy *et al.*, 2001). Son transport est passif via des canaux anioniques volume-dépendants, associés aux récepteurs de la glycine. L'activation de ces récepteurs par la taurine, induit l'ouverture des canaux et l'entrée du chlore (Cl⁻) et par conséquent, empêche la dépolarisation de la membrane des neurones et la libération des hormones.

Cette voie d'osmoregulation est indirecte puisque la taurine libérée par les cellules gliales agit sur les récepteurs de glycine (GlyR) localisés sur la membrane des corps cellulaires et des terminaisons nerveuses des NMCs. Ainsi, dans les NSO l'osmorégulation intrinsèque des NMC est le résultat combiné d'un double contrôle ; l'un excitateur (cas des mécanorécepteurs activés en hyper et inhibés en hypotonie) et l'autre inhibiteur (cas de la taurine gliale et des récepteurs de glycine au niveau du neurone, inhibés par une hyper et activés par une hypotonie).

Dans la NH, l'osmorégulation implique aussi, la taurine libérée par le pituicyte et les récepteurs de la glycine présents sur la membrane des terminaisons nerveuses des NMCs, avec les mêmes effets que ceux signalés dans le NSO (Hussy, 2002). Ainsi, les cellules gliales sont d'une part, sensibles aux variations de l'osmolarité du milieu extracellulaire (osmosensibles) et d'autre part, sont capables de transmettre cette information aux cellules nerveuses via la taurine, qui agit sur l'activité électrique et neurosecrétoire des NMCs

De plus, des travaux récents, réalisés *in vitro* sur des cultures de pituicytes sont venus non seulement conforter le rôle préétabli de ces cellules dans l'osmorégulation, mais en plus, ils ont introduit un nouveau concept de régulation locale de la sécrétion de l'AVP et l'OT (Rosso

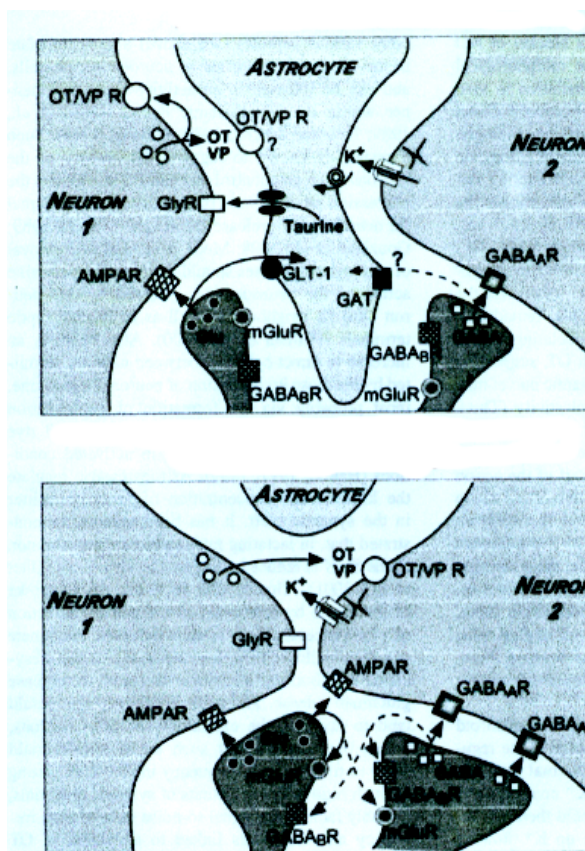
et al., 2004, Rosso and Mienville, 2009). En effet, selon ce dernier concept, l'AVP, et probablement aussi l'OT, endogènes, via les récepteurs V1a, seraient capables de stimuler la sécrétion de la taurine, par les pituicytes.

Par conséquent, cette découverte a permis de mettre en place un nouveau mécanisme de régulation de la sécrétion de l'AVP et l'OT, où s'exerce un rétrocontrôle négatif. De plus, comme l'AVP et l'OT peuvent être libérées, localement, par les dilatations (swelling) des axones magnocellulaires, au niveau de la neurohypophyse (Morris *et al.*, 1988; Nordmann *et al.*, 1988), ces hormones peuvent agir, localement, sur la sécrétion de taurine par les pituicytes et agir, ainsi, par un rétrocontrôle négatif sur leurs propres sécrétions

Ce mécanisme de contrôle serait spécifique à la neurohypophyse et ne semble pas s'appliquer aux NSO. En effet, à ce niveau, ni l'AVP ni l'OT, ne sont capables d'induire la sécrétion de taurine par les astrocytes (Hussy *et al.*, 2000).

3-2-Plasticité morphologique du SHNH

Il est établi, depuis déjà plusieurs années, que le SHNH adulte, subit un remodelage au niveau de son organisation morphologique, affectant à la fois les neurones et les cellules gliales. Cette plasticité structurale est démontrée lorsque le SHNH est activé par une forte demande de sécrétion des neuropeptides, lors de stimulations physiologiques diverses. Elle est visible aussi bien dans les noyaux magnocellulaires hypothalamiques que dans la NH (Hatton, 1988, 1990, 1997, 1999; Théodosis and Poulain, 1993; Théodosis and Mac Vicar, 1996; Théodosis *et al.*, 1998; Théodosis, 2002). (**Figure 10**).



Au cours de la stimulation du SHNH, par déshydrations ou par stimulation osmotique, ou encore la parturition ou la lactation, la couverture gliale diminue remarquablement, aussi bien autour des somas et des dendrites des neurones magnocellulaires, situés dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), qu'autour des terminaisons des axones de ces neurones dans la NH (Theodosis et Poulain, 1993 ; Hatton, 1997). Cette diminution est la conséquence de la rétraction des processus astrocytaires. Cette rétraction se traduit, dans les NSO et les NPV, par une augmentation des juxtapositions membranaires inter-neuronales au niveau des somas et des dendrites des neurones. Elle est accompagnée aussi, dans les NSO, d'une diminution spécifique et réversible du marquage à la GFAP, d'une diminution de l'épaisseur de la

Figure 10: Représentation schématique de la plasticité neuro-gliale au niveau des noyaux supraoptiques (NSO): implication dans les réarrangements synaptiques responsables de la modulation de l'activité neuronale (Theodosis and McVicar, 1996)

lame gliale ventrale (VGL) et de la réorientation des processus astrocytaires (Salm, 2000).

Dans l'hypothalamus, ces changements neuro-gliaux sont accompagnés d'une augmentation du nombre de synapses afférentes aux neurones magnocellulaires, plasticité synaptique (Theodosis *et al.*, 1995; El-Madjoubi *et al.*, 1996, 1997; Langle *et al.*, 2003; Theodosis *et al.*, 2006a) et du nombre de terminaisons d'axones, qui contactent simultanément plusieurs éléments post-synaptiques dans les NSO. Ces synapses dites multiples ou partagées, sont observées entre des somas adjacents, entre des somas et des dendrites ou entre des dendrites adjacentes (Theodosis *et al.*, 1981; Theodosis et Poulain, 1984; Tweedle and Hatton, 1984). Ces changements synaptiques affectent aussi bien les afférences excitatrices; glutamatergiques et noradrénergiques, que les afférences inhibitrices GABAérgiques (Théodosis et Poulain, 1993; Gies et Théodosis, 1994; El Madjoubi *et al.*, 1996; Michaloudi *et al.*, 1997). Les remaniements neuro-gliaux, comme les synaptiques, sont réversibles.

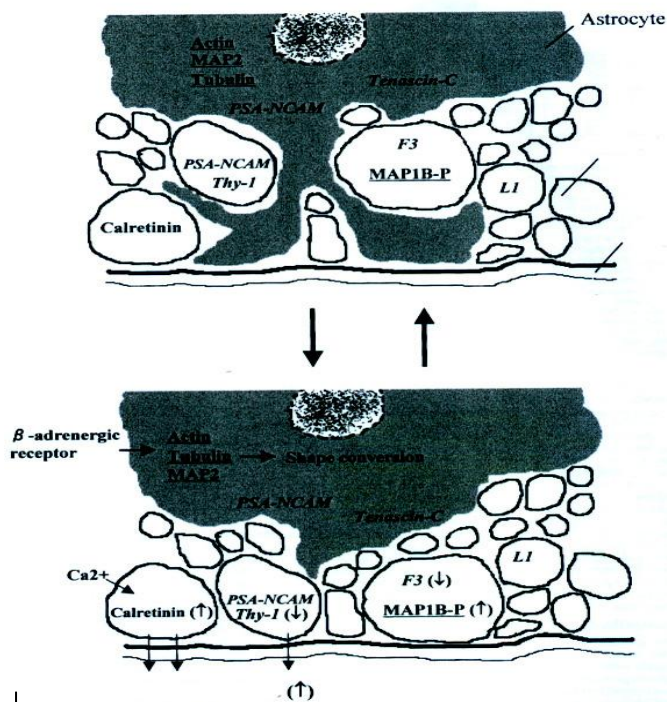
Ces changements sont accompagnés d'une hypertrophie des somas de ces neurones (Modney and Hatton, 1989; Gies et Théodosis, 1994; El Madjoubi *et al.*, 1996).

Ces réarrangements morphologiques ont des conséquences fonctionnelles, notamment la réduction de la capture du K⁺ et du glutamate engendrant une excitabilité neuronale plus importante et en particulier, une persistance de la stimulation glutamatérgique (Hatton, 1997; Piet *et al.*, 2004).

En effet, l'une des principales fonctions des astrocytes est de capter et de dégrader le glutamate et le GABA libérés lors de la transmission synaptique. La rétraction gliale a donc, pour effet, de diminuer la capture de ces deux neurotransmetteurs des fentes synaptiques et augmenter ainsi, l'effet glutamatérgique et GABAérgique sur les neurones magnocellulaires. Par ailleurs, les astrocytes jouent un rôle important de «tampon spatial» du K⁺. En effet, après le passage de l'influx nerveux, le K⁺ accumulé dans le milieu extracellulaire, est capturé par les astrocytes. Cette rétraction astrocytaire va permettre une augmentation de la concentration du K⁺ dans le milieu extracellulaire et ainsi, une augmentation de l'excitabilité des neurones magnocellulaires. De plus, la rétraction gliale, diminue des interactions de la taurine, libérée par les astrocytes, avec les récepteurs neuronaux de la glycine (Hussy, 2002).

Dans la NH, des réarrangements similaires à ceux observés dans les noyaux hypothalamiques, se produisent dans les mêmes conditions de stimulation de l'activité de neurosecrétion (**figure 11**).

En conditions basales, les pituicytes enveloppent les axones et les terminaisons nerveuses, les processus pituicytaires s'interposent aussi entre les terminaisons neurosecrétrices et la lame basale de l'espace perivasculaire, limitant leur contact.



En conditions d'activation du système, les pituicytes se séparent des axones des neurones magnocellulaires et les libèrent. De même, les processus pituicytaires se rétractent de la lame basale, ce qui provoque une augmentation des contacts neuro-vasculaires et favorise la libération des neurohormones (Hatton, 1997, 1999). Ces changements morphologiques sont, comme dans les noyaux hypothalamiques, rapides et réversibles.

Deux catégories de molécules peuvent intervenir dans la plasticité structurale. Il s'agit des molécules du cytosquelette et des molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire cellulaire (Cell Adhesion Molecule, CAM) (Miyata *et al.*, 2001).

Figure 11: Mécanismes moléculaires de la plasticité structurale dans le lobe nerveux et conséquences sur les réorganisations neurovasculaire, neurogliale et neuroneuronale, après stimulation par déshydratation, (Miyata *et al.*, 2001).

3-2-1 Les facteurs moléculaires impliqués dans la plasticité morphologique

3-2-1-1 Les molécules du cytosquelette et de la matrice extracellulaire

Dans les NSO et NPV, la rétraction des pieds astrocytaires lors de l'allaitement ou de la déshydratation, s'accompagne de modifications du cytosquelette affectant les astrocytes et les neurones.

Ces modifications se situent tant au niveau de l'expression que dans la répartition de certaines molécules qui composent ce cytosquelette. C'est le cas de la GFAP et la vimentine mais aussi de la tubuline et de certaines protéines associées aux microtubules (MAP: Microtubule Associated Proteins), telles que les MAP2 dans les axones et les cellules gliales (Nothias *et al.*, 1996; Oliet *et al.*, 2001).

La distribution des microtubules et des microfilaments d'actine dans les astrocytes change considérablement après stimulation β-adrénergique (Miyata *et al.*, 1999).

Dans la NH, les pituicytes expriment aussi, de grandes quantités de MAP2 et de tubuline (Matsunaga *et al.*, 1999).

Le niveau de MAP2-P (forme phosphorylée) dans les terminaisons des neurones magnocellulaires augmente aussi après déshydratation (Nothias *et al.*, 1996, 1997).

D'autre part, les dystrophines, groupe de protéines appartenant au cytosquelette sous membranaire et liant l'actine filamenteuse, ont été également décrits, pour la première fois, dans le SHNH (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998). La distribution de ces protéines est partagée

entre les neurones magnocellulaires, dans les NSO et dans la neurohypophyse et les pituicytes. Leur distribution est modifiée suite à une déshydratation par privation d'eau, ce qui laisse suggérer leur implication dans les mouvements cellulaires qui accompagnent les changements morphologiques du SHNH.

La seconde subdivision de molécules correspond aux molécules d'adhésion cellulaire (CAMs). Elles sont impliquées dans la reconnaissance cellule-cellule et/ou dans l'adhésion cellule-matrice extracellulaire. Parmi celles qui s'expriment dans le SHNH, on trouve la forme polysialylée de la N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), la PSA-NCAM (Théodosis *et al.*, 1991, 2000), la glycoprotéine F3 (Monlezun *et al.*, 2005 ; Théodosis *et al.*, 2000), la tenascine-C (Théodosis *et al.*, 1997).

3-2-1-2 Autres facteurs moléculaires impliqués dans la plasticité morphologique

Les mécanismes responsables de la plasticité morphologique du SHNH restent encore très mal connus. Néanmoins, les facteurs moléculaires impliqués dans la plasticité morphologique ont suscités l'intérêt de nombreux travaux, en particulier, des études *in vitro*, sur les pituicytes en culture et sur des NH isolées. Ces facteurs sont regroupés en deux groupes selon leur origine: les facteurs extrinsèques et intrinsèques :

- Les neurotransmetteurs (facteurs extrinsèques)

Des neurotransmetteurs, comme les catécholamines, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline, présents dans les terminaisons nerveuses de la NH ainsi que leurs récepteurs spécifiques sur les pituicytes, sont capables d'influencer la neurosécrétion, notamment par leur action sur la plasticité morphologique du SHNH. En effet, des agonistes β 2-adrénergiques, sont capables d'induire des changements structuraux au niveau des pituicytes de rat en culture. Ces cellules prennent alors, une forme étoilée (stellation), caractérisée par la rétraction du cytoplasme (Bicknell *et al.*, 1989). De plus, des NH traitées aux agonistes β 2-adrénergiques présentent le même phénomène de rétraction gliale, que celui décrit au niveau des NH provenant des rats déshydratés ou de rates allaitantes (Luckman and Bicknell, 1990). Ainsi, l'adrénaline circulante pourrait entrer par les capillaires fenêtrés et y agir directement (Hussy, 2002). Les récepteurs β 2-adrénergiques pourraient également être activés par les fibres noradrénergiques, innervant la NH (Garten *et al.*, 1989).

Dans les NSO, les récepteurs β 2-adrénergiques existent aussi. Ils sont fortement exprimés au niveau des astrocytes et sont activés suite à une déshydratation, ce qui laisse suggérer qu'ils seraient impliqués dans la plasticité des astrocytes dans les noyaux hypothalamiques (Lafarga *et al.*, 1992).

- Les neuropeptides et autres facteurs intrinsèques:

Un processus de contrôle local de régulation de la sécrétion des neuropeptides, au niveau de la neurohypophyse a été proposé par Hussy (2002) et est conforté grâce aux travaux de Rosso et collaborateurs (2004). Dans ce nouveau concept a été établi le rôle majeur du pituicyte dans le contrôle de la neurosécrétion, par la sécrétion de la taurine (glio-transmetteur). De plus, des résultats complémentaires laissent suggérer un autre niveau de contrôle local, celui de la sécrétion de la taurine induite ou renforcée par l'AVP. Ce qui laisse croire à l'existence d'une boucle de régulation physiologique importante impliquée dans le contrôle de la neurosécrétion (Rosso *et al.*, 2004).

Ainsi l'AVP est probablement aussi l'OT peuvent induire spécifiquement le pituicyte, pour libérer la taurine, via les récepteurs V1a et dont l'activation augmente la concentration intracellulaire du calcium dans le pituicyte (Hatton, 1992). Selon Rosso et ses collaborateurs (2004), ce mécanisme pourrait être extrapolé pour expliquer pourquoi l'AVP et l'OT sont libérées, par les dilatations des axones de la neurohypophyse. (Morris *et al.*, 1998; Nordmann *et al.*, 1988).

La libération de ces deux hormones, peut induire, localement, la sécrétion de la taurine par le pituicyte et engendrer un mécanisme de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de ces hormones, afin de stopper la sécrétion et éviter l'appauvrissement des granules en stock. Ce mécanisme serait propre à la neurohypophyse et ne semble pas fonctionner dans les NSO. Très récemment, Rosso et Mienville (2009) ont proposé un modèle théorique de la modulation de la neurosécrétion dans la neurohypophyse, par le pituicyte dans le cadre de l'homéostasie hydrominérale. Les récepteurs V1a au niveau des pituicytes semblent jouer un rôle important dans le contrôle et la modulation de la sécrétion dans la neurohypophyse. Ce contrôle peut s'exercer à deux niveaux: sur la plasticité morphologique et sur la sécrétion de la taurine. Ainsi, en condition d'activation du SHNH par une stimulation hypertonique (déshydratation), les terminaisons des neurones magnocellulaires sont activées pour libérer l'AVP alors que la sécrétion de la taurine par les pituicytes est inhibée. L'AVP libérée peut agir localement, sur les récepteurs V1a des pituicytes et engendrer un feed-back négatif après son effet inducteur sur la sécrétion de la taurine. Par ailleurs, l'AVP, via toujours son récepteur V1a, s'oppose à la rétraction des pituicytes de la surface des capillaires sanguins et renforce l'effet négatif sur la libération de l'AVP (Rosso and Mienville, 2009).

L'OT semble jouer un rôle inducteur des remaniements neurogliaux et synaptiques, dans les NSO. En effet, l'administration centrale de l'OT chez des rates non allaitantes induit dans les NSO une diminution de la couverture gliale et un remodelage synaptique, semblables à ceux produits au cours de la déshydratation ou de la lactation (Théodosis *et al.*, 1986; Montagnese *et al.*, 1990).

L'Adénosine et l'ATP, co-sécrétés avec l'AVP et l'OT, participent dans le changement morphologique (stellation) des pituicytes *in vitro* et exercent ainsi, un rôle dans la modulation de la neurosécrétion (Thirion *et al.*, 1999). L'adénosine exerce un effet inverse à celui de l'AVP sur la modulation de la neurosécrétion. En effet, elle exercerait deux effets sur le pituicyte, le premier est basé sur l'activation des récepteurs A2b, qui entraîne une diminution de la sécrétion de la taurine par le pituicyte et qui se traduit par un feed back positif sur la

sécrétion de l'AVP et de l'adénosine. A l'inverse, l'adénosine active, via les récepteurs A1, la rétraction des pituicytes et favorise ainsi la libération de l'AVP par les terminaisons nerveuses (Rosso and Mienville, 2009).

L'OT semble jouer un rôle inducteur des remaniements neuro-gliaux et synaptiques, dans les NSO. En effet, l'administration centrale de l'OT chez des rates non allaitantes induit dans les NSO une diminution de la couverture gliale et un remodelage synaptique, semblables à ceux produits au cours de la déshydratation ou de la lactation (Théodosis *et al.*, 1986; Montagnese *et al.*, 1990).

L'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la plasticité structurale, a été mise en évidence sur des cultures de pituicytes (Ramsell and Cobbett, 1996). De plus, l'inhibition de la NO synthase, diminue les changements structuraux induits *in vivo*, suite à une stimulation hypertonique (Beagley and Cobbett, 1997).

Bien que les processus d'intégration de ces informations et leurs impacts sur les cellules ne soient toujours pas élucidés, néanmoins, selon certains auteurs, un des effets concerne la mobilisation et le stockage du calcium, dans les pituicytes. En effet, la fixation de l'AVP sur le récepteur V1, induit une augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire (Hatton, 1992).

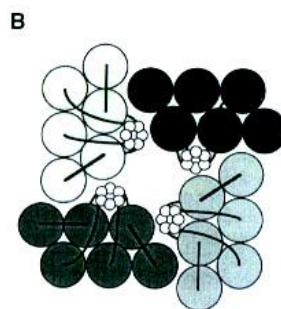
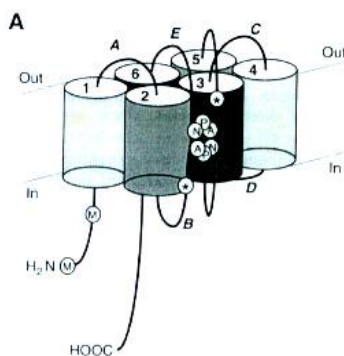
III-LA FAMILLE DES AQUAPORINES

1-Découverte

Une des questions fondamentales de la biologie était de savoir comment l'eau passe à travers les membranes cellulaires. De grandes quantités d'eau diffusent à travers la bicouche lipidique des membranes cellulaires, mais le flux par cette voie est lent et non soumis à des régulations. L'existence de pores à eau a été suspectée depuis longtemps dans la membrane des globules rouges, car la perméabilité de ces cellules est supérieure à celle d'une simple bicouche lipidique de surface équivalente. Une famille de canaux à eau, appelée aquaporines (AQP) a été mise en évidence. Le premier membre de cette famille, appelé aquaporine-1 (AQP-1) a été identifié en 1992 par Agre et ses collaborateurs (Preston and Agre, 1991; Preston *et al.*, 1992). Ainsi, l'AQP-1 a été mise en évidence et clonée à partir des globules rouges. Plusieurs autres protéines de la même famille ont été, par la suite, identifiées. A l'heure actuelle, près de 200 membres ont été découverts, aussi bien dans le règne animal que végétal. Chez les mammifères, 13 membres de cette famille ont été répertoriés à ce jour (AQP-0 à AQP-12, Verkman, 2005). Ils sont subdivisés en deux groupes, en fonction de leurs perméabilités (Yasui, 2004; Agre *et al.*, 2002; Verkman and Mitra, 2000):

- (1) les aquaporines strictes, ne laissant passer sélectivement, que les molécules d'eau (AQP-1, -2, -4, -5, -6 et -8). Les coefficients de perméabilité varient en fonction du sous type.
l'AQP-4, par exemple, a une perméabilité beaucoup plus grande que l'AQP-1.
- Les aquaglycéroporines (AQP-3, -7, -9 et -10) est perméable à l'eau mais aussi au glycérol et à l'urée. D'autres, comme l'AQP-9 sont également, perméables au lactate (Badaut *et al.*, 2001, Badaut *et al.*, 2002).

2-Structure moléculaire des AQP: (Figure 12)



La configuration de l'AQP-1 est commune à toute la famille des aquaporines. Les AQP sont souvent assemblées en tétramère dans la bicouche de la membrane plasmique (Verbavatz *et al.*, 1993, Jung *et al.*, 1994).

Figure 12: Structure moléculaire des aquaporines (AQP)

A- La forme monomérique: organisation des six chaînes en hélice α et de leur domaine NPA, transmembranaires.

B- La forme complexe en tétramère et organisation du canal aqueux central (Jung *et al.*, 1994)

Le poids moléculaire de la protéine est compris entre 26 kDa et 34 kDa. Chaque monomère est formé par six domaines transmembranaires organisés en deux motifs identiques, composés chacun de trois chaînes d'hélices alpha et reliés par deux boucles qui contiennent chacune une séquence de trois acides aminés, l'asparagine, la proline et l'alanine (NPA). La juxtaposition de ces motifs NPA forme le pore, à travers lequel peut s'effectuer le passage de l'eau. Les deux extrémités N et C terminales de chaque monomère se situent du côté intracellulaire.

La séquence d'acides aminés composant le canal détermine les charges ioniques et le diamètre du pore (3 à 6 Å). Le passage de l'eau à travers certaines AQP est inhibé par le mercure. La cystéine 189 dans la boucle E, proche du motif NPA, est le site responsable de cette inhibition. Ainsi, dans le cerveau l'AQP-1 et 9 sont sensibles au mercure, alors que l'AQP-4 lui est insensible, de par l'absence de cette cystéine. Pour cette raison elle est également dénommée, MIWC (pour «Mercurial Insensitive Water Channel») (Verkman et Mitra, 2000, Verkman, 2001; Badaut *et al.*, 2002, Takata *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'AQP-4 présente une organisation spatiale déterminée par un arrangement orthogonal des particules intra-membranaires, dénommées «orthogonal arrays particles, OAPs», découvertes sur la membrane plasmique des astrocytes (Landis et Reese, 1974) et des cellules musculaires squelettiques (Ellisman *et al.*, 1976). Ces particules ont été observées au microscope électronique à balayage, après cryodécapage et leur présence a été confirmée par de nombreux travaux (Verbavatz *et al.*, 1997; Rash *et al.*, 1998; Furman *et al.*, 2003). L'isoforme M23 est plus favorable à la formation des OAPs (Rash *et al.*, 2004). La signification de ce type d'organisation n'est pas claire (Verkman, 2005).

3-Les aquaporines dans le système nerveux central (SNC) (tableau 1)

Les trois principales AQP, caractérisées dans le cerveau des mammifères, sont l'AQP-1, l'AQP-4 et l'AQP-9 (Venero *et al.*, 2001; Schrier *et al.*, 2004). L'AQP-1 est principalement localisée sur les cellules épithéliales des plexus choroïdes. Elle serait importante dans la formation du liquide céphalorachidien.

La découverte récente de l'AQP-9 dans les neurones catécholinérgiques a modifié la vision du rôle des AQP dans le système nerveux, avec une implication possible de ce canal dans le métabolisme énergétique cérébral.

L'AQP-4 est la protéine prédominante dans le cerveau. Historiquement, l'AQP-4 est la première AQP détectée par hybridation *in situ* dans le parenchyme cérébral (Jung *et al.*, 1994, Hasegawa *et al.*, 1994). Elle est présente sous forme de deux isoformes, différentes au niveau de leurs extrémités N-terminales, par un décalage de leurs sites d'initiation; la méthionine en position 1 (M1) pour la première et la méthionine 23 (M23) pour la seconde (Jung *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1996). Les deux isoformes sont exprimées dans le cerveau, toutefois l'isoforme M23 est trois fois plus abondante (Neely *et al.*, 1999, 2001). Les 2 isoformes présentent malgré tout, la même perméabilité à l'eau et seraient impliquées dans les mêmes fonctions (Jung *et al.*, 1994; Neely *et al.*, 1999).

Plus récemment, trois autres types ont été décrits d'abord in vitro, sur des cultures primaires de neurones ou d'astrocytes, telles que l'AQP-3, l'AQP-5 et l'AQP-8, puis leurs ARNm ont été localisés dans le cerveau de rat (Badaut *et al.*, 2002).

Tableau 1: Distribution des AQPs dans le SNC (Chen *et al.*, 2004; Schrier *et al.*, 2004)

Types d'AQP	Nombre d'AA	Gène, locus	Distribution cellulaire	Fonction	Références
AQP-1 (CHIP 28)	269	7 p14	Plexus choroïde (cellules épithéliales)	Formation du liquide cérébro-spinal	Hasegawa <i>et al.</i> , 1993;1994; Nielsen <i>et al.</i> , 1993, 1994
AQP-3 (GLIP)	285	9p13	Ependymocytes Cellules gliales Neurones	Transport de l'eau et du glycérol	Ma <i>et al.</i> , 1994, Badaut <i>et al.</i> , 2002
AQP-4 (WIWC)	M1 : 323 M23 : 30	18q11.2 18q12.1	Cellules gliales	Contrôle de la barrière hémato-encéphalique	Yang <i>et al.</i> , 1985 Turtzo <i>et al.</i> , 1997
AQP-5	282	12q13	Astrocytes		Badaut <i>et al.</i> , 2002
AQP-8	263	16p12	Oligodendrocytes Neurones		Yamamoto <i>et al.</i> , 2001, Badaut <i>et al.</i> , 2002
AQP-9	295	15q22.1-q22.2	Astrocytes Tanicytes Neurones	Métabolisme énergétique	Badaut <i>et al.</i> , 2000, 2001, 2002 ; 2004 Nicchia <i>et al.</i> , 2001
AQP-11	271	11q13.4	Cerveau		Badaut <i>et al.</i> , 2002

Dans le système nerveux central, l'expression de ces canaux peut être perturbée, en rapport avec certaines pathologies. Ces perturbations se manifestent par la formation d'un œdème cérébral, signe d'un déséquilibre de l'homéostasie. Par conséquent, beaucoup de travaux s'intéressent à ces canaux hydriques et à leurs implications dans diverses pathologies (Vajda *et al.*, 2002 ; Saadoun *et al.*, 2003).

4-Distribution de l'AQP-4 dans les organes sensoriels et périphériques

Les différentes études sur l'expression de l'AQP-4 ont montré que leur distribution est ubiquitaire. En effet, l'AQP-4 a été localisée dans différents organes chez les mammifères (Takata *et al.*, 2004) (**Tableau 2**)

Tableau 2: Distribution de l'AQP-4 dans différents organes périphériques et sensoriels (Takata *et al.*, 2004, modifié)

Organes	Tissus	Cellules	Références	Fonctions
Rein	Tube collecteur	C. principales	Frigeri <i>et al.</i> , 1995	Concentration de l'urine
Muscles	Tissu squelettique	Fibres striées	Frigeri <i>et al.</i> , 1998	Contraction musculaire
Estomac	Epithélium gastrique	C. pariétales	Misaka <i>et al.</i> , 1996	Transfert trans-cellulaire de l'eau // la sécrétion de HCl
Voies aërifères (nasales, ...)	Epithélium cilié	Cellules ciliées	Nielsen <i>et al.</i> , 1997	Humidification de l'air et sécrétions de fluides
Oreille; Organe de Corti,-vestibule		C. support C. ciliées	Takumi <i>et al.</i> , 1998 Minami <i>et al.</i> , 2001	
Œil	Rétine	Cellules de Müller	Nagelhus <i>et al.</i> , 1998, 1999	Effet tampon du potassium

5-Distribution cellulaire et subcellulaire de l'AQP-4 dans le système nerveux central

Historiquement, l'AQP-4 est la première AQP détectée par hybridation *in situ* (HIS) dans le parenchyme cérébral (Jung *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1994). Plus tard, la production d'anticorps plus spécifiques, a permis d'observer une forte concentration de l'AQP-4 dans différents structures cérébrales (Frigeri *et al.*, 1995 ; Nielsen *et al.*, 1997; Nagelhus *et al.*, 1998 ; Badaut *et al.*, 2000).

Ces derniers travaux ont permis de montrer que l'expression de l'AQP-4 est principalement au niveau des astrocytes et des ependymocytes, alors que les neurones n'expriment pas cette protéine. Cependant, ces résultats sont en contradiction, avec ceux de l'HIS qui ont révélé la présence de l'ARNm de l'AQP-4 au niveau des neurones (Jung *et al.*, 1994; Venero *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002). Ces auteurs expliquent cette différence, par le fait que les neurones n'expriment qu'en faible concentration la protéine, ce qui ne permet pas de la détecter par immunohistochimie.

Par ailleurs, L'AQP-4 est aussi présente dans les cellules endothéliales mais son niveau d'expression reste relativement faible, comparé à celui observé dans les astrocytes (Nielsen *et al.*, 1997; Nagelhus *et al.*, 1998; Frigeri *et al.*, 2001; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

L'utilisation des particules d'or pour l'identification du marquage de l'AQP-4, au microscope électronique, a permis d'apporter plus de précisions sur la distribution de l'AQP-4. Ainsi, il a été montré une forte expression de l'AQP-4 au niveau des «pieds» astrocytaires, en contact avec la lame basale des capillaires sanguins et celle recouvrant la membrane piale. Cette distribution a permis de montrer une polarité dans l'expression de l'AQP-4 (Nielsen *et al.*, 1997; Frigeri *et al.*, 2000; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004) (**figure 13**). Après cryofracture en microscopie électronique, l'AQP4 péri-vasculaire présente aussi, une organisation géométrique, les OAPs (orthogonal arrays particles) (Rash *et al.*, 1998).

De plus, d'autre travaux ont montré que la présence des cellules endothéliales est indispensable pour cette polarisation (Nicchia *et al.*, 2004).

La polarisation de l'AQP4 sur les pieds astrocytaires se fait au moyen d'un ancrage de cette protéine par un domaine PDZ sur l' α -syntrophine (α -syn) ou la dystrophine (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004). En effet, la polarisation de l'AQP-4 autour des vaisseaux disparaît dans les cerveaux de souris présentant une délétion du gène de l' α -syn (souris α -syn^{-/-}) ou de la dystrophine (souris *mdx*).

Par ailleurs, des molécules de la matrice extracellulaire et de la lame basale, comme la laminine et l'agrine, seraient impliquées dans la polarisation et l'ancrage des AQP-4, dans ces domaines de la membrane (Guadagno et Moukhles, 2004).

Dans les NSO et les NPV, l'expression de l'AQP-4 présente une distribution différente, caractérisée par l'absence de polarité. En effet, elle est localisée au niveau des prolongements astrocytaires, y compris ceux qui se trouvent en dehors

de l'espace vasculaire. Par ailleurs, l'AQP-4 se trouve souvent largement exprimée au niveau des prolongements astrocytaires, regroupés et organisés en lame gliale, comme la LGV. Cependant, l'AQP-4 est signalée absente au niveau des prolongements gliaux qui sont en contact avec les dendrites des neurones magnocellulaires (Nielsen *et al.*, 1997, Frigeri *et al.*, 2001).

Cette disposition particulière de l'AQP4, a permis de suggérer son implication dans des fonctions spécifiques, relatives au processus d'osmoréception.

A la lumière de tous ces résultats, il a été proposé une classification des astrocytes en trois groupes:

- le premier groupe majoritaire, représente les astrocytes qui présentent une polarité d'expression de l'AQP-4 («pieds» péri-vasculaires et sub-piaux), dont la distribution est α -syntrophine dépendante.
- Le second groupe, représente les astrocytes qui expriment l'AQP-4, à la fois au niveau «des pieds péri-vasculaire» et sur l'ensemble des prolongements de ces cellules (prolongements des lames gliales). L'expression de l'AQP-4, au niveau des prolongements non péri-vasculaire (non-endfeet) est différente de celle des «pieds», car elle est indépendante de l' α -syntrophine.
- Le dernier groupe, représente les astrocytes des organes osmosensibles, qui ne présente aucune polarité d'expression de l'AQP-4 (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

Outre les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), l'AQP-4 est aussi présente au niveau de l'éminence médiane (Frigeri *et al.*, 1995 a et b; Badaut *et al.*, 2001; 2002). Son expression est controversée. En effet, cette AQP est exprimée dans les astrocytes et les épendymocytes bordant le troisième ventricule, au niveau de la couche interne ou ventrale de l'EM (Frigeri *et al.*, 1995a et b), alors que seuls les cellules épendymaires sont marqués mais pas les astrocytes (Badaut *et al.*, 2001; 2002).

Les AQPs sont, en général, localisées sur la membrane plasmique des cellules mais elles sont plus rarement décrites dans celle des organites intracellulaires. Des travaux récents ont rapporté l'expression de l'AQP-9 au niveau des mitochondries dans les astrocytes et les neurones (Badaut *et al.*, 2004; Lindland *et al.*, 2004) et celle de l'AQP-1 dans la membrane des granules de sécrétion, à cœur dense, présents dans le lobe nerveux, intermédiaire et antérieur de l'hypophyse de bovins (Arnaoutova *et al.*, 2008). Ces derniers suggèrent que l'AQP-1 serait importante dans les processus de sécrétion et de biogenèse de ces granules. Ainsi, ce canal serait nécessaire à la sortie de l'eau (efflux) des granules, durant le processus de maturation et de son entrée (influx) et de la dilatation des vésicules qui en résulte, durant l'exocytose. De même, l'AQP-1 et l'AQP-6 s'expriment dans les vésicules synaptiques des neurones et participent aussi dans la dilatation de ces vésicules pendant leur exocytose (Jeremic *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'AQP-4 a, elle aussi, été détectée récemment dans la membrane des granules à sécrétion régulée, du pancréas exocrine (Cho *et al.*, 2002) et de la glande parotide (salivaire) (Matsuki *et al.*, 2005). (**tableau 3**)

Tableau 3: Distribution cellulaire et sucellulaire de l'AQP-4 dans le SNC

Zone cérébrale	Cellules marquées à l'AQP4	Localisation membranaire	Références
Système ventriculaire (aqueduc)	Ependymocytes	Membrane baso-latérale	Frigeri <i>et al.</i> , 1995, 2001 Nielsen <i>et al.</i> , 1997 Amiry-Moghaddam <i>et al.</i> , 2004 Badaut <i>et al.</i> , 2000, 2002
Cortex cérébral	Astrocytes	Pieds périvasculaires	Jung <i>et al.</i> , 1994 Amiry-Moghaddam <i>et al.</i> , 2004 Badaut <i>et al.</i> , 2000, 2002
Cervelet	Cellules Purkinje Astrocytes	Membranes neuronales Pieds périvasculaires	Nielsen <i>et al.</i> , 1997 Rash <i>et al.</i> , 1998 Amiry-Moghaddam <i>et al.</i> , 2004
hippocampe	Astrocytes Pieds périvasculaires		Rash <i>et al.</i> , 1998 Badaut <i>et al.</i> , 2002
Moelle épinière	Astrocytes Pieds périvasculaires		Frigeri <i>et al.</i> , 1995 Nielsen <i>et al.</i> , 1997 Rash <i>et al.</i> , 1998
Corps calleux	Astrocytes	Prolongements astrocytaires	Badaut <i>et al.</i> , 2000, 2002
Noyaux habénulaire	Astrocytes	Prolongements astrocytaires	Badaut <i>et al.</i> , 2002
Organe circum ventriculaire	Ependymocytes		Frigeri <i>et al.</i> , 2001 Nicchia <i>et al.</i> , 2001
Organe sous fornical	Ependymocytes Astrocytes Cellules endothéliales Neurones		Nielsen <i>et al.</i> , 1997 Nagelhus <i>et al.</i> , 1998, 2004 Venero <i>et al.</i> , 1999, 2001
Noyau suprachiasmatique	Neurone Astrocytes	Pieds périvasculaires	Venero <i>et al.</i> , 1999, 2001 Badaut <i>et al.</i> , 2002

6- Rôles physiologiques de l'AQP-4

La caractérisation de l'expression de l'AQP-4, dans le cerveau de mammifères, a conduit à de très nombreuses hypothèses sur leurs rôles physiologiques:

- (i) La polarisation de l'expression de l'AQP-4 au niveau des pieds astrocytaires, en contact avec l'endothélium des capillaires, dans la plus part des astrocytes du système nerveux, tel que rapporté par les données de la littérature (tableau 2), suggère que cette AQP serait impliquée dans le contrôle de la barrière hémato encéphalique, dans son développement et son intégrité (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004; Nicchia *et al.*, 2004).
- (ii) L'AQP-4 est exprimée sur la membrane baso-latérale des cellules épendymaires, bordant les ventricules et participerait dans l'absorption du

liquide céphalo-rachidien, alors que l'expression de l'AQP-1, au niveau apical, serait responsable de la sécrétion de ce liquide (Nielsen *et al.*, 1997; Badaut *et al.*, 2000; Nagelhus *et al.*, 2004).

- (iii) Des études récentes *in vitro* ont montré que des mouvements d'eau à travers l'AQP-4 accompagnaient les flux de potassium dans les astrocytes pendant une activité neuronale (Niermann *et al.*, 2001; Nagelhus *et al.*, 2004).
- (iv) Les souris α -syn^{-/-}, sont caractérisées par une absence d'AQP-4 sur les pieds astrocytaires péri-vasculaires. Elles présentent une perturbation de l'homéostasie du potassium et de l'eau (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).
- (v) Dans certaines régions du cerveau, telles que la région antéro-ventrale du troisième ventricule et les NPV hypothalamiques, il a été établi une corrélation topographique, au niveau neuronal, entre l'expression de l'AQP-4 et l'ANP (natriurétique peptide). Ceci laisse suggérer une implication de l'AQP-4 dans l'homéostasie hydrominérale de l'organisme (Venero *et al.*, 1999).
- (vi) Au niveau des organes osmo-sensibles (NSO, NPV), l'expression de l'AQP-4 sur l'ensemble de l'astrocyte (corps cellulaire et prolongements inclus), suggère l'implication de ces canaux dans la détection des variations de l'osmolarité plasmatique et la transduction de ce signal vers les neurones osmosensibles (Badaut *et al.*, 2000 ; Venero *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1997). Ainsi, l'AQP-4 jouerait un rôle clé dans l'osmo-réception centrale comme cela est suggéré par de nombreux auteurs (Nielsen *et al.*, 1997; Wells, 1998; Badaut *et al.*, 2000) (**Figure 14**)
- (vii) Les travaux de Nicchia et collaborateurs (2000; 2003) ont démontré, sur des astrocytes en culture, que l'AQP-4 est impliquée dans le changement de volume de ces cellules. La régulation du volume cellulaire est sous le contrôle de molécule osmo-sensibles, comme la taurine qui est libérée par les astrocytes (voir plus haut). La sécrétion de la taurine, s'accompagne de mouvements d'eau à travers les astrocytes; Mouvements qui feraient intervenir les AQP4.
- (viii) Niermann *et al.*, (2001), suggèrent que la vasopressine peut moduler le flux d'eau au niveau du cerveau par l'intermédiaire de l'AQP-4. En effet, il est bien établi que l'AVP via les récepteurs V2, régule l'expression et la translocation de l'AQP-2 dans les cellules principales du tube collecteur rénal, ce qui permet de contrôler la réabsorption de l'eau et de maintenir l'homéostasie. Par conséquent, ces auteurs suggèrent que l'AVP endogène, agirait de manière similaire sur les récepteurs V1 du cerveau.
- (ix) Ainsi, l'AVP et les récepteurs V1 auraient un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie hydrominérale, probablement en modulant l'expression de l'AQP-4 au niveau des astrocytes (Sarfaraz and Fraser, 1999; Niermann *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2005).

Ainsi, la transmission de l'information (variation de la pression osmotique) serait transmise de manière indirecte, aux neurones, par l'intermédiaire de l'AQP-4, présente au niveau des astrocytes.

Cela serait également possible au niveau de l'éminence médiane où l'AQP-4 est présente au niveau des astrocytes qui sont au contact des axones des neurones magnocellulaires (Wells, 1998).

L'ensemble de ces travaux sont d'accord sur l'implication de l'AQP-4 dans l'homéostasie du milieu extracellulaire, en réponse à la composition du milieu modifiée en rapport avec l'activité neuronale.

7-Mécanismes de régulation des aquaporines dans le SNC

Les premières études sur la régulation des AQPs ont été réalisées sur l'AQP-2 du tube collecteur du rein. En effet, l'AQP-2 joue un rôle important dans le mécanisme de concentration de l'urine. Il a été montré que cette AQP est sensible à la vasopressine ou AVP-dépendante (Nielsen *et al.*, 1993; 1995; Agre, 2000). En effet, en réponse à une stimulation osmotique, l'AVP est libérée par le lobe nerveux de l'hypophyse. Elle induit une réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur du rein qui se traduit par la production d'une urine concentrée. Cette augmentation de la perméabilité à l'eau est essentiellement due à la translocation des canaux à eau, AQP-2 des vésicules intracellulaires, en stock dans le cytoplasme, vers la membrane apicale des cellules principales du tube collecteur. Ce trafic vésiculaire a pour conséquence, la concentration de l'AQP-2 sur cette face. Cette induction résulte d'une cascade de réactions, déclenchée par la liaison de l'AVP sur son site récepteur, type V2, localisé sur la membrane basale de la cellule principale, du tube collecteur (**Figure 15**).

En plus de l'augmentation intracellulaire de l'AMPc, de l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de la phosphorylation de l'AQP-2, cette liaison induit une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Ainsi, le Ca²⁺ est indispensable au processus d'exocytose de l'AQP-2 et à son insertion à la membrane apicale du tube collecteur du rein (Fenton and Moeller, 2008).

Les mécanismes de régulation des différentes AQP dans le cerveau n'ont pas encore été élucidés. Toutefois la régulation de l'AQP-2 a été étudiée dans différents modèles comme l'ovocyte et le rein. Dans ces derniers, le niveau d'expression de l'AQP-1 augmente lorsque la voie de phosphorylation de la protéine kinase A (PKA) est activée via la vasopressine [par l'intermédiaire du récepteur V2 ou l'AMPc (Gunnarson *et al.*, 2004)]. Par ailleurs, un choc hyperosmotique sur des cultures d'astrocytes stimule la voie de la p38 MAP-(mitogen-associated protein)-kinase et induit une augmentation de l'expression des AQP-4 et AQP-9.

Le niveau d'expression de l'AQP-4 peut être aussi régulé positivement par la vasopressine via les récepteurs V1a. Au contraire, la stimulation de la voie de la caséine kinaseII (CKII) va permettre la phosphorylation de l'AQP-4 et l'internalisation des canaux,

diminuant leur nombre à la surface des cellules. Par conséquent, la perméabilité à l'eau des cellules va être diminuée.

De même, la perméabilité à l'eau de l'AQP-4 est diminuée par l'application de la dopamine ou par stimulation de la voie de phosphorylation de la protéine kinase C (PKC). La sensibilité au pH de certaines AQP est conférée par des histidines dans les boucles externes A ou C (Fig.15A) (Nemeth-Cahalan *et al.*, 2004). En particulier, l'histidine en position 129 de la boucle C confère à l'AQP-4 la sensibilité au pH. La perméabilité à l'eau est augmentée d'un facteur 1,9 quand le pH devient alcalin. Pendant une activité neuronale, le pH intracellulaire des astrocytes présente une alcalinisation transitoire, ce qui aurait pour conséquence, d'augmenter la perméabilité à l'eau du canal AQP-4. Le flux d'eau, ainsi généré accompagnerait la recapture du potassium extracellulaire par les astrocytes (Gunnarson *et al.*, 2004).

IV- INTERACTION DE L'AQP-4 AVEC LE COMPLEXE DES DYSTROPHINES

La famille des dystrophines et le complexe des protéines qui lui sont associées (DAPC) semblent jouer un rôle important dans la distribution de l'AQP-4.

Les dystrophines et les composants du DAPC constituent un échafaudage qui lie le cytosquelette sous membranaire du cytoplasme cortical, en particulier l'actine, aux composants de la matrice extracellulaire.

Dans le cerveau, Le gène de la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), s'exprime en une dystrophine de grande taille de 427 kDa (Dp427), et d'autres de courtes tailles, en l'occurrence la Dp140, la Dp116 et la Dp71. Toutefois, la Dp71 est la plus répandue dans ce tissu (Ledreffein *et al.*, 1992, jung *et al.*, 1993; Austin *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2004).

D'autres protéines présentent des homologies de structure plus ou moins grandes avec les dystrophines. Elles sont réparties en deux groupes: les utrophines et les dystrobrevines. Ces molécules peuvent s'exprimer, en même temps que les dystrophines, dans le cerveau (Khurana *et al.*, 1990; Robetz *et al.*, 1996, Peters *et al.*, 1998).

Dans le cerveau, l'utrophine est abondante surtout, dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Knuesel *et al.*, 2000), dans les expansions des cellules astrogliales, entourant les vaisseaux sanguins, «endfeet» (Khurana *et al.*, 1992; Janscik *et al.*, 1999) et dans la membrane post-synaptique de certains neurones corticaux (Kamakura *et al.*, 1994). Dans certaines conditions, ces protéines pourraient jouer, occasionnellement, un rôle de substitut des dystrophines.

Parmi les protéines constituant le DAPC, on retrouve les dystroglycanes (α -DG et β -DG), les sarcoglycanes et les syntrophines (α 1-Syn, β 1- β 2-Syn, γ 1- et γ 2-Syn), (Chamberlain, 1999).

L' α -DG est localisé du côté extracellulaire de la membrane plasmique alors que le β -DG est transmembranaire. Ainsi, l' α -DG lierait la dystrophine et son complexe, via la β -DG, aux composants de la matrice extracellulaire (laminine, agrine...). Cette liaison jouerait un rôle important dans l'agrégation des canaux hydriques, de type AQP-4, dans l'environnement péri-vasculaire (Guadagno and Moukhles, 2004; Warth *et al.*, 2004).

Au stade adulte, la Dp71, l'isoforme la plus exprimée dans le cerveau, est exprimée abondamment dans le gyrus denté de l'hippocampe (Gorecki *et al.*, 1997; Cisneros, 2006), la rétine (Claudepierre *et al.*, 2000; Dalloz *et al.*, 2003), le plexus choroïde (Haenggi *et al.*, 2004), le système olfactif (Takatoth *et al.*, 2008), le cortex cérébral (Gorecki *et al.*, 1997), dans les noyaux de l'hypothalamus antérieur ainsi que dans la neurohypophyse de rat (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998) et de souris (Benabdesselam *et al.*, 2010).

A l'échelle cellulaire, la Dp71 s'exprime au niveau des astrocytes. La Dp427 montre plutôt, une expression au niveau des neurones alors que l'utrophine, quant à elle, se localise au niveau des cellules endothéliales (Khurana *et al.*, 1992; Knuesel *et al.*, 2000; Haenggi *et al.*, 2004; Haenggi and Fritschy, 2006; Wolburg *et al.*, 2009).

Dans les noyaux hypothalamiques, supraoptiques et paraventriculaires, comme dans la neurohypophyse, les dystrophines, la Dp140, 427 et en plus grande proportion, la Dp71 sont présentes dans les neurones magnocellulaires, principalement dans les terminaisons (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998). Les Dp 140 et Dp71 sont pareillement à ce qui a été rapporté dans d'autres régions du cerveau (Schofield *et al.*, 1994; Loufrani *et al.*, 2001), retrouvées dans les astrocytes et les cellules endothéliales (Benabdesselam *et al.*, 2010). Par ailleurs, les utrophines, le β -DG et de l' α 1-Syn sont aussi présentes dans la membrane des prolongements astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins et celle des cellules endothéliales (Benabdesselam *et al.*, 2010).

Ainsi, la distribution des dystrophines dans ces structures osmosensibles (NSO et NPV) permet de suggérer l'implication de ces protéines, dans la fonction d'osmoreception. Chez le rat, Dorbani –Mamine et collaborateurs (1998) ont montré, pour la première fois, la distribution des dystrophines et du β -dystroglycane dans les granules de sécrétion, ces protéines ainsi que les utrophines, dans les synaptosomes et les pituicytes, isolés de la neurohypophyse. Ces protéines sont aussi retrouvées dans l'éminence médiane et dans les noyaux supraoptiques de l'hypothalamus.

Ainsi, la Dp427 et l'utrophine400 sont associées à la membrane plasmique des terminaisons ou des dilatations subterminales des neurones et à la membrane des pituicytes dans la neurohypophyse La Dp71, Dp116 et Dp140 sont associées à la membrane des granules en stock. Cette particularité dans la distribution des dystrophines, serait en faveur d'un rôle dans le stockage des granules et dans la relation dynamique qui existe entre, d'une part, les neurones et les cellules gliales et d'autre part, entre l'intérieur de la cellule et la matrice extracellulaire, d'autre part (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998).

D'autres travaux, plus récents (Pocsai *et al.*, 2010) ont montré que dans la neurohypophyse de rat, l'utrophine est exprimée dans les vaisseaux sanguins, comme dans les autres régions du cerveau (Haenggi *et al.*, 2004; Haenggi and Fritschy, 2006) alors que la dystrophine et le β -dystroglycane sont plutôt, localisés autour de groupements de cellules. De plus, la β 2-dystrobrevine représente l'isoforme exprimée dans la neurohypophyse (Gorecki *et al.*, 1997), alors que l' α 1-dystrobrevine et l' α 1-syntrophine y sont absentes. A l'inverse, dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse, ces deux dernières protéines sont fortement exprimées. L'absence de l' α 1-syntrophine et de l' α 1-dystrobrevine dans la neurohypophyse, est corrélée à la distribution spécifique de l'AQP-4, différente de celle observée dans les autres régions du cerveau (Pocsai *et al.*, 2010).

Ces résultats suggèrent, dans la neurohypophyse, l'existence de plusieurs complexes de protéines liés soit à la dystrophine, l'utrophine ou à la dystrobrevine. Tous ces complexes

seraient indépendants de l' α 1-syntrophine et localisés à différents endroits de la neurohypophyse (Pocsai *et al.*, 2010).

Dans le cerveau plusieurs membres du complexe des protéines associées aux dystrophines ou à leurs protéines homologues (DAPC) sont présents dans les neurones et les cellules gliales (Blake *et al.*, 1999; Knuesel *et al.*, 2000; Zaccaria *et al.*, 2001).

La composition du DAPC varie d'un type cellulaire à un autre. En effet, Culligan et Ohlendieck (2002), proposent trois complexes hypothétiques qui varient selon le type cellulaire en question, à savoir le neurone, la cellule gliale ou endothéliale. Ainsi, dans les neurones, la Dp427 est associée à trois principales composantes du DAPC; les dystroglycanes (α -DG et β -DG), syntrophines (α 1-Syn et γ 1-Syn) et la dystrobrevine (β -DB). Par ailleurs, il a été démontré que l'absence de la Dp427 est accompagnée de l'altération de l'agrégation synaptique des récepteurs GABA (Knuesel *et al.*, 1999).

De plus, l' α -DG serait liée du côté extracellulaire à la neurexine de la MEC, ce qui laisse suggérer un nouveau rôle comme molécule d'adhésion dans les neurones (Sugita *et al.*, 2001).

Dans les cellules gliales la Dp71 serait liée aux dystroglycanes (α -DG et β -DG), aux syntrophines (γ 2-Syn et β 2-Syn) et à l' α -DB. Dans ce cas, l' α -DG se lierait à l'agriline ou à d'autres composants de la MEC.

Le DAPC endothélial ressemblerait à celui de la cellule gliale, par sa composition en dystroglycanes et syntrophines. Dans cette cellule, le β -DB remplacerait l' α -DB, comparé à la cellule gliale. De plus, l' α -DG se lierait par l' α 2-laminine aux autres composants de la MEC. D'autres travaux se sont intéressés plus particulièrement, à la distribution des dystrophines et des DAPC dans l'environnement vasculaire du cerveau. En effet, plusieurs travaux ont relevé une expression importante des DAPC, au niveau des cellules endothéliales et des pieds astrocytaires qui les entourent. De part leur localisation, des rôles leur ont été suggérés notamment dans l'homéostasie de l'eau et des ions, dans le contrôle de la barrière hémato-encéphalique et dans la production du fluide cérébrospinal (Blake *et al.*, 1999; Knuesel *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2002; Guadagno and Moukhles, 2004; Connors *et al.*, 2004).

Par ailleurs, dans le cerveau le DAPC est essentiel pour l'intégration des canaux ioniques et aussi des canaux hydriques, les AQP. En effet, dans les cellules gliales, l' α 1-syntrophine, d'une part, permet l'interaction du canal potassique Kir-4. avec le complexe des protéines associées à la Dp71 (Connors *et al.*, 2004) et d'autre part, assure l'ancrage de l'AQP-4, à la membrane astrocytaire, en particulier au niveau des pieds péri-vasculaires des astrocytes (Neely *et al.*, 2001; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003, Nico *et al.*, 2003; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004; Warth *et al.*, 2004; 2005; Inoue *et al.*, 2008).

De plus, des études immunocytochimiques en microscopie électronique, ont montré, au niveau de ces domaines membranaires spécifiques (pieds astrocytaires), la co-expression des deux types de canaux, Kir-4 et AQP-4 (Neely *et al.*, 2004; Connors *et al.*, 2004).

Par conséquent, alors que la fonction du DAPC dans l'environnement vasculaire reste à élucider, son rôle comme système d'échafaudage, dans l'ancrage des canaux hydrique et ionique, comme l'AQP-4 et Kir-4, est néanmoins bien établi (**figure 16**).

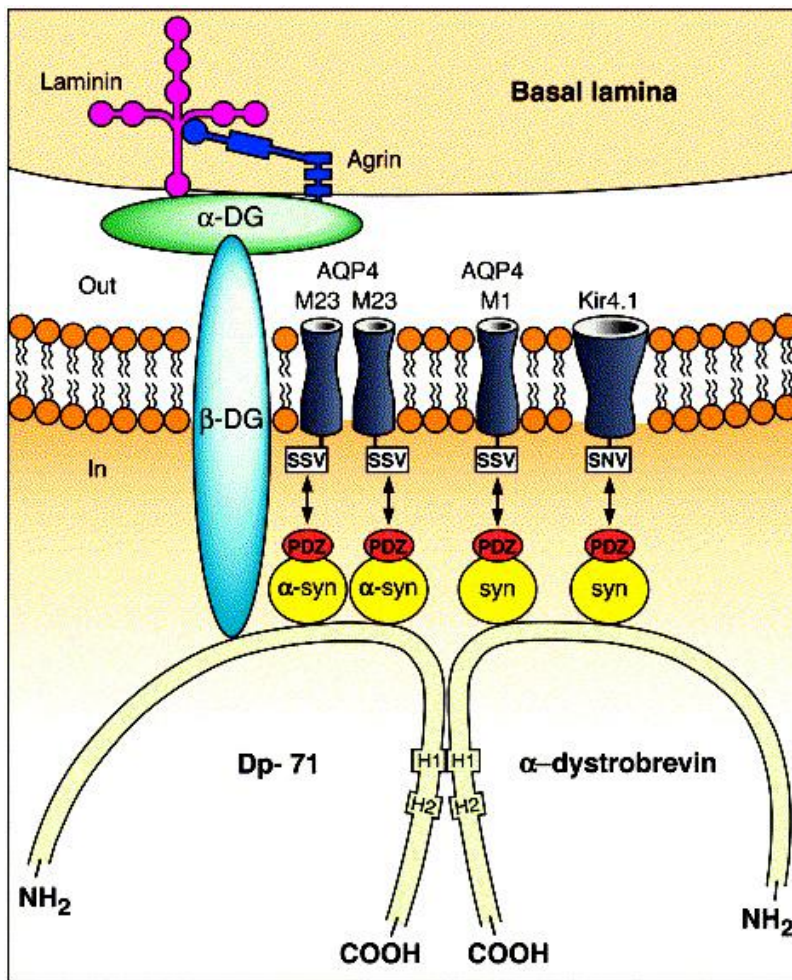


Figure 16: Représentation schématique du complexe des dystrophines et des glycoprotéines associées et de sa relation avec les canaux hydrique (AQP4) et potassique (Kir-4.1), au niveau de la cellule gliale (Amiry-Moghaddam *et al.*, 2003)

Par ailleurs, les résultats obtenus, sur la distribution de la Dp140 chez les souris déficientes en Dp71, ont montré la présence originale de la Dp140 dans les neurones magnocellulaires. L'absence de la Dp71 de l'environnement vasculaire et l'expression de la Dp140 au niveau des neurones magnocellulaires, associées au changement spectaculaire de l'aspect morphologique des expansions gliales, pourraient être à l'origine des modifications de l'intégration du signal osmotique au niveau des noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) et d'altérations de l'expression et de la sécrétion de l'AVP (Benabdesselam *et al.*, 2010).

Par conséquent, les dystrophines et en particulier la Dp71 joueraient une double fonction dans le SHNH. D'une part un rôle dans l'intégration des informations arrivant au pôle d'osmo-réception, NSO et NPV et d'autre part, un rôle dans la sécrétion des neurohormones, au niveau du pôle effecteur, la neurohypophyse.

I-Animaux et conditions d'expérimentation

Les animaux utilisés dans ce travail sont des souris appartenant à la souche C57BL6, provenant de l'animalerie de l'université Pierre et Marie-Curie de Paris VI.

Le sexe et l'âge ayant une influence importante sur le comportement dipsique et sur la réponse antidiurétique (Wang *et al.*, 1996) ; toutes les souris utilisées sont des adultes de sexe mâle, âgées de huit semaines en moyenne. Elles sont maintenues dans des conditions de température et d'humidité constantes et sont alimentées *ad-libitum*.

Elles sont réparties en deux lots :

-un lot contrôle (conditions normales) recevant de l'eau du robinet *ad-libitum*

-un lot expérimental, soumis à une stimulation osmotique par surcharge saline. Les souris de ce lot reçoivent comme seule boisson une solution de NaCl à 2%, distribuée à volonté pendant huit jours.

Les sacrifices des animaux se déroulent le matin et respectent la législation française et européenne sur les conditions d'expérimentation animale (décret 87-848).

II-Méthodes

1-Fixation par perfusion et préparation des échantillons

Les animaux préalablement anesthésiés par injection intra péritonéale de pentobarbital sodique (25mg/kg de poids corporel), sont perfusés avec une solution de lavage isotonique (NaCl à 0,9%) par voie intracardiaque, à débit constant et régulier grâce à une pompe péristaltique. Cette première perfusion sert à évacuer le sang. Elle est suivie d'une perfusion à base de liquides fixateurs. Une solution de para formaldéhyde (PF) à 4% dans un tampon phosphate sodique (phosphate buffer sodique ; PBS 0,1M ; pH 7,4) est utilisée comme fixateur pour l'immunofluorescence. Un mélange fixateur est utilisé pour l'immunoperoxydase ; il s'agit de la solution précédente à laquelle est additionné du glutaraldéhyde (0,25%) pour une meilleure conservation des édifices membranaires. Cette méthode est pratiquée pour l'étude au microscope électronique du lobe nerveux de l'hypophyse.

Après décapitation, les cerveaux et les hypophyses sont délicatement prélevés après rupture de la boîte crânienne. Ils sont post fixés par immersion pendant deux heures dans les liquides de perfusion, à 4°C.

Pour les échantillons, destinés à la congélation, une étape de cryo-protection des échantillons, succède à la post-fixation. Elle est réalisée dans une solution de saccharose à 20%, dans du PBS 0,1M, à 4°C pendant une nuit. Cette étape précède la congélation et empêche la formation de cristaux de glace.

2-Confection des coupes

2-1-Coupes au cryostat

Les coupes réalisées par cette méthode sont destinées à l'immunofluorescence.

Avant de procéder à la confection des coupes, les hypothalamus et les hypophyses sont prélevés et rapidement congelés dans l'isopentane refroidi à -35°C dans de l'azote liquide. Ils sont par la suite collés au porte-objet du cryostat à l'aide d'une colle extraforte débités en coupes frontales de $20\mu\text{m}$, à l'aide d'un cryomicrotome (cryostat, type Leica CM 300). Les coupes sont ensuite, récupérées sur des lames siliconées (superfrost) et conservées à -20°C .

2-2-Coupes au vibratome

Les coupes vibratome ne concernent que les hypophyses destinées à un marquage par immunoperoxydase. Pour cela, les hypophyses subissent au préalable, une étape d'inclusion dans l'agar-agar à 5%, dilué dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite, coupées à l'aide d'un vibratome. Les coupes réalisées ont une épaisseur de $50\mu\text{m}$. Elles sont récupérées directement dans une solution de PBS 0,1M (coupes flottantes) et se conservent quelques jours à 4°C .

3-Techniques immunohistochimiques

Le principe de cette technique est résumé par la **figure 17**

L'immunohistochimie repose sur la détection d'une protéine d'intérêt par un anticorps spécifique afin de la localiser sur une coupe de tissu ou de cellules.

La méthode de détection indirecte est basée sur l'utilisation d'abord, d'un premier anticorps (ACI : primaire) dirigé contre la protéine d'intérêt pour former un complexe antigène-anticorps puis d'un deuxième anticorps (ACII : secondaire), capable de reconnaître le complexe pré-formé.

Deux types d'ACII sont utilisés, soit des ACII couplés directement à un marqueur soit des ACII biotinylés, qui permettent une amplification du signal.

Dans ce cas, l'ACII biotinylé, sera révélé par la streptavidine ou l'avidine. La streptavidine possède quatre sites de liaison à la biotine, ce qui permet une importante amplification du signal. La révélation du complexe antigène-anticorps se fait grâce à un marqueur couplé à la streptavidine ou l'avidine.

Deux types de marqueurs existent selon la technique immunohistochimique utilisée. Des fluorochromes pour l'immunofluorescence ou une enzyme, la peroxydase de Raifort (HRP) pour la technique d'immunoperoxydase.

Une incubation préalable des coupes dans une solution A, composée de Sérum Albumine Bovine (BSA), diluée à 1% dans du PBS 0,05M, permet la saturation des sites antigéniques non spécifiques et une diminution des bruits de fond. En même temps

l'utilisation d'un détergent (triton X-100 à 0,1% dans A) permet d'augmenter la perméabilité de la membrane plasmique des cellules pour assurer une meilleure pénétration des anticorps.

L'utilisation du tampon PBS 0,05M pH 7,4, pour la dilution des AC (I et II), de la BSA et du triton, permet le maintien des coupes dans des conditions ioniques proches de celles de l'organisme.

Afin de contrôler la spécificité et la fiabilité du marquage obtenu des tests de contrôle sont effectués en absence de l'un ou l'autre des deux anticorps, habituellement utilisés; soit l'ACI soit l'ACII (test négatif).

Les détails relatifs aux anticorps utilisés sont rapportés dans le tableau 4

Tableau 4: Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

Anticorps	Animal	Dilution	Mono/Polyclonal	Source
<u>Primaires</u>				
(1) Anti-aquaporin 4 (anti-AQP4)	Lapin	1/500	Polyclonal	Chemicon
(2) Anti-GFAP	Souris	1/500	Monoclonal	Sigma
(3) Anti-AVP	Souris	1/5000	Monoclonal	Sigma
(4) Anti-OT	Souris	1/2000	Monoclonal	Chemicon
(5) Anti-CD31	Rat	1/400	Monoclonal	Biosc.Pharmingen
<u>Secondaires et fluorochromes</u>				
(1) Anti-IgG de lapin biotinylé	Chèvre	1/250		Vector Lab.
(2) Anti-IgG de souris couplé au FITC	Chèvre	1/250		Sigma
(3) Anti-IgG de rat couplé au FITC	Chèvre	1/250		SigmaBioSciences
(4) Streptavidine couplé au CY3	Mouton	1/250		Sigma

FITC: Fluoresceine- Isothiocyanate, GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein. IgG: Immunoglobuline G

3-1-Marquage par immunofluorescence

Les anticorps primaires utilisés sont dirigés soit contre notre protéine d'intérêt qui est l'aquaporine-4, c'est le principe de la technique du simple marquage, soit en association avec des marqueurs cellulaires qui sont utilisés pour suivre la distribution de cette protéine, c'est le principe du double marquage en immunohistochimie. Parmi, les marqueurs cellulaires, nous avons choisi les marqueurs des neurones magnocellulaires, grâce aux anticorps anti-AVP et anti- OT, les marqueurs de cellules gliales type astrocyte, grâce à l'anticorps dirigé contre la protéine fibrillaire acide (anti-GFAP) ou encore des marqueurs de cellules endothéliales vasculaires (anti-CD31).

Cette technique est réalisée sur des coupes cryostat conservées à -20°C. Dans les deux cas, les lames sont préalablement décongelées, à la température ambiante puis placées horizontalement, sur un support, dans des chambres humides. Les coupes sont ensuite pré-incubées dans une solution tampon afin de permettre la perméabilisation des membranes et la saturation des sites antigéniques. Elles sont ainsi, prêtes pour les étapes d'incubation immunohistochimiques.

3-1-1-Simple marquage

Pour la détection de l'AQP4, la technique immunohistochimique avec amplification du signal a été utilisée. Le premier jour, les coupes sont incubées, toute une nuit avec une solution contenant l'anticorps primaire, anti-AQP4, dilué dans la solution de PBS 0,05M, pH 7,4, BSA 1% et pré incubation, à température ambiante.

Le deuxième jour, après plusieurs rinçages successifs, de 10 min chacun, dans une solution PBS 0,05M additionnée de BSA à 0,1%, les coupes subissent une deuxième incubation d'une durée de deux heures, à température ambiante, dans une solution contenant les anticorps secondaires biotinylés. Les coupes sont à nouveau rincées par du PBS 0,05M, puis incubées dans une solution de streptavidine couplée au Cy3 (1/250 dans PBS 0,05M), à l'obscurité pendant deux heures, à Température ambiante. La streptavidine est capable de se lier aux molécules de biotine de l'ACII. Le Cy3 est un fluorochrome qui, excité par la lumière verte, émet une fluorescence dans la longueur d'onde du rouge.

3-1-2-Double marquage

Pour étudier la distribution de l'AQP4 au niveau des différentes structures, nous avons utilisé la technique du double marquage immunohistochimique.

Pour cela, les anticorps primaires utilisés sont produits chez deux espèces différentes : Lapin (polyclonal) et souris (monoclonal) ou lapin et rat. Sachant que l'anticorps anti-AQP4 utilisé dans notre protocole est un ACI anti-lapin, le deuxième ACI utilisé est alors, un ACI anti-souris.

Le premier jour, les coupes sont incubées dans une solution contenant un mélange des deux ACI, l'ACI anti-AQP4 plus un ACI correspondant à chacun des marqueurs cellulaires précédemment signalés, anti-AVP, anti-OT, anti-GFAP et anti-CD31. La solution de dilution des anticorps primaires et le temps d'incubation sont les mêmes que pour le simple marquage.

Le deuxième jour, les coupes sont rincées comme précédemment et incubées, d'abord dans une solution contenant l'ACII biotinylé puis dans un mélange contenant les ACII anti-IgG de souris couplé à la fluorosceine isothiocyanate (FITC) et la streptavidine-Cy3 qui se combine à l'anticorps biotinylé utilisé pour amplifier le marquage de l'AQP4.

Le FITC est excité par la lumière bleue et émet une fluorescence de couleur verte. Ainsi, sur nos images, l'AQP4 est toujours visualisée en rouge, par le CY3 et les différents marqueurs des cellules en vert, par le FITC.

Enfin, dans les deux méthodes, simple et double marquages, les coupes encore humides après rinçage dans du PBS 0,05M, sont tout de suite montées entre lame et lamelle utilisant un milieu de montage aqueux (mowiol) puis conservées à 4°C, dans l'obscurité, afin de préserver la fluorescence.

Les coupes sont alors observées au microscope confocal (à balayage laser) ou à fluorescence (Zeiss Axioscop 2 plus). Dans ce dernier cas, les images sont capturées avec une caméra (Zeiss AxioCam HRc digital camera and axiovision 4.1 software).

Les images de fluorescence rouge et celles de fluorescence verte sont superposées à l'aide d'un logiciel (image J).

3-2-Marquage par immunoperoxydase

Cette technique est pratiquée sur des coupes épaisses d'hypophyse, réalisées au vibratome (coupes flottantes) et destinées à l'examen de la distribution de l'aquaporine-4, au microscope électronique.

Le premier jour, les coupes préalablement imprégnées dans du PBS 0,05M sont incubées d'abord, dans un mélange H₂O₂-méthanol (0,06%), pendant une demi-heure, pour inhiber l'activité de la peroxydase endogène et ensuite dans une solution d'ACI anti-AQP4 (polyclonal, dilution 1/500 dans PBS 0,05M, pH 7,4 plus BSA 0,1%), toute la nuit à température ambiante.

Le lendemain, elles sont rincées dans du PBS 0,05M puis d'abord, incubées dans une solution d'ACII- biotinylés, dilués dans du PBS 0,05M, BSA 0,1%, pendant deux heures à température ambiante. Elles sont ensuite rincées dans du PBS 0,05M avant d'être incubées dans une solution du Complexe Avidin-Biotine-peroxydase (complexe AB, Kit ABC : A 1% + B 1% dans PBS 0,05M), pendant une heure, à température ambiante. Après plusieurs rinçages, l'activité de la peroxydase est révélée par une réaction à la 3-3' DiAmino-Benzidine-tétrachlorhydrate (DAB, 10% dans tampon tris, TBS 0,05M) pendant 10 minutes puis dans une solution d'eau oxygénée (H₂O₂) à 10%, dans DAB-TBS). Le contrôle de la réaction se fait au microscope photonique. La réaction se traduit par la formation d'un précipité brun. Elle est arrêtée en plongeant les coupes dans du tampon Tris-HCl pH 7,6 puis dans du PBS 0,05M. Toutes les incubations et les bains de rinçage ont été réalisés sous agitation constante.

4-Traitement des coupes marquées à la peroxydase pour la microscopie électronique

4-1-Post-fixation au tétroxyde d'osmium (OSO₄)

Les coupes ainsi marquées à la peroxydase sont lavées au PBS 0,1M pH 7,4 et post-fixées pendant 45 mn dans du OSO₄ à 2% dans le tampon phosphate 0,1M PH 7,4. Elles sont par la suite déshydratées dans des bains successifs d'alcool à concentrations croissantes .

4-2-Imprégnation dans une résine araldite

L'imprégnation s'effectue dans deux bains successifs, le premier contenant de l'araldite et de l'alcool absolu (V/V), pendant 1 heure et le second un bain d'araldite pure, dans une étuve à 37°C, pendant toute la nuit.

4-3-Inclusion des coupes (à plat)

Les coupes subissent alors une étape d'inclusion dans un mélange araldite plus accélérateur. Cette inclusion dite à plat, est réalisée entre deux lames siliconées, prêtes à l'emploi (superfrost) ou gélatinées. Les coupes sont immergées chacune dans une goutte du mélange d'inclusion déposé sur la première lame puis recouvertes par une deuxième lame qui permet d'étaler les gouttes de résine, aidé d'un contre poids. La polymérisation de la résine se fait dans une étuve, à 60°C pendant 24 à 48h. Après polymérisation, les lames sont décollées et les pièces d'intérêt délicatement découpées et récupérées.

4-4-Confection des coupes ultrafines

Les coupes incluses à plat sont ensuite collées sur des blocs support d'araldite, préalablement confectionnés dans des gélules et polymérisés. Ainsi, elles peuvent servir, à la confection des coupes ultrafines (600-800Å d'épaisseur), à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert). Les coupes minces, sont alors, récupérées sur des grilles de cuivre ou de nickel (300 meshes) et contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb selon Reynolds, 1963. Les grilles ont été observées au centre de microscopie électronique (Zeiss EM 912, omega), de l'UPMC à Paris VI. Les images capturées à l'aide d'une caméra sont enregistrées sur un CD. Le traitement de ces images sur un ordinateur, utilisant des logiciels adéquats (photoshop, powerpoint et image j) est nécessaire afin d'aboutir à la présentation finale de nos figures.

RESULTATS

I-DISTRIBUTION TOPOGRAPHIQUE ET CYTOARCHITECTURALE DES NEURONES MAGNOCELLULAIRES A VASOPRESSINE ET A OXYTOCINE ET EFFET DE LA SURCHARGE SALINE

Les résultats obtenus après immunomarquage des coupes avec les anticorps dirigés contre la vasopressine (anti-AVP) et l'oxytocine (anti-OT), nous ont permis d'étudier la distribution topographique et cytoarchitecturale des deux populations de neurones magnocellulaires. En effet, l'immunoréactivité de ces deux anticorps est révélée à la fois, dans les corps cellulaires des NMC, situés dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) et dans les axones de ces neurones, qui parcourent l'éminence médiane et qui se terminent dans le lobe nerveux de l'hypophyse. Ainsi, grâce à la caractérisation des deux populations de neurones (à AVP et OT), nous avons pu examiner leurs distributions à l'échelle topographique et cytoarchitecturale.

1-Les neurones magnocellulaires dans les noyaux supraoptiques

Sur des coupes frontales de la région hypothalamique, les NSO apparaissent, en amont, aplatis et étalés latéralement de part et d'autre du chiasma-optique. Au fur et à mesure que l'on avance vers la région postérieure des NSO, ces noyaux deviennent de plus en plus étroits latéralement et plus hauts dorso-ventralement (figure 18).

Sur le plan topographique, les neurones magnocellulaires à OT prédominent dans la région antérieure des NSO, en position ventrale (figure 18A), alors qu'ils se positionnent dorsalement et leur nombre diminue dans la région médiane et postérieure de ces noyaux (figure 18 E). En revanche, les neurones à AVP prédominent dans la région postérieure des NSO, en position ventrale (figure 18 B et F).

Après stimulation osmotique, par ingestion d'eau salée (NaCl à 2%), l'intensité du marquage de l'OT et de l'AVP augmente, en comparaison avec la souris normalement hydratée. En effet, l'immunomarquage de l'OT devient plus important dans la région antérieure (figure 18 E vs A) et intermédiaire des NSO (figure 18 G vs C). Par ailleurs, l'immunomarquage de l'AVP augmente aussi, dans la région intermédiaire (figure F vs B) et de manière plus importante dans la région postérieure des NSO (figure 18 H vs D).

2- Les neurones magnocellulaires dans les noyaux paraventriculaires:

Sur les coupes frontales d'hypothalamus, les NPV sont placés latéralement au troisième ventricule. Ils sont plus larges caudalement et présentent une forme caractéristique, « en ailes de papillon ». Ces noyaux hypothalamiques présentent deux subdivisions de neurones, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires.

Les neurones magnocellulaires sont représentés par des neurones de grande taille qui sont immunomarqués soit à l'AVP soit à l'OT, alors que, les neurones parvocellulaires sont plus petits et immunomarqués aussi à l'AVP.

L'immunomarquage de l'OT est plus intense dans la région médiane des NPV alors qu'il est réduit latéralement (figure 19A). A l'inverse l'immunomarquage de l'AVP est plus concentré dans la région latérale des NPV (figure 19B). De plus, le marquage de l'AVP observé aussi dans la région médiane, caractérise la distribution des deux subdivisions neuronales, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires.

Après une surcharge saline, les immunomarquages de l'OT et de l'AVP augmentent dans la région médiane et latérale des NPV, respectivement (figure 19C et D).

3-Projections des neurones magnocellulaires dans l'éminence médiane

L'éminence médiane (EM) localisée dans l'hypothalamus postérieur est située au niveau du plancher du troisième ventricule. Dans cette région, les immunomarquages de l'OT et de l'AVP sont localisés tout deux, dans la couche interne de l'EM, proche de la couche endymaire. Au contraire, la couche externe de l'EM est exempte de ces deux marquages (figure 20). Il est connu que l'EM interne représente le site de transit des axones des neurones magnocellulaires, en provenance des NSO et des NPV, alors que l'EM externe est le lieu de passage des axones des neurones parvocellulaires, en provenance des NPV.

Dans l'EM interne de la souris normale, l'immunomarquage de l'OT est diffus, alors que celui de l'AVP est beaucoup plus dense (figure 20 A et B).

Dans l'EM interne de la souris stimulée osmotiquement, les immunomarquages de l'OT et surtout de l'AVP diminuent (figure 20 C et D).

4-Projections des neurones magnocellulaires dans le lobe nerveux hypophysaire

Dans l'hypophyse, seul le lobe nerveux est immunopositif pour les deux marquages, OT et AVP (figure 21). Cette expression représente les projections des axones des neurones magnocellulaires des noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) associée à la fois aux fibres de ces neurones mais aussi à leurs dilatations et leurs terminaisons nerveuses. Nous remarquons que l'immunomarquage de l'OT apparaît localisé surtout à la périphérie du lobe nerveux de l'hypophyse, alors que celui de l'AVP est localisé plus au centre et son aspect est plutôt diffus (figure 21A et B).

Après stimulation osmotique, le lobe nerveux de l'hypophyse, présente toujours la même ségrégation du marquage de l'OT et de l'AVP. L'intensité du marquage indique une surexpression de l'OT et de l'AVP, à la périphérie et au centre respectivement (figure 21C et D).

II-DISTRIBUTION DE L'AQP-4 AU NIVEAU GLIALE ET VASCULAIRE ET LES EFFETS DE LA SURCHARGE SALINE

L'étude de l'expression de l'AQP-4 au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire a été réalisée par la technique d'immunofluorescence en simple et en double marquages. Les résultats obtenus montrent que ce canal à eau est omniprésent dans toutes les structures, à la fois dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), dans l'éminence médiane et dans le lobe nerveux de l'hypophyse. De plus, l'utilisation des doubles marquages en immunofluorescence, nous a permis de mieux localiser l'expression de l'AQP-4 en la comparant à chaque fois, à celle de marqueurs cellulaires spécifiques; comme la GFAP, le CD31, l'AVP et l'OT, pour caractériser respectivement, les cellules gliales (type astrocyte), les vaisseaux sanguins et les deux populations de neurones magnocellulaires. La superposition des doubles marquages, nous renseignera alors, sur les colocalisations possibles de l'AQP-4 au niveau des différents types cellulaires.

L'observation des coupes au microscope à fluorescence, nous permet de voir le marquage de l'AQP-4, révélé par le Cy3 et qui renvoie une fluorescence rouge, alors que pour chaque marqueur cellulaire, la révélation est faite avec le FITC, caractérisé par sa fluorescence verte.

1-Dans les noyaux hypothalamiques

1-1-Au niveau des NSO

Le double marquage à l'anti-AQP-4 et l'anti-GFAP a permis de montrer une expression de l'AQP-4 plus intense au niveau des NSO, comparée à celle des autres régions du cerveau (figure 22A). Dans les NSO, l'immunoréactivité à l'AQP-4 est plus importante au niveau de la limitante gliale ventrale (LGV). A ce niveau, sont regroupés les corps cellulaires des astrocytes ainsi que leurs prolongements, comme en témoigne le marquage important, à la GFAP (figure 22B). Par ailleurs, à ce niveau, la superposition du marquage de l'AQP4 et de la GFAP, montre une colocalisation du double marquage, en particulier, autour des vaisseaux sanguins (figure 22C).

Dorsalement dans les NSO, l'immunomarquage de l'AQP-4 montre un aspect diffus. Cette zone dite somatique, correspond à la concentration des somas des neurones magnocellulaires, mêlés aux fins prolongements des astrocytes. Ces derniers sont caractérisés par un marquage au GFAP. A ce niveau, on remarque que les prolongements d'astrocytes entourant les vaisseaux sanguins, présentent un double marquage de l'AQP-4 et de la GFAP, indiquant une colocalisation de ces 2 protéines.

Après stimulation osmotique du système par une surcharge saline, l'expression de l'AQP-4 augmente dans les NSO, en particulier au niveau de la LGV (figure 22D), à priori au niveau des cellules gliales puisqu'il y a une colocalisation de ce marquage avec celui de la GFAP (figure 22F).

Pour caractériser la localisation du marquage périvasculaire, nous avons marqué l'endothélium vasculaire au CD31, en double marquage avec l'AQP4 (figure 22G-I). Les résultats obtenus montrent d'abord, une importante vascularisation des NSO (figure 22H). Cependant, cette vascularisation ne porte pas de marquage à l'AQP-4. Le marquage de l'endothélium est indépendant du marquage de l'AQP-4 (figure 22I). Par ailleurs, le marquage périvasculaire de l'AQP-4 correspond à celui des expansions gliales marquées par la GFAP.

Chez les souris, stimulées l'expression de l'AQP4, augmente, en particulier au niveau de la VGL et autour des vaisseaux sanguins, qui ne sont toujours pas marqués au CD31 (figure 22J, K et L).

1-2-Au niveau des NPV

Au niveau des NPV l'expression de l'AQP-4 est importante (figure 23A). Sa distribution ressemble à celle de la GFAP et la superposition des doubles marquages conforte une expression de l'AQP-4 au niveau des astrocytes (figure 23 B et C). On remarque que les cellules ependymaires, qui entourent le troisième ventricule, expriment aussi, l'AQP4.

Après stimulation du système, l'expression de l'AQP-4 augmente dans les NPV. Elle devient plus importante en particulier, autour des vaisseaux sanguins. Ce résultat traduit une surexpression de l'AQP-4 au niveau des astrocytes, localisée par le double marquage avec la GFAP. On remarque aussi une importante expression de l'AQP-4 au niveau des cellules ependymaires, comparé aux souris non stimulées (figure 23D, E et F).

Le double marquage de l'AQP-4 et du CD31 dans les NPV montre, que l'expression de l'AQP-4 périvasculaire correspond principalement, à une expression au niveau des prolongements astrocytaires (pieds des astrocytes) plutôt que celle de l'endothélium (figure 23G et I). De plus, le marquage au CD31 révèle l'hypervascularisation de ces noyaux hypothalamiques (figure 23H).

2- Dans la neurohypophyse

2-1-Au niveau de l'éminence médiane

Au niveau de l'éminence médiane, les images des doubles marquages, montrent que l'expression de l'AQP-4 est principalement localisée au niveau de la couche interne (EMI), proche du plancher du troisième ventricule et aussi, au niveau de la surface de la couche externe (EME), entourant les vaisseaux du système porte hypophysaire (figure 24A). Parallèlement, l'EMI exprime fortement la GFAP. Il s'agit du marquage des cellules gliales, type astrocyte, spécifiques de l'EM et appelées les tanicytes. Ces cellules sont subdivisées en deux types, selon leurs localisations: les tanicytes ependymaires, localisés directement sous la couche épendymaire, du troisième ventricule et étroitement en relation avec elle. Le second

type, est composé de tanicytes astrocytaires. Plus nombreux, ils occupent la majeure partie de l'EMI et envoient leurs longs prolongements, à travers l'EME, vers les vaisseaux sanguins du système porte hypophysaire (figure 24B). Les tanicytes épendymaires possèdent, eux aussi des prolongements courts, qui parfois traversent, l'épithélium épendymaire, pour entrer en contact direct avec le liquide céphalorachidien ventriculaire. Nous remarquons que l'immunomarquage de l'AQP-4 est colocalisé dans les deux types de tanicytes, marqués tous deux à la GFAP (figure 24C). En revanche, les cellules épendymaires sont moins marquées à l'anti-AQP4.

Après surcharge saline, l'expression de l'AQP-4 au niveau de l'EM, augmente en intensité, à la fois dans la couche interne (EMI) et autour du système porte de l'EME (figure 24D). Cette expression est remarquable surtout au niveau des tanicytes astrocytaires, marqués à la GFAP, et de leurs projections vers l'EME, (figure 24E). Ces expansions se terminent dans la zone richement vascularisée de l'EME. A ce niveau, on remarque une colocalisation de l'AQP-4 et de la GFAP (figure 24F). Le double marquage de l'AQP-4 et du CD31 permet de voir que l'endothélium vasculaire n'est pas marqué à l'AQP-4 (figure 24G, H et I). Cependant, les expansions des tanicytes astrocytaires présentes autour des vaisseaux sanguins, sont marquées à l'AQP-4 (figure 24I et médaillon).

2-2-Au niveau du lobe nerveux hypophysaire

Les résultats concernant l'expression de l'AQP-4 dans l'hypophyse de la souris, montrent que le lobe nerveux de l'hypophyse, exprime intensément l'AQP-4 comparé aux autres lobes de l'hypophyse. En revanche, le lobe intermédiaire n'est, en général, pas marqué à l'AQP4, à l'exception de sa bordure interne, qui délimite le lobe nerveux et externe qui entoure l'espace de la poche de Rathke résiduelle (figure 25A).

Les doubles marquages de l'AQP-4 et de la GFAP, montrent une colocalisation des deux marquages, à la périphérie du lobe nerveux et intermédiaire (figure 25C). Il s'agit d'un marquage des cellules gliales, les pituicytes dans le lobe nerveux et probablement aussi, les cellules folliculo-stellaires, qui délimitent le lobe intermédiaire. De plus, on peut remarquer un marquage régulier de l'AQP-4, autour d'espaces, qui ressemblent à des capillaires sanguins coupés transversalement ou longitudinalement.

La stimulation osmotique du système, augmente l'expression de l'AQP-4 au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse (figure 25D). Cette augmentation se traduit par une surexpression de l'AQP-4 principalement, au niveau des pituicytes (figure 25E et F). On remarque que les endroits de colocalisation de l'AQP-4 et de la GFAP, sont plus fréquents.

En revanche le double marquage de l'AQP-4 et du CD31, ne montre pas de colocalisation de l'AQP-4 et du marqueur endothélial, au niveau de la paroi vasculaire, dans le lobe nerveux de l'hypophyse (figure 25I). Cependant, le marquage perivasculaire est bien visible et correspondrait donc, à un marquage des prolongements de pituicyte, qui entourent cette paroi (figure 25I).

Après stimulation, l'expression de l'AQP-4 augmente autour des vaisseaux sanguins (figure 25J). Elle traduit une expression plus forte de l'AQP-4 au niveau des pieds pituicytaires perivasculaires (figures 25K et L et médaillon).

III-DISTRIBUTION DE L'AQP-4 DANS LES NEURONES MAGNOCELLULAIRES : IMPACT DE LA SURCHARGE SALINE

Les doubles marquages de l'AQP-4 et des marqueurs des neurones magnocellulaires, l'AVP ou l'OT, nous ont permis d'apporter des informations complémentaires, quant à la distribution de l'AQP-4, dans le SHNH.

1-Dans les noyaux hypothalamiques

1-1-Au niveau des NSO

Dans les NSO, l'expression de l'AQP-4 est surtout remarquable au niveau de la LGV. Elle est aussi présente dans la zone somatique où se trouvent regroupés, les somas des neurones magnocellulaires. En effet, un marquage d'aspect ponctué envahit cette zone (figure 26A et G). Les neurones magnocellulaires à AVP sont plus nombreux que les neurones à OT (figure 26B et H). La superposition des deux marquages ne montre en général, pas de colocalisation de l'AQP-4 dans les neurones magnocellulaires (figure 26C et I). Par conséquent, l'expression de l'AQP-4 ne semble pas être neuronale.

Après stimulation osmotique, l'expression de l'AQP-4 paraît plus importante. Toutefois, on n'a pas observé de colocalisation de l'AQP-4 avec l'AVP ou l'OT, au niveau de ces neurones (figure 26F et L).

De plus, les observations réalisées au fort grossissement au niveau de la zone somatique des NSO, montrent clairement l'expression de l'AQP-4 autour des corps cellulaires des neurones magnocellulaires à vasopressine (expression perineuronale), (figure 27). Cette expression a précédemment été révélée par la GFAP. Elle confirme, un marquage de l'AQP-4 autour des neurones à AVP. Par conséquent, ce marquage conforte la présence de l'AQP-4 au niveau des fins prolongements astrocytaires, en relation étroite avec les neurones. Cependant, on ne peut pas se prononcer sur un marquage éventuel de l'AQP-4 au niveau des afférences nerveuses, qui sont aussi, présentes autour de ces neurones magnocellulaires.

Après stimulation osmotique, on remarque d'une part une hypertrophie des neurones magnocellulaires à AVP et d'autre part, une moindre expression de l'AQP-4, autour de ces neurones (figure 27B, D et F).

1-2-Au niveau des NPV

Au niveau des noyaux hypothalamiques paraventriculaires (NPV), l'expression de l'AQP-4, est présente à la fois dans la zone médiane des NPV à prédominance de neurones

magnocellulaires à OT (figure 28A, B et C) mais aussi dans la région latérale de ces noyaux, où prédominent les neurones à AVP (figure 28G, H et I). Cette expression est présente à la fois autour des structures creuses, qui rappellent le marquage perivasculaire. De plus, l'expression de l'AQP-4 est aussi, localisée autour des neurones magnocellulaires à AVP et à OT (figure 28 C et I).

Suite à la stimulation osmotique, alors que l'expression de la vasopressine et de l'ocytocine augmentent simultanément au niveau des NPV, l'expression de l'AQP-4 quant à elle, devient plus intense surtout autour des capillaires sanguins. Elle est moins évidente autour des neurones magnocellulaires (figure 28 D à F et J à L).

2-Dans la neurohypophyse

2-1-Au niveau de l'éminence médiane

Au niveau de l'éminence médiane (EM), l'AQP-4 s'exprime principalement dans la zone interne (EMI), qui correspond au site de transit des axones des neurones magnocellulaires à AVP (figure 29A et B) et à OT (figure 29G et H). La superposition des marquages de l'AQP-4 avec d'une part, l'AVP et d'autre part, l'OT, ne montre, à priori pas de colocalisation de l'AQP-4 au niveau des axones de ces neurones (figure 29C, I et médaillons). Par conséquent, l'expression de l'AQP-4, autour des neurones et des capillaires sanguins représente celles des prolongements des tanicytes.

Après stimulation du système, l'expression de l'AQP-4 augmente dans l'EM interne et au niveau de la couche épendymaire (figure 29D et J). Elle est accompagnée par une augmentation de l'expression de l'AVP et de l'OT (figure 29E et K). Les superpositions des doubles marquages ne montrent pas de colocalisation de l'expression de l'AQP-4, ni au niveau des axones des neurones magnocellulaires à OT ni de ceux à AVP (figure 29F et L).

2-2-Au niveau du lobe nerveux hypophysaire

Au niveau du lobe nerveux hypophysaire, l'AQP-4 s'exprime aussi bien, au centre où sont représentés, de manière prédominante, les axones à vasopressine (figure 30A et B), qu'à la périphérie, où sont plutôt regroupés les axones des neurones magnocellulaires à ocytocine (figure 30A, B, G et H). La superposition des marquages ne montrent pas de colocalisation de l'AQP-4, au niveau des axones à AVP. Cependant une faible colocalisation est visible au niveau des axones à OT, en périphérie (figure R30C et I).

Après stimulation osmotique, l'expression de l'AQP-4 au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse, semble plus importante comparée à la souris contrôle. Cette augmentation se produit simultanément à l'augmentation de l'expression de l'AVP et de l'OT (figure 30D et E, J et K). La superposition des marquages montre une faible colocalisation de l'expression de l'AQP-4 au niveau des axones à AVP (figure 30F). En revanche, l'expression de l'AQP-4 devient plus intense au niveau des axones à OT (figure 30L). De plus, on remarque la

disparition du marquage AQP-4, entourant cette région riche en axones à OT, située à la surface du lobe nerveux.

IV-ASPECTS DE PLASTICITE DU LOBE NERVEUX HYPOPHYSAIRE DANS LES CONDITIONS DE STIMULATION OSMOTIQUE: ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX

La comparaison de la structure du lobe nerveux hypophysaire, avant et après stimulation osmotique, a montré après analyse des coupes au microscope électronique, des changements morphologiques à différents niveaux. En effet, les pituicytes présentent une différence au niveau de leurs formes et de leurs aspects (Figure 31A, B). Ainsi, chez la souris contrôle, le pituicyte apparaît en général, avec une forme globalement ovale, à contour irrégulier, marqué par le départ de nombreux prolongements (Figure 31A).

Le cytoplasme de cette cellule présente un aspect clair et un noyau proéminent et central. Il est riche en réticulum endoplasmique granuleux, en mitochondrie et surtout en vacuoles claires. En revanche, cette description correspond à celle d'un pituicyte protoplasmique. Grâce à leurs prolongements, ces cellules peuvent établir des interactions d'une part, avec les vaisseaux sanguins fenêtrés et forment ainsi, les "pieds" ou "endfeet" périvasculaires. D'autre part, ils forment des contacts étroits avec les axones des neurones, appelés contacts synaptoides. Enfin, ces derniers peuvent s'interposer entre les parois des vaisseaux sanguins et les terminaisons nerveuses.

Autour des pituicytes, les axones des neurones magnocellulaires, sont nombreux et apparaissent souvent en coupe transversale. Ces derniers, sont riches en granules de neurosecrétion denses aux électrons. D'autres sections plus larges et plus riches en granules, sont également visibles à proximité des pituicytes. Ils représentent les dilatations de ces axones ou corps de Herring.

Après stimulation osmotique, les pituicytes apparaissent parfois, plus petits et changent de forme (figure 31B). Leur cytoplasme ainsi que leur noyau sont souvent, plus denses aux électrons. Par ailleurs, on remarque que leurs prolongements sont moins nombreux.

Les fibres nerveuses qui se trouvent autour, présentent moins de granules neurosecrètoires (GNS), comparées à la souris normale. Au contraire elles sont plus riches en granules transparents et en microvésicules (MVs).

Dans l'environnement périvasculaire (EPV), on peut observer de nombreuses terminaisons nerveuses, en particulier, celles des axones des neurones magnocellulaires qui sont bien organisées tout autour de la paroi des vaisseaux sanguins. En effet, dans ce compartiment bien organisé, on note souvent, la présence de deux lames basales (LB), nettement différenciées par leur position. L'une sous jacente à l'endothélium vasculaire, c'est la lame basale endothéliale. L'autre délimite l'espace périvasculaire, il s'agit de la lame basale

parenchymateuse. Cette dernière est directement en contact avec les nombreuses terminaisons nerveuses, qu'elle sépare de cet espace (figure 32A).

En condition physiologique normale, l'espace perivasculaire est souvent réduit et les terminaisons nerveuses y sont plutôt rares. Au contraire, elles sont plus fréquentes et regroupées, au contact de la lame basale parenchymateuse. Elles sont souvent séparées, d'une part entre elles et d'autre part, de la lame basale, par de fines expansions de pituicytes.

Après stimulation, par surcharge saline, on remarque des changements morphologiques, dans cet environnement perivasculaire du lobe nerveux de l'hypophyse. En effet, les terminaisons nerveuses, qui contactent la lame basale parenchymateuse, sont plus souvent, en contact direct entre-elles et avec cette lame basale, sans interposition des prolongements de pituicytes. De plus, l'espace perivasculaire, apparaît souvent dilaté et envahi par de nombreuses terminaisons nerveuses. Ces terminaisons nerveuses sont particulières. D'une part, parce qu'elles occupent l'espace perivasculaire et d'autre part, parce qu'elles sont plus dilatées que les autres terminaisons, qui sont restées au contact de la lame basale parenchymateuse. Ces terminaisons arrivent aussi à contacter parfois directement, la lame basale endothéliale (figure 32B).

Par ailleurs, toutes les terminaisons nerveuses, quelle que soit leur position, sont pauvres en granules denses et plutôt riches en microvesicules et en granules transparents (figure 32B).

V-DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DE L'AQP-4, DANS LE LOBE NERVEUX DE L'HYPOPHYSE : IMPACT DE LA SURCHARGE SALINE

Le marquage par immunoperoxydase de l'AQP-4, observé dans un premier temps, sur des coupes épaisses, au microscope photonique, conforte l'immunomarquage par immunofluorescence. En effet, les résultats obtenus montrent une forte expression de l'AQP-4 dans le lobe nerveux, beaucoup plus marquée, à la surface de ce lobe et à sa base. En revanche, le lobe intermédiaire, présente une expression de l'AQP-4, nettement plus faible et limitée aux seules extrémités de ce lobe (figure 33A).

Après stimulation osmotique, l'expression de l'AQP-4 devient beaucoup plus intense et présente toujours la même distribution. Au contraire, dans le lobe intermédiaire, l'expression de l'AQP-4 reste inchangée (figure 33B).

Les résultats obtenus, à l'échelle de la microscopie électronique, montrent pour la première fois, la distribution subcellulaire de l'AQP4 dans le lobe nerveux de l'hypophyse.

Chez la souris normale, on peut observer une expression de l'AQP-4, sur la membrane plasmique du pituicyte, bien visible les agrandissements. Ce marquage est retrouvé à la fois, au niveau du corps cellulaire (Figure 34A et B) et des prolongements des pituicytes (Figures 35A, B et C). Au niveau de ces structures, l'expression de l'AQP-4 est visible dans la membrane plasmique. On observe des domaines plus denses et plus marqués. En effet, la

densité est localisée dans les domaines de contact des prolongements astrocytaires avec les axones des neurones magnocellulaires (figure 35C). Au contraire, la membrane axonale n'est pas marquée. De plus, on remarque que le contenu de ces axones ainsi que leurs dilatations, sont immunopositifs à l'AQP-4. Ce marquage semble être localisé au niveau des membranes des granules denses (figure 35B et D).

Après stimulation osmotique, l'expression de l'AQP-4 est toujours visible au niveau des contacts glie-neurone, que ce soit au niveau des corps cellulaires (figure 36A et B) ou des prolongements des pituicytes (figure 37A et B). Toutefois, cette expression apparaît variable. Elle semble beaucoup plus forte, au niveau de certains ces prolongements (figure 37C et D). De plus, les fibres axonales qui contactent ces pituicytes sont marquées à l'intérieur mais leurs membranes ne le sont pas (figures 36 et 37A et B).

Dans l'environnement perivasculaire, les terminaisons nerveuses sont très nombreuses et immunomarquées à l'AQP-4 (figures 38A et B). Chez la souris normalement hydratée, l'expression de l'AQP-4 est surtout localisée au niveau des prolongements de pituicytes, en particulier, ceux qui contactent les terminaisons nerveuses (figures 38C et D). A ce niveau, le contenu des terminaisons des neurones magnocellulaires sont marquées à l'AQP-4 alors que, l'endothélium n'en présente pas (figures 38B et D).

Au fort grossissement, on a observé aussi, une expression de l'AQP-4 dans la membrane terminale de certaines terminaisons nerveuses et d'autres pas. Celles qui sont marquées sont riches en granules de sécrétion et sont placées contre la lame basale parenchymateuse (figures 39A, B, C et D).

On a remarqué aussi, la présence de terminaisons nerveuses, plus fines et marquées à l'AQP-4 (figure 39D). Ces dernières, sont espacées les unes des autres.

Chez l'animal, en surcharge saline, on remarque toujours, l'expression de l'AQP-4 dans les terminaisons nerveuses (figure 40A). Cependant, ce marquage est plus fort dans les terminaisons nerveuses qui contactent la lame basale parenchymateuse (figures 40A et B). Au contraire, il est réduit dans les terminaisons qui occupent l'espace perivasculaire (figures 40C et D). On remarque, aussi que ces terminaisons sont exceptionnellement dilatées (figure 40D).

Par ailleurs, on remarque aussi, la dilatation de l'endothélium vasculaire et l'expression de l'AQP-4 qui apparaît au niveau de ce tissu, en particulier, au niveau des vésicules de trancytose (Figure 40B).

Au fort grossissement, on observe plus de détails sur l'expression de l'AQP-4, au niveau des terminaisons nerveuses, en particulier, au niveau de leurs contacts avec la lame basale parenchymateuse (figure 41A). Ainsi, chez l'animal en condition normale d'hydratation, la membrane terminale apparaît plus marquée au niveau des terminaisons externes, comparées à celles des terminaisons internes, par rapport à l'espace perivasculaire. Il est aussi intéressant

de remarquer que les terminaisons voisines, sont étroitement en contact les unes avec les autres. Les granules de sécrétions denses et les microvésicules sont également marqués à l'anticorps anti-AQP-4. Cependant, les vésicules claires semblent moins immunréactives à cet anticorps.

DISCUSSION

I-Distribution des neurones magnocellulaires à AVP et à OT, au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire et effets de la surcharge saline:

Par des immunodétections de l'AVP et de l'OT, caractérisant les neurones magnocellulaires, nous avons montré que les NSO de la souris présentent une architecture différente comparée à ceux du rat (Swaab *et al.*, 1975 ; Vandesande and Dieerickx, 1975). En effet, ces noyaux sont aplatis dans la région rostrale, atteignant leur extension maximale, dans la région médio-caudale ou ils deviennent très allongés et s'étendent dorso-latéralement au chiasma optique.

Nous avons, par ailleurs, comparé la distribution des NMCs à AVP et à OT dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) et dans la neurohypophyse (éminence médiane et lobe nerveux hypophysaire), chez la souris normalement hydratée et la souris stimulée osmotiquement par une surcharge saline.

Dans les NSO de la souris nous avons remarqué la forte prédominance des neurones vasopressinergiques par rapport aux neurones ocytocinergiques. En effet, les neurones à AVP sont largement distribués dans la région médiane et postérieure de ces noyaux alors que les neurones à OT sont plutôt restreints dans la région antérieure. Des résultats similaires sur la distribution de ces deux populations de neurones magnocellulaires, ont été rapportés, chez la même souche de souris (C57BL6) (Sharif-Naeimi *et al.*, 2008). Ces résultats confortent la forte prédominance des neurones à AVP, qui représentent 77% chez cette espèce contre seulement 69% chez le rat wistar (Swaab *et al.*, 1975).

La comparaison de l'expression de l'AVP et de l'OT, dans les NSO, entre la souris normalement hydratée et la souris stimulée osmotiquement par surcharge de sel, montre une augmentation de l'expression, plus importante pour les neurones à AVP, après stimulation.

Dans les NPV la subdivision des neurones magnocellulaires révèle la prédominance des neurones à AVP dans la région latérale et celle des neurones à OT dans la région médiane. Après stimulation osmotique il semble que l'AVP et de l'OT augmentent dans les NMCs.

Dans le lobe nerveux de l'hypophyse, nous avons localisé la prédominance de l'expression de l'AVP dans la région centrale, alors que l'expression de l'OT est plutôt concentrée à la périphérie. Cette distribution a été précédemment décrite chez la souris (Castel and Hochman, 1976; Zhang *et al.*, 2002) et le rat (Van Leeuwen and Swaab, 1977; Van Leeuwen *et al.*, 1979). Ces résultats nous ont permis de localiser les projections des axones des neurones magnocellulaires.

Après une surcharge saline il semble que l'AVP et l'OT augmentent dans la partie centrale et périphérique du lobe nerveux hypophysaire, respectivement.

Par conséquent, nos résultats montrent une augmentation de l'expression de l'AVP et l'OT, aussi bien dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), que dans le lobe nerveux de l'hypophyse. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres travaux, dans notre équipe, chez la souris Balb/c et dans les mêmes conditions expérimentales (Benabdesselam *et*

al., 2010). Ces travaux ont rapporté les résultats de la quantification de l'expression de la vasopressine, dans les NSO, NPV et la neurohypophyse, dans les deux conditions expérimentales, montrant une augmentation significative du taux d'AVP, dans toutes ces structures, après stimulation osmotique. Cette augmentation a été appuyée par la présence, par hybridation in-situ, d'importants taux de ARNm de l'AVP.

Par conséquent, tous ces résultats témoignent de la réponse du système hypothalamo-neurohypophysaire et son comportement face à la stimulation osmotique, par ingestion d'une solution salée, pendant huit jours. En effet, la synthèse et la sécrétion de la vasopressine et de l'ocytocine sont principalement contrôlées par l'osmolarité, ainsi que par le volume plasmatique (Robertson, 1995 ; Robertson and Berl, 1996 ; Kakiya *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2004). Par conséquent toutes ces réponses traduisent la sensibilité de ce système et son adaptation physiologique à ces conditions d'hyperosmolarité chez la souris.

Au niveau de l'éminence médiane, le marquage immunohistochimique de l'AVP et de l'OT nous a permis de localiser les axones des neurones magnocellulaires, au niveau de la zone interne, proche de la couche épendymaire. Les résultats obtenus montrent que l'expression de l'AVP est plus intense que celle de l'OT, chez la souris normalement hydratée. Après stimulation osmotique on remarque une diminution du marquage, en particulier pour l'AVP, dans l'éminence médiane interne.

Ce résultat traduit probablement une mobilisation des hormones en stock et leur sécrétion dans le lobe nerveux de l'hypophyse. Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par Dorbani-Mamine et collaborateurs (1998) qui ont rapporté que chez le rat stimulé par une privation d'eau de six jours, les axones des neurones vasopressinergiques, au niveau de l'éminence médiane développaient de larges dilatations dans lesquelles sont stockés les granules de sécrétion. Ces dilatations axoniques servent aussi au stockage de l'ARNm de la vasopressine (El Madjoubi *et al.*, 1986).

II-Expression de l'AQP-4 dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus et les effets de la stimulation osmotique:

Nos résultats montrent une forte et large expression de l'AQP-4 au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire. En effet, cette expression est localisée, en amont, au niveau des noyaux hypothalamiques (NSO, NPV), où sont regroupés les corps cellulaires et les dendrites de la grande majorité des neurones magnocellulaires. A ces niveaux, a lieu la synthèse des neuropeptides, AVP et OT et aussi, la détection et l'intégration des informations.

Au niveau des NSO, l'expression de l'AQP-4, est plus intense comparativement, au tissu nerveux qui les entoure. Cette expression est hétérogène. Elle est généralement diffuse, à l'exception de la lame gliale ventrale (LGV), où cette expression est plutôt dense.

Dorsalement, dans la région somatique des NSO, l'AQP-4 est surtout bien localisée autour des capillaires sanguins et autour des neurones magnocellulaires. Le double marquage de l'AQP-4 et de la GFAP, a permis de localiser l'AQP-4 au niveau des prolongements des astrocytes marqués à la GFAP, qui entourent à la fois les vaisseaux sanguins et les neurones magnocellulaires. Nous n'avons cependant pas observé de marquage de l'AQP-4, au niveau des neurones magnocellulaires et des cellules endothéliales.

Au niveau de la LGV, l'AQP-4 serait localisée principalement, au niveau des corps cellulaires des astrocytes.

Au niveau des NPV, la distribution de l'expression de l'AQP-4 ressemble à celle décrite dans les NSO. En effet, là aussi l'AQP-4 est surtout localisée au niveau des astrocytes et de leurs prolongements qui entourent les vaisseaux sanguins et les neurones magnocellulaires. De plus, l'AQP-4 est fortement exprimée au niveau des cellules épendymaires du troisième ventricule. Cependant, là aussi, ni les neurones ni les cellules endothéliales n'apparaissent marqués à l'AQP-4. Par ailleurs, il est difficile de préciser si les astrocytes, qui entourent aussi, les neurones parvocellulaires, sont marqués à l'AQP-4.

Par conséquent, dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV), l'expression de l'AQP-4 est principalement localisée au niveau des astrocytes et représente un marquage qui englobe les corps cellulaires et les prolongements des astrocytes. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie, notamment chez le rat (Nielsen *et al.*, 1997; Badaut *et al.*, 2000; Venero *et al.*, 1999 ; 2001) et chez la souris (Frigeri *et al.*, 2001; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004 a; b).

En effet, la plupart de ces travaux rapportent une expression de l'AQP-4, généralement gliale, spécifiquement au niveau des astrocytes et s'accordent sur le fait que les neurones n'expriment pas ce type d'AQP.

Ainsi, les travaux de Nielsen et ses collaborateurs (1997), menés sur les organes osmosensibles, comme le noyau sous fornical (SFO), NSO et NPV, ont montré sur la base des résultats obtenus par la technique d'immunocytochimie et de localisation des particules d'or, une forte expression de l'AQP-4 au niveau des lames gliales, comme la lame gliale des NSO. A ce niveau, l'expression de l'AQP-4 est plus intense mais se limite aux seuls domaines membranaires qui contactent les éléments nerveux, tels les dendrites et les axones. Tout comme dans nos résultats, ces auteurs rapportent que les éléments nerveux ne sont jamais marqués. Cette expression particulière de l'AQP-4 dans ces noyaux, conforte dans une implication spéciale de ces lames gliales, dans les adaptations rapides aux changements de l'osmolarité du milieu extracellulaire (capture d'eau et d'ions).

L'expression de l'AQP-4 dans des régions du cerveau, plus sensibles que d'autres aux variations de l'osmolarité (osmosensibles), a suscité de nombreux travaux de recherche. Parmi, ces structures nerveuses, on peut citer, les organes circumventriculaires, en particulier l'organe sous fornical (SFO), les noyaux hypothalamiques (NSO, NPV), le noyau supra chiasmatique et les noyaux arqués. (Jung *et al.*, 1994 ; Nielsen *et al.*, 1997; Badaut *et al.* 2000; 2002 ; Frigeri *et al.*, 2001; Venero *et al.*, 1999; 2001; Nagelhus *et al.*, 2004).

A l'échelle ultrastructurale, il a été remarqué une forte immunoréactivité de l'AQP-4 au niveau des prolongements d'astrocytes, qui entourent les neurones magnocellulaires (expression perineuronale) et des prolongements qui forment les limitantes gliales, «glial lamellae» (Badaut *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997). Cependant, cette expression diminue au contact des axones, des dendrites et des jonctions intercellulaires. Cette distribution spécifique de l'AQP-4, au niveau des astrocytes, suggère que ces canaux hydriques, impliqueraient ces cellules gliales dans l'osmoreception centrale. En effet, grâce à ces canaux, les astrocytes seraient capables de réagir rapidement aux variations de l'osmolarité du milieu extracellulaire (Nielsen *et al.*, 1997, Wells 1998).

Par ailleurs, dans le SNC, il est suggéré d'autres fonctions de l'AQP-4, tel que le contrôle du volume et de l'homéostasie du milieu extracellulaire (références). En effet, compte tenu du rôle clef des astrocytes dans le contrôle de la composition du milieu extracellulaire et de son importance pour le bon déroulement de l'activité neuronale, il est vraisemblable que l'AQP-4 y participe efficacement. Par ailleurs, il a été souvent rapporté, dans la bibliographie, la coexpression de l'AQP-4 et du Kir-4 (canal potassique), au niveau des cellules gliales (astrocytes et cellules de Müller) (Nagelhus *et al.*, 1999; Kofuji et Newman, 2004; Nagelhus *et al.*, 2004;). Cette co-expression traduit une collaboration entre ces deux canaux membranaires, dans l'effet tampon sur le potassium et sur le contrôle de l'homéostasie hydrominérale. Ainsi, le potassium accumulé dans le milieu extracellulaire est rapidement récupéré par la cellule gliale suite à un contrôle par un flux d'eau à travers les AQPs, ce qui a pour conséquence, de rétablir les conditions d'excitabilité nerveuse (Nagelhus *et al.*, 2004).

L'expression de l'AQP-4 que nous avons montré autour des somas des neurones magnocellulaires, au niveau des NSO et NPV, traduit aussi, le rôle potentiel de ce canal, dans la transduction rapide du signal nerveux (Verkman, 2005).

Par ailleurs, d'autres cellules, que les astrocytes, expriment aussi l'AQP-4, mais de manière moins importante, dans le cerveau. Il s'agit des cellules épendymaires bordant les ventricules (Frigeri *et al.*, 1995; 2001; Nielsen *et al.*, 1997), et des cellules endothéliales (Nagelhus *et al.*, 1998; 2004; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

De plus, l'expression perivasculaire de l'AQP-4, a été communément rapportée, dans le système nerveux central et désigne l'expression au niveau des pieds astrocytaires périvasculaires («endfeet»).

Cependant, d'autres travaux, basés sur l'hybridation in situ, ont confirmé l'expression de son ARNm au niveau des astrocytes mais de plus ils ont rapporté son expression au niveau des neurones (Jung *et al.*, 1994; Venero *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002). Ce dernier résultat est en contradiction avec les résultats précédents (immunohistochimie) et les auteurs suggèrent que cette différence serait attribuée à une faible expression de la protéine (AQP-4) dans les neurones, ce qui la rend difficile à la détection par cette technique (Venero *et al.*, 2001; Badaut *et al.*, 2002). Par conséquent, la non perception des marquages neuronaux hypothalamiques que nous avons obtenue serait probablement due au faible taux d'AQP-4 exprimée par les neurones magnocellulaires.

En plus d'être exprimée dans le SNC, l'AQP-4, dans le cerveau, montre souvent une polarité remarquable au niveau de sa distribution. Ainsi, elle est fortement exprimée au niveau des pieds d'astrocytes, bordant les surfaces piales («subpial») et vasculaires. Ces surfaces représentent des sites privilégiés pour les mouvements d'eau (Nielsen *et al.*, 1997; Rash *et al.*, 1998). Cette distribution a permis d'envisager, dans un premier temps, un rôle potentiel de l'AQP-4 dans le contrôle de la barrière hémato-encéphalique, dans son développement ainsi que dans le maintien de son intégrité (Nicchia *et al.* 2004; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

Dans le cerveau, il a été rapporté, selon certains auteurs, la co-expression de l'AQP-4 et l'AQP-9 au niveau des astrocytes, au niveau des noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) chez le rat (Badaut *et al.*, 2000 a; b; 2002) et chez la souris (Badaut *et al.*, 2004). Cependant, alors que l'expression de l'AQP-4 rapportée, par la littérature, est souvent gliale, l'expression de l'AQP-9 est localisée au niveau des neurones, tels que les neurones parvocellulaires des NPV et les neurones catécholaminergiques du cortex, (Badaut *et al.*, 2004).

L'expression de l'AQP-9 au niveau des neurones a permis de postuler à d'autres rôles des AQPs, dans le cerveau. Ainsi, ces neurones, qui expriment l'AQP-9 et qui ne sont pas forcément impliqués dans le mécanisme d'osmorégulation, semblent plutôt intervenir dans le contrôle du métabolisme énergétique (Badaut *et al.*, 2004). En effet, contrairement à l'AQP-4 qui transporte exclusivement l'eau (aquaporine), l'AQP-9 est capable de transporter en plus, d'autres métabolites tels que le glycérol et les monocarboxylates (aquaglyceroporines), ce qui laisse suggérer que ces neurones utilisent ces canaux pour faciliter la diffusion de ces substrats énergétiques.

Après stimulation osmotique, l'expression de l'AQP-4 augmente en général, dans les NSO. Elle devient plus importante, au niveau de la lame gliale ventrale, simultanément à une augmentation de l'expression de la GFAP. De plus, l'expression de l'AQP-4, autour des neurones magnocellulaires et autour des vaisseaux sanguins, augmente.

Au niveau des NPV, la surcharge saline induit aussi, une augmentation de l'expression de l'AQP-4, à la fois dans les régions perivasculaires et perineuronales.

D'autres travaux se sont intéressés, aux conséquences de différents stress hyperosmotiques, comme les solutions de manitol ou de sorbitol à 3% et de NaCl à 0,4%, sur l'expression des AQP-4 et AQP-9. Dans tous les cas, les résultats obtenus montrent une augmentation de l'expression de l'AQP-4 et de l'AQP-9, au niveau des astrocytes en culture et du cortex cérébral chez le rat (Arima *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'analyse quantitative de l'ARNm de l'AQP-4 a montré une augmentation de son expression, dans l'hypothalamus de poulet, suite à une déshydratation, par privation d'eau (Saito *et al.*, 2005).

Par conséquent, ces résultats proposent et renforcent l'hypothèse selon laquelle, l'AQP-4 serait impliquée dans l'osmoreception centrale.

III-Expression de l'AQP4 au niveau de la neurohypophyse et les effets de la surcharge saline :

La neurohypophyse, qui comprend l'éminence médiane et le lobe nerveux hypophysaire, représente le site de projection des noyaux hypothalamiques. A ce niveau les neurones magnocellulaires, peuvent stocker ou libérer, les neurohormones, l'AVP et l'OT, dans la circulation générale.

Les résultats obtenus sur l'expression de l'AQP-4, au niveau de l'éminence médiane, qui représente à la fois, un lieu de stockage et parfois, de libération des neurohormones, montrent une forte expression de l'AQP-4. Cette expression est surtout localisée dans l'éminence interne où sont projetés les axones des neurones magnocellulaires. De plus la distribution de l'AQP-4 dans cette zone, est corrélée à celle de la GFAP qui caractérise les deux types de tanicytes, épendymaire et astrocytaire. Les tanicytes astrocytaires envoient des expansions très longues qui entourent les vaisseaux sanguins et aussi se dirigent vers l'éminence médiane externe. L'autre type de tanicytes, les épendymaires, envoient aussi, des expansions plus courtes, qui traversent la couche épendymaire. Toutes ces expansions sont marquées à l'AQP-4. Dans la paroi du troisième ventricule, les cellules épendymaires expriment également l'AQP-4. Ainsi, l'AQP-4 serait exprimée au niveau des tanicytes et des épendymocytes, dans la couche interne de l'éminence médiane. Au contraire, la couche externe ne présente pas de marquage, à l'exception de sa surface externe, riche en vaisseaux sanguins du système porte hypophysaire. Cette expression serait celle des membranes piales, qui expriment fortement l'AQP-4.

Ces résultats sont en accord avec ceux établis chez le rat (Frigeri *et al.*, 1995a; b). Ces résultats ne font pas l'unanimité, au contraire ils s'opposent à d'autres observations, notamment, les résultats de Badaut et collaborateurs (2002). En effet, selon ces derniers auteurs, l'expression de l'AQP-4 est absente au niveau des tanicytes et serait présente, seulement, au niveau des membranes apicale et latérale des cellules épendymaires.

Cependant, aucun résultat n'a été rapporté sur l'expression de l'AQP-4, au niveau des axones des neurones magnocellulaires. Il faut reconnaître, qu'il est difficile d'identifier, le marquage de l'AQP-4, autour des axones des neurones magnocellulaires, qui sont regroupés dans la

couche interne de l'EM. Par conséquent, il serait donc intéressant d'envisager d'explorer cette expression, à l'échelle de la microscopie électronique.

La recherche de la distribution de l'AQP-4 dans le lobe nerveux de l'hypophyse représente une approche originale. D'une part, parce que peu de travaux ont été publiés sur le sujet et d'autre part, sa nature nerveuse et sa fonction neuroendocrine. Ainsi son origine embryonnaire nerveuse, va nous permettre de le comparer aux autres composants de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire (les noyaux hypothalamiques et l'éminence médiane). Ce lobe se distingue des autres parties de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire en étant placé en dehors de la barrière hémato-encéphalique. Enfin, il est le siège de la neurosecrétion; là où les terminaisons des neurones magnocellulaires libèrent les neurohormones dans le sang.

Par conséquent, l'étude de la distribution de l'AQP-4 dans le lobe nerveux de l'hypophyse, permet une nouvelle approche morpho-fonctionnelle. Les résultats sur l'expression et la distribution de l'AQP-4 dans le lobe nerveux de l'hypophyse, par immunofluorescence, montrent que ce canal est fortement exprimé dans le lobe nerveux alors qu'il est absent dans le lobe intermédiaire, à l'exception d'un marquage limité à la surface de ce lobe et qui correspond, à la paroi de la poche de Rathke résiduelle.

Le marquage de l'AQP-4 dans le lobe nerveux est codistribué partiellement avec la GFAP, surtout dans la région périphérique. Ce marquage est donc, au niveau des pituicytes. De plus, d'autres cellules expriment à la fois la GFAP et l'AQP-4, et qui bordent le lobe intermédiaire. Il s'agit de cellules gliales, les cellules folliculo-stellaires.

L'exploration de l'expression des aquaporines dans l'hypophyse est un sujet récent. En effet, ce n'est qu'en 2007, que les premiers travaux sont publiés par Kuwahara et ses collaborateurs. Cette équipe, a pour la première fois identifié les différents types d'AQP dans l'hypophyse de rat. Ainsi, sur les neuf types (AQP1 à 9) recherchés, par RT-PCR et par immunohistochimie, seuls quatre sont présents c'est l'AQP-1, AQP-3, AQP-4 et l'AQP-5.

Actuellement, des travaux commencent à être publiés sur la distribution de l'AQP-4, dans l'hypophyse et en particulier chez le rat (Kuwahara *et al.*, 2010; Pocsai *et al.*, 2010).

Nos résultats rapportent la même distribution de l'AQP-4, chez la souris comparée au rat (Pocsai *et al.*, 2010).

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, la distribution subcellulaire, de l'AQP-4, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, à la technique d'immunoperoxydase, (Mesbah-Benmessaoud *et al.*, 2011).

Ces résultats montrent de façon originale, une double distribution de l'AQP-4; au niveau des pituicytes et au niveau des axones et des terminaisons nerveuses.

Au niveau des pituicytes, nous avons montré que l'AQP-4 est localisée au niveau des corps cellulaires et des prolongements. Ce marquage est souvent, plus intense au niveau des contacts synaptoides, entre les membranes du pituicyte et celle des fibres ou des terminaisons nerveuses. La membrane de ces dernières apparaît non marquée. Ainsi, l'expression de l'AQP-4, au niveau de ces contacts neurogliaux, est nouvelle. En effet, ce marquage spécifique n'apparaît pas, dans les structures hypothalamiques, comme les NSO, observées après marquage aux particules d'or (Nielsen *et al.*, 1997).

Si les membranes des terminaisons nerveuses en contact avec les prolongements pituicytaires ne sont pas marquées, celles qui contactent la lame basale parenchymateuse présentent une membrane terminale fortement immunoréactive à l'AQP-4. De plus, la membrane des granules denses et celle des microvésicules, dans les axones et les terminaisons nerveuses, montrent aussi un marquage de l'AQP-4. Cette présence granulaire ou vésiculaire de l'AQP-4 est similaire à celle de l'AQP-1 dans la membrane des granules du pancréas exocrine (Cho *et al.*, 2002) et de la glande parotide salivaire (Matsuki *et al.*, 2005). De même, plus récemment, les travaux de Arnatouva et collaborateurs, (2008), ont également retrouvé de l'AQP-1 au niveau de la membrane des granules de sécrétion, à cœur dense des cellules endocrines des lobes antérieur, intermédiaire et nerveux de l'hypophyse de bovins. De plus ces travaux, ont démontré que l'AQP-1 joue un rôle important dans le maintien et le contrôle de la fonction de sécrétion et dans la biogenèse de ces granules. De plus, il a été rapporté que ces granules diminuent de taille et leur contenu subit une condensation durant la phase de maturation. Ces phénomènes sont accompagnés de sortie d'ions et d'eau (Wong *et al.*, 1991). Il a été démontré aussi, que durant l'exocytose, l'eau entre dans les granules de sécrétion, ce qui provoque leur dilatation (Cho *et al.*, 2002).

Par conséquent, l'expression des AQPs dans les granules de sécrétion, serait responsable de la sortie de l'eau, durant le processus de maturation des granules alors que son entrée permet la dilatation de ces granules durant leur exocytose.

A partir de ces résultats, on peut déduire par extrapolation, que nos résultats sur l'expression de l'AQP-4 au niveau des granules à cœur dense et des microvésicules, dans les terminaisons nerveuses, pourrait traduire les mêmes fonctions, à savoir la maturation des granules d'une part et l'exocytose de ces granules et celle des microvésicules, d'autre part. Nous suggérons, sur la base des résultats originaux obtenus, que l'expression de l'AQP-4, dans le lobe nerveux de l'hypophyse pourrait traduire un nouveau rôle de l'AQP-4 inhérent à la neurosécrétion et sa régulation.

La famille des dystrophines, en particulier la Dp 71 ainsi que les protéines associées au complexe des dystrophines (DAPC) comme les syntrophines, sont rapportées pour être des

molécules clés responsables de l'ancrage et l'agrégation des canaux hydriques type AQP-4 et aussi du canal potassique, Kir-4, au niveau des pieds astrocytaires bordant les surfaces vasculaires et piale du cerveau (Frigeri *et al.*, 2001, Neely *et al.*, 2001; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004) et les cellules de Müller au niveau de la rétine (Nagelhus *et al.* 1999 ; Kofuji and Connors 2003 ; Kofuji and Newman, 2004 et Sene *et al.*, 2009). En effet, ces travaux s'accordent , en majorité, à dire que les domaines qui expriment fortement l'AQP-4 («pieds» perivasculaires), expriment aussi, certaines isoformes de la famille des dystrophines, en l'occurrence, la Dp71 et également certaines protéines du complexe des protéines associées aux dystrophines, comme l' α -syntrophine, le β -dystroglycane et les dystrobrevines (Kofuji and Newman, 2004; Amiry-Moghaddam *et al.*, 2004).

Pour conforter le rôle joué par les dystrophines dans la distribution et le fonctionnement de l'AQP-4, certains travaux, chez la souris *mdx*, déficiente en Dp427, ont signalé des perturbations, à différents niveaux, attribuées à l'absence des dystrophines (Frigeri *et al.*, 2001). En effet, ces auteurs ont remarqué en utilisant des méthodes de quantification et d'immunocytochimie, une importante réduction du taux d'AQP-4 (70%), au niveau de la fraction des membranes, récupérées à partir du cortex cérébral. Cette réduction est accompagnée d'une manifestation morphologique, assez spectaculaire, qui se traduit par la dilatation des pieds astrocytaires périvasculaires. Cet aspect traduit habituellement, en pathologie, la mise en place d'un œdème cérébral (Frigeri *et al.*, 2001). Ainsi, ces résultats montrent que l'absence des dystrophines provoque une perturbation des processus de recrutement et d'assemblage de l'AQP-4 et donc de l'homéostasie hydrominérale.

CONCLUSION

L'analyse morphologique montre une distribution ubiquitaire de l'AQP-4, au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire, de la souris. En effet, l'AQP-4 est retrouvée dans les noyaux hypothalamiques (NPV et NSO), dans l'éminence médiane et dans le lobe nerveux hypophysaire.

Au niveau des NSO et des NPV, l'AQP-4 est localisée principalement au niveau des astrocytes. Elle est présente à la fois, au niveau des corps cellulaires et des prolongements gliaux. L'expression de cette protéine est plus spectaculaire autour des vaisseaux sanguins et des neurones magnocellulaires. De plus, la lame gliale ventrale (LGV), dans les NSO et les cellules ependymaires dans les NPV, expriment fortement l'AQP-4.

Cette distribution pourrait traduire d'une part, l'implication de l'AQP-4, dans l'homéostasie hydroélectrolytique et le contrôle du volume cérébral et d'autre part, son intervention dans l'osmosensibilité interne, des noyaux hypothalamiques et en particulier, des NSO.

La distribution de l'AQP-4 dans les prolongements des astrocytes, bordant à la fois les vaisseaux sanguins et les neurones magnocellulaires, conforte cette hypothèse. En effet, ces canaux osmosensibles pourraient intervenir à la fois dans la réception de l'information (variation de l'osmolarité), facilitée par leur proximité avec les vaisseaux sanguins mais de plus, ils seraient responsables de la transmission de ce signal aux neurones magnocellulaires.

La forte expression de l'AQP-4, au niveau de la LGV des NSO et dans la partie interne de l'éminence médiane, semble impliquer ces canaux dans la transduction du signal au niveau des dendrites et des axones des neurones magnocellulaires.

Au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse, la distribution de l'AQP-4 est aussi gliale et concerne les pituicytes. Elle est fréquente au niveau des contacts neuro-gliaux, impliquant la membrane des corps cellulaires et des prolongements de pituicytes qui contactent les axones des neurones magnocellulaires. Ces contacts de type "synptoïdes" seraient impliqués, à ce niveau, dans l'osmosensibilité de ce lobe, comme pour le reste du système hypothalamo-neurohypophysaire.

Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de l'AQP-4, suite à la stimulation osmotique (boisson d'eau salée, pendant huit jours), au niveau hypothalamique et du lobe neurohypophysaire, conforte cette hypothèse.

Par ailleurs, nous avons montré pour la première fois la présence exceptionnelle de l'AQP-4 au niveau de la membrane des terminaisons des neurones magnocellulaires, qui contacte la lame basale endothéliale. Cette expression suggère une nouvelle fonction neuroendocrine de ce canal, dans le lobe nerveux de l'hypophyse.

Cette distribution de l'AQP-4 rappelle celle décrite au niveau des pieds astrocytaires perivasculaires, dans différentes régions du cerveau. A ce niveau l'expression de l'AQP-4 concerne la membrane des prolongements d'astrocytes, qui contactent la lame basale des

vaisseaux sanguins. Cette expression suggère l'implication de l'AQP-4 dans le contrôle et l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

Nous avons montré aussi, pour la première fois, la présence de l'AQP-4 au niveau des granules de sécrétion et des microvésicules, contenus dans les fibres et les terminaisons nerveuses, des neurones magnocellulaires. Cette expression originale, est favorable à l'implication de l'AQP-4 dans les processus neurosécrétoires. En effet, l'expression de l'AQP-4 est d'autant plus importante que les granules de neurosécrétion et les microvésicules sont nombreux. Après stimulation osmotique, le nombre de ces granules diminue dans les terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires et simultanément, on remarque une dilatation de ces dernières. Par conséquent, l'AQP-4 pourrait intervenir dans le contrôle du volume, responsable de la dilatation des terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires, observée en réponse au stimulus osmotique. De son côté, l'expression de l'AQP-4 au niveau de la membrane des granules de neurosécrétion, serait responsable du stockage et/ou de la sécrétion de leurs produits.

En se basant sur le modèle hypothétique proposé pour la distribution des dystrophines et des DAPs (Benabdesselam, 2010), et qui a permis de suggérer différents modèles hypothétiques du complexe des dystrophines, selon le type cellulaire où sont exprimés ces protéines du cytosquelette et selon leur environnement chez la souris étudiée, nous nous proposons de faire un complément, en exploitant nos résultats, sur la distribution de l'AQP-4, au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire (figure 42).

Ainsi, les résultats obtenus et au vu de leur originalité, ouvrent de nombreuses perspectives.

Pour étayer l'idée de l'implication des dystrophines et de leurs protéines associées (DAPs), dans la distribution et le regroupement de l'AQP-4, au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire, nous nous proposons de faire une étude d'immunodétection par immunohistochimie en double marquage dans des conditions normales et de déshydratation.

Nous nous proposons de rechercher la ou les isoformes de dystrophines qui sont préférentiellement liée(s) à l'AQP-4 ainsi que le niveau cellulaire de leur expression gliale (corps cellulaire, expansions périvasculaire, expansions périneurale) ou neuronale.

Cette étude serait complétée par une étude utilisant des souris mutantes ou transgéniques en dystrophines pour d'une part, suivre la distribution des AQP-4 dans le système hypothalamo-neurohypophysaire et d'autre part, vérifier leur réponse cellulaire au stress hydrique.

La quantification des mRNA de l'AQP-4 est aussi un projet d'étude chez les souches transgéniques en dystrophines normalement hydratées ou déshydratées en comparaison avec les souches fond génétique respectives

- Agre, P. (1997). Molecular physiology of water transport: aquaporin nomenclature workshop. Mammalian aquaporins. *Bio Cell* , 89, 255-257.
- Agre, P., Preston, G., Smith, B., Jung, J., Raina, S., Moon, C., et al. (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular channel water channel. *Am. J. Physiol.* , 265, F463-F476.
- Ahn. (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissue, have distinct chromosomal location, and each bind to dystrophin and its relatives. (A. H. Ahn, C. A. Feener, E. Gussoni, M. Yoshida, E. Ozawa, & L. M. Kunkel, Eds.) *J Biol Chem* , 271, 2724-2730.
- Amaya, F., Tanaka, M., Hayashi, S., Tanaka, Y., & Ibata, Y. (2001). Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Sensitisation after chronic salt loading. *Neuroendocrinology* , 73, 185-193.
- Amiry-Moghaddam, M., & Ottersen, O. P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* , 4, 991-1001.
- Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P., Traystman, R. J., Haug, F. M., Froehner, S. C., et al. (2003). An alpha-syntrophin-dependant pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci* , 2106-2111.
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., de Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., et al. (2003). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci* , 13615-13620.
- Amiry-Moghaddam. (2004a). syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute natremia. (M. Amiry-Moghaddam, R. Xue, F. M. Haug, J. D. Neely, A. Bhardwaj, P. Agre, et al., Édés.) *FACEB J* , 18, 542-544.
- Amiry-Moghaddam, M., Frydelund, D. S., & Ottersen, O. P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: Molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* , 129 (4), 997-1008.

- Amstrong, W.E., Warach, S., Hatton, G.I., & McNeil., T.H. (1980). Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus : A cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*, 5, 1931-1958.
- Antunes-Rodriguez, J., de Castro, M., Elias, L. L., Valenca, M. M., & McCann, S. M. (2004). Neuroendocrine control of body fluid metabolism. (J. Antunes-Rodrigues, M. de Castro, L. L. Elias, M. M. Valenca, & S. M. McCann, Éds.) *Physiol Rev*, 84, 169-208.
- Arima, H., Yamamoto, N., Sobue, K., Umenishi, F., Tada, T., Katsuya, H., et al. (2003). Hyperosmolar mannitol stimulates expression of AQP4 and 9 through a p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *Biological Chemistry*, 278 (45), 44525-44534.
- Arnautova, I., Cawley, N. X., Patel, N., Kim, T., Rathod, T., & Peng Loh, Y. (2008). Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells. *Mol Endocrinol*, 22 (8), 1924-1934.
- Austin. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. (R. C. Austin, G. E. Morris, P. L. Howard, H. J. Klamut, & P. N. Ray, Éds.) *Neuromuscl*, 10, 187-193.
- Badaut, J., Moro, V., Seylaz, J., & Lasbennes, F. (1997). Distribution of muscarinic receptors on the endothelium of cortical vessels in the rat brain.. *Brain Res*, 778, 25-33.
- Badaut, J., Nehlig, A., Verbavatz, J.-M., Stoeckel, M. E., Freund-Mercier, M. J., & Lasbennes, F. (2000). Hypervascularization in the magnocellular nuclei of the rat hypothalamus: Relationship with the distribution of aquaporin-4 and markers of energy metabolism. *J Neuroendoendocrinology*, 12, 960-969.
- Badaut, J., Hirt, L., Granziera, C., Bogousslavsky, J., Magistretti, P. J., & Regli, L. (2001). Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 477-482.
- Badaut, J., lasbennes, F., Magistretti, P. J., & Regli, L. (2002). Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 367-378.
- Badaut, J., Petit, J.M., Brunet, J.F., Magistretti, P. J., Charriaut-Marlangue, C. & Regli, L. (2004). Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain : preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*, 128, 27-38.

- Barberis, C., Mouillac, B., & Durroux, Y. (1998). Structural bases of vasopressin/ oxytocin receptor function. *J Endocrinol*, *156*, 223-229.
- Beagley, G. H., & Cobbett, P. (1997). Inhibition of nitric oxide synthase induces ultrastructural changes in the neurohypophysis of dehydrated rats. (G. H. Beagley, & P. Cobbett, Éds.) *Neurosci Lett*, *222*, 143-146.
- Bealer, S.L., & Crowley, W.R. (1998). Noradrenergic controls of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol*, *274*, E453-E458.
- Benabdesselam, R., Sene, A., Raison, D., Benmessaoud-Mesbah, O., Ayad, G., Mornet, D., et al. (2010). A deficit of brain dystrophin impairs hypothalamic osmostat. *Journal of Neuroscience Research*, *88*, 324-334.
- Bicknell, R.J., Luckman, S.M., Inenaga, K., Mason, W.T., & Hatton, G.I. (1989). β -adrenergic and opioid receptors on pituicytes cultured from adult rat neurohypophysis : regulation of cell morphology. *Brain Res Bull*, *22*, 379-388.
- Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M. A., & Beesley, P. W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neuron and glia. *J Cell Biol*, *147*, 645-658.
- Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M.A., Beesley, P.W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol*, *147*, 645-658.
- Boback, J. B., & Salm, A.K. (1996). Plasticity of astrocytes of the ventral glial limitans subjacent to the supraoptic nucleus. *J Comp Neurol*, *376*, 188-197.
- Bonfanti, L., Poulain, D.A., & Theodosis, D.T. (1993). Radial glia-like cells in the supraoptic nucleus of the adult rat. *J Neuroendocrinol*, *5*, 1-5.
- Bourque, C. W. (1998). Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. (C. W. Bourque, Éd.) *Prog Brain Res*, *119*, 59-76.
- Bourque, C. W., & Oliet, S. R. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Ann Rev Physiol*, *59*, 601-619.
- Bourque, C., Oliet, S. R., & Richard, D. (1994). Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendoc*, *15*, 231-274.
- Briley, E.M., Lolait, S.J., Axelrod, J., & Felder, C.C. (1994). The cloned vasopressin V 1a receptor stimulate phospholipase A 2, phospholipase C and phospholipase D through activation of receptor- operated calcium channels. *Neuropeptides*, *27*, 63-74.

- Buijs, R.M., Van Vulpén, E.H.S., & Geffard, M. (1987). Ultrastructural localization of GABA in the supraoptic nucleus and neural lobe. *Neuroscience*, *20*, 347-355.
- Burbach, J. P., Luckman, S. M., Murphy, D., & Ganer, H. (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. (J. P. Burbach, S. M. Luckman, D. Murphy, & H. Gainer, Éds.) *Physiol Rev*, *81*, 1197-1267.
- Castel, M., & Hochman, J. (1976). Ultrastructural immunohistochemical localization of vasopressin in the hypothalamo-neurohypophysial system of three murids. *Cell and tissue research*, *174*, 69-81.
- Chamberlain, J. (1999). The dynamics of dystroglycan. *Nat Genet*, *23*, 256-259.
- Cho, S. J., Sattar, A. K., Jeong, E. H., Satchi, M., Cho, J. A., Dash, S., et al. (2002). Aquaporin1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. *Prog Natl Acad Sci*, *99*, 4720-4724.
- Chou, C.L., Digiovanni, S.R., Luther, A., Lolait, S.J & Knepper, M.A. (1995). Oxytocin as an antidiuretic hormone. II. Role of V2 vasopressin receptor. *Am J Physiol*, *269*, F78-F85.
- Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., & Kofuji, P. (2004). The potassium channel Kir4-1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via syntrophin in glia. (N. Connors, M. E. Adams, S. C. Froehner, & P. Kofuji, Éds.) *J Bio Chem*, *279*, 28387-28392.
- Conrad, K. P., Gellai, M., North, W. G., & Valtin, H. (1986). Influence of oxytocin on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. *Am J Physiol*, *251*, F290-F296.
- Culligan, K., & Ohlendieck, K. (2002). Diversity of the brain dystrophin-glycoprotein complex. *J Biomed Biotechnol*, *2*, 31-36.
- Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaff, D., Bordais, A., Pannicke, T., et al. (2003). Target inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet*, *13*, 1543-1554.
- Daniels, D., & Fluharty, S. J. (2004). Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiol Behav*, *81*, 319-337.
- Day, T.A., & Sibbald, J.R. (1988). Direct catecholaminergic projection from nucleus tractus solitarius to supraoptic nucleus. *Brain Res*, *454*, 387-392.
- Deleuze, C., Duvoid, A., & Hussy, N. (1998). Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol*, *507*, 463-471.

- Dibartola, S.P.(2000). Fluid therapy in Small Animal Practice 2nd ed, Ed Saunders. W.B, Philadelphia, 611p.
- Dorbani-Mamine, L., Stoeckel, M. E., Jancsik, V., Ayad, G., & Rendon, A. (1998). Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats: immunolocalization and biochemical characterization. *NeuroReport* , 9, 3583-3587.
- Dunn, F.L., Brennan, T.J., Nelson, A. E. & Robertson, G.L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulation vasopressin secretion in the rat, *J Clin Invest*, 52, 3212-3219.
- Du Vigneaud, V., Lawler, H.C., & Popenoe, E.A. (1953). Enzymatic cleavage of glucinamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic of the posterior pituitary. *J Amer Chem Soc*, 75, 48-80.
- Dyball, R. F., & Kemplay, S. K. (1982). Dendritic trees of neurones in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* , 7, 223-230.
- El-Madjoubi, M., Poulain, D. A., & Theodosis, D. T. (1996). The glutamatergic innervation of oxytocin and vasopressin secreting neurons in the rat supraoptic nucleus and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* , 8, 1377-1389.
- El-Madjoubi, M., Poulain, D. A., & Theodosis, D. T. (1997). Lactation induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic GABAergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. *Neuroscience* , 80, 1137-1147.
- Engelmann, M., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2004). The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Frontiers in neuroendocrinology*, 25, 132-149.
- Faubel, S., Topf, J.(1999). The fluid electrolyte and acid-base companion. Ed alert and oriented Publishing Co, San Diego. 163p
- Faul, C.M., Charlton, J.A Butler, T.J., & Baylis, P.H. (1993). The effect of acute pharmacological manipulation of central serotonin neurotransmission on osmoregulated secretion of arginine vasopressin in the rat. *J Neuroendocrinol*, 139, 77-87.
- Fenton, R. A., & Moeller, H. B. (2008). Recent discoveries in vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Progress in brain research* , 170, 571-579.

- Fenton, R. A., & Moeller, H. B. (2008). Recent discoveries in vasopressin-regulated aquaporin-2 trafficking. *Progress in Brain Research* , 170, 571-579.
- Frigeri, A., Gropper, M. A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., & Verkman, A. S. (1995). Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *Journal of Cell Science* , 108, 2993-3002.
- Frigeri, A., Gropper, M. A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., & Verkman, A. S. (1995b). Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *Journal of Cell Science* , 108, 2993-3002.
- Frigeri, A., Nicchia, G.P., Verbavatz, J.M., Valenti, G., & Svelto, M. (1998). Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle. *J Clin Invest*, 102, 695-703.
- Frigeri, A., Nicchia, G. P., Nico, B., Quondomatteo, F., Herren, R., Roncli, L., et al. (2001). Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB* , 15, 90-98.
- Furman, C.S., Gorelik-Feldman, D.A., Davidson, K.G.V., Yasumura, T., Neely, J.D., Agre, P., & Rash, J.E. (2003). Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *PNAS*, 100 (23), 13609-13614
- Gainer, H., and Wray, S. (1994). Cellular and molecular biology of oxytocin and vasopressin. In *Physiology of reproduction*, Eds Knobil, E., & Neil, J.D., New York : Raven, 1099-1129.
- Garten, L.L., Sofroniew, M.V., & Dyball, R.E. (1989). A direct catecholaminergic projection from the brainstem to the neurohypophysis of the rat. *Neuroscience*, 33, 149-155.
- Gies, U., & Theodosis, D.T. (1994). Synaptic plasticity in the rat supraoptic nucleus during lactation involves GABA innervation and oxytocin neurons : a quantitative immunocytochemical analysis. *J Neurosci*, 14, 2861-2869.
- Gorecki, D.C., Abdulrazzak, H., Lukasiuk, K., & Barnard, E.A. (1997). Differential expression of syntrophins and analysis of alternatively spliced dystrophin transcripts in the mouse brain. *Eur J Neurosci*, 9, 965-976.
- Goy-Thollot, I., Pouzot, C., Chambon, M., & Bonnet, J. M. (2005). Régulation de la natrémie et déséquilibres hydrosodés chez le chien et le chat en soins intensifs. *revue Méd. Vét* , 156 (11), 556-568.

- Guadagno, E., & Moukhles, H. (2004). Laminin- induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, KIR4, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* , 47, 138-149.
- Guyton, A.C., Hall, E.J. (2000). Textbook of medical physiology 10 th Ed. Ed Saunders. W. B. Philadelphia.1064p.
- Haas, H.L., & Reiner, P.B. (1988). Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro. *J Physiol, Lond*, 399, 633- 646
- Haenggi, T., Soontornmalai, A., Schaub, M.C., & Fritschy, J. M.(2004). The role utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of he brain. *Neuroscience*, 129, 403-413.
- Haenggi, T., & Fritschy, J. M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non muscle tissue. *Cell Mol Life Sci* , 63, 1614-1631.
- Hasegawa, H., Ma, T. S., Skach, W., Matthay, M. A., & Verkman, A. (1994). Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* , 269, 5497-5500.
- Hatton, G. (1988). Pituicytes, glia and control of terminal secretion. *J Exp Biol* , 139, 67-79.
- Hatton, G. I. (1990). Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol* , 34, 437-504.
- Hatton, G.I., Bicknell, R.J.,Hoyland, J., Bunting, R., & Mason, W.T. (1992). Arginine vasopressin mobilises intracellular calcium via V1-receptor activation in astrocytes (pituicytes) cultured from adult rat neural lobes. *Brain Res*, 588, 75-83.
- Hatton, G. I. (1997). Function- related plasticity in the hypothalamus. *Annu Rev Neurosci* , 20, 375-397.
- Hatton, G. I. (1999). Astroglial modulation of neurotransmitter/peptide release from the neurohypophysis: Present status. *J Chem Neuroanat* , 16, 203-221.
- Hatton, G. I. (2002). Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. *Advances in physiology education* , 26 (4), 225- 237.
- Hatton, G. I., & Li, Z. H. (s.d.). 1998. Neurophysiology of magnocellular neuroendocrine cells: recent advances. *Prog Brain Res* 119:77-99.

- Hatton, G. I., Bicknell, R. J., Hoyland, J., Bunting, R., & Mason, W. T. (1992). Arginine vasopressin mobilizes intracellular calcium via V1-receptor activation in astrocytes (pituicytes) cultured from adult rat neural lobes. *Brain Res* , 14, 75-83.
- Hatton, G. I., Cobett, P., & Salm, A. K. (1985). Extranuclear axon collaterals of paraventricular neurons in the hypothalamus intracellular staining immunocytochemistry and electron physiology. *Brain Res Bull* , 14, 123-132.
- Hatton, G. I., Luckman, S. M., & Bicknell, R. J. (1991). Adrenalin activation of B2-adrenoreceptors stimulates morphological changes in astrocytes (pituicytes) cultured from adult rat neurohypophyses. *Brain Research Bull* , 26, 765-769.
- Herman, J., & Cullinan, W. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neuroscience* , 20, 78-84.
- Hirsch, A.T., Majzoub, J.A., Ren, C.I, Scales, K.M., & Creager, M.A. (1993). Contribution of vasopressin to blood pressure regulation during hypovolemic hypotension in human. *J Appl Physiol*, 75, 1984-1988.
- Honda, K., Negoro, H., Dyball, R. J., Higuchi, T., & Takano, S. (1990). The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between the supraoptic and the other diencephalic nuclei. *J Physiol.* , 431, 225-241.
- Honda, K. (2003). Mechanisms controlling neurohypophysial hormone release in the rat. *J.Reprod.Dev.* , 49, 1-11.
- Hussy, N., Deleuze, C., Desarmenien, M. G., & Moos, F. C. (2000). Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol.* , 62, 113-134.
- Hussy, N. (2002). Glial cells in the hypothalamo-neurohypophysial system: Key elements of the regulation of neuronal electrical and secretory activity. *Prog Brain Res* , 139, 95-112.
- Hussy, N., Bres, V., Rochette, M., Duvoid, A., Alonso, G., Dayanithi, G., et al. (2001). Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophysial nerve terminals glycine receptors by glial taurine. *J Neurosci* , 15, 7110-7116.
- Inoue, M., Wakayama, Y., Liu, J. W., Murahashi, M., Shibuya, S., & Oniki, H. (2002). Ultrastructural localization of aquaporin 4 and alpha1-syntrophin in the vascular feet of brain astrocytes. *Tohoku J Exp Med* , 197, 87-93.

- Jancsik, V., & Hajos, F.(1999). The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Research*, 831, 200-205.
- Jeremic, A., Cho, W. J., & Jena, B. P. (2005). Involvement of waater channels in synaptic vesicle swelling. *Exp Biol Med* , 230, 674-680.
- Jung, D., Filliol, D., Metz-boutique, M. H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin protein 71 (Dp71) from the brain. *Neuromus Disord* , 3, 515-518.
- Jung, J. S., Bhat, R. V., Preston, G. M., Guggino, W. B., Baraban, J. M., & Agre, P. (1994). Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain candidate osmoreceptor and regulator of water balance. . *Proc Natl Acad Sci* , 91, 13052-13056.
- Kakiya, S., Arima, H., Yokoi, H., Murase, T., Yambe, Y., & Oiso, Y. (2000). Effects of acute hypotensive stimuli on arginine gene transcription in the rat hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , 279, E886-E892.
- Kamakura, K., Tadano, Y., Kawai, M., Ishiura, S., Nakamura, R., Miyamoto, K., et al. (1994). Dystrophin related protein is found in the central nervous system of mice at various developmental stages, especially at the post-synaptic membrane. *J Neurosc Res* , 37, 728-734.
- Kent, C., & Williams, M. A. (1974). The nature of hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretion in the rat: A study by light and electron microscope autoradiography. *The Journal of cell biology* , 60, 554-570.
- Khurana, T.S., Hoffman, E.P., & Kunkel, L.M. (1990). Identification of a chromosome 6- encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem*, 265, 16717-16720.
- Khurana, T. S., Watkins, S. C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, F. M., Fardeau, M., et al. (1991). Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeltal muscle. *Neuromuscul Disorder* , 119, 185-194.
- Khurana, T.S., Watkins, S.C., & Kunkel, L.M. (1992). The subcellular distribution of chromosome 6- encoded dystrophin-related protein in the brain. *J Cell Biol*, 119, 357-366.
- Knuesel, L., Bornhauser, B. C., Zuellig, R. A., Heller, F., Schaub, M. C., & Fritschy, J. M. (2000). Differential expression of dystrophin and utrophin in CNS neurons an in situ hybridization and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* , 422, 594-611.

- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129 (4), 1043-1054.
- Kondo, N., Arima, H., Banno, R., Kuwahara, S., Sato, I., & Oiso, Y. (2004). Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E337-E346.
- Krsulovic, J., & Bruckner, G. (1969). Morphological characteristics of pituicytes in different functional stages. Light and electron microscopy of the neurohypophysis of the albino rat. *Zellforsch mikrosk Anat*, 99, 210-220.
- Kuwahara, S., Maeda, S., Ardiles, Y., Jun, J., Naka, K., Hayakawa, T., et al. (2010). Immunohistochemical localization of aquaporin-4 in the rat pituitary gland. *Endocrinol. Jpn*, 24, 301-305.
- Kuwahara, S., Maeda, S., Tanaka, K., Hayakawa, T., & Seki, M. (2007). Expression of aquaporin water channels in the rat pituitary gland. *J Vet Med Sci*, 69 (11), 1175-1178.
- Lafarga, M., Berciano, M.T., De Olmo, E., Andres, M.A., & Pazos, A. (1992). Osmotic stimulation induces changes in the expression of β adrenergic receptor and nuclear volume of astrocytes in supraoptic nucleus of de rat. *Brain Res*, 588, 311-316.
- Landry, M., Roche, D., Angelova, E., & Calas, A. (1997). Expression of galanin in hypothalamic magnocellular neurones of lactating rats : Co-existence with vasopressin and oxytocin. *J Endocrinol*, 155, 467- 481.
- Langle, S.L., Poulain, D.A., & Theodosis, D.T. (2003). Induction of rapid, activity-dependent neuronal-glia remodeling in the adult rat hypothalamus in vitro. *Eur J Neurosci*, 18, 206-214.
- Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., et al. (1992). A 71 kDa protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other non muscle tissues. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 5346-5350.
- Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., & Brownstein, M.J. (1995). Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann NY Acad Sci*, 771, 273-292.
- Loufrani, L., Matrougui, K., Gorny, D., Duriez, M., Blanc, I., Levy, B.I., & Henrion, D. (2001). Flow (shear stress)- induced endothelium- dependent dilatation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. *Circulation*, 103, 864-870.

- Lu, M., Lee, M.D., Smith, B.L., Jung, G.S., Agre, P., Verdijk, M.A.J, Merks, G., Rijss, J.P.L., & Deen, P.M.T. (1996). The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, *93*, 10908-10912.
- Luckman, S. M., & Bicknell, R. J. (1990). Morphological plasticity that occurs in the neurohypophysis following activation of the magnocellular neurosecretory system can be mimicked in vitro by beta-adrenergic stimulation. *Neuroscience* , *39*, 701-709.
- Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J., & Verkman, A. S. (1997). Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *American Society for clinical investigation* , *100*, 957-962.
- Matsuki, M., Hashimoto, S., Shimono, M., Murakami, M., Fujita-Yoshigaki, J., & Furuyama, S. (2005). Involvement of aquaporin-5 water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. *J Membr Biol* , *203*, 119-126.
- Matsunaga, W., Miyata, S., & Kiyohara, T. (1999a). Redistribution of MAP2 immunoreactivity in the neurohypophysial astrocytes of adult rats during dehydration. *Brain Research* , *820*, 7-17.
- Matsunaga, W., Miyata, S., Hashimoto, Y., Lin, S. H., Nakashima, T. & Kiyohara, T. (1999b). Microtubule-associated protein2 (MAP2) in hypothalamo-neurohypophysial system: low molecular weight MAP2 in pituitary astrocytes. *Neuroscience* , *88*, 1429-1437.
- Mesbah-Benmessaoud, O., Benabdesselam, R., Hardin-Pouzet, H., Dorbani-Mamine, L. & Grange-Messent, V. (2011). Cellular and subcellular aquaporin-4 distribution in the mouse neurohypophysis and the effects of osmotic stimulation. *J Histochem Cytochem*, *59* (1):88-97
- Michaloudi, H. C., El-Madjoubi, M., Poulain D, A., Papadopoulos, G. C., & Theodosis, D. T. (1997). The noradrenergic innervation of identified hypothalamic magnocellular somata and its contribution to lactation-induced synaptic plasticity. *J Neuroendocrinology* , *9*, 17-23.
- Mikkelsen, J.D., Jensen, J.B., Engelbrecht, T., & Mork, A. (1999). D-fenfluramine activates rat oxytocinergic and vasopressinergic neurons through different mechanisms, *Brain Res*, *851*, 247-251.

- Miyata, S., Matsushima, O., & Hatton, G. I. (1997). Taurine in rat posterior pituitary: Localization in astrocytes and selective release by hypoosmotic stimulation. *J Comp Neurol*, *19*, 513-523.
- Miyata, S., Furuya, K., Nakai, S., Bun, H., & Kiyohara, T. (1999). Morphological plasticity and rearrangement of cytoskeletons in pituicytes cultured from adult rat neurohypophysis. *Neurosci Res*, *33*, 299-306.
- Miyata, S., Takamatsu, H., Maekawa, S., Matsumoto, N., Watanabe, K., Kiyohara, T., & Hatton, G.I. (2001). Plasticity of neurohypophysial terminals with increased hormonal release during dehydration: ultrastructural and biochemical analyses. *J Comparative Neurology*, *434*, 413-427.
- Monlezun, S., Ouali, S., Poulain, D.A. & Theodosis, D.T. (2005). Polysialic acid is required for active phases of morphological plasticity of neurosecretory axons and their glia. *Molecular and Cellular Neuroscience (MCN)*, *29*, 516-524.
- Montagnese, C., Poulain, D.A., & Theodosis, D.T. (1990). Influence of ovarian steroids on the ultrastructural plasticity of the adult supraoptic nucleus induced by central administration of oxytocin. *J Endocrinol*, *2*, 225-231.
- Montagnese, C., Poulain, D.A., Vincent, J.D., & Theodosis, D.T. (1988). Synaptic and neuronal-glia plasticity in the adult oxytocinergic in response to physiological stimuli. *Brain Res Bull*, *20*, 681-692.
- Morris, J.F. (1976) (a). Hormone storage in individual neurosecretory granules of the pituitary gland : A quantitative ultrastructural approach to hormone storage in the neural lobe. *J Endocrinol*, *68*, 209-224.
- Morris, J.F., Nordmann, J.J., & Dyball, R.E.J. (1978). Structure-function correlation in mammalian neurosecretion. *Int Rev Exp Path*, *18*, 1-95.
- Morris, J. F., Chapman, D. B., & Sokol, H. W. (1987). Anatomy and function of the classic vasopressin-secreting hypothalamus-neurohypophysial system. In: Vasopressin, principles and properties., edited by Gash DM and Boer GJ: London: plenum , 1-89.
- Morris, J.F., Pow, D., & Shaw, F. (1988). Release of neuropeptides from magnocellular neurones : Does anatomical compartmentation have a functional significance ? In : *Neurosecretion*, 113-122. Eds. Pickering, B. T., Wakerley, J.B., & Summerlee, A.J.S. Plenum Press, New York.
- Nagasawa, J., Douglas, W. W., & Schulz, R. A. (1971). Micropinocytotic origin of coated and smooth microvesicles ("synaptic vesicles") in neurosecretory terminals of

neurohypophysis glands demonstrated by incorporation of horseradish peroxidase. *Nature* , 232, 341-342.

- Nagelhus, E. A., Veruki, R. T., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., & Agre, P. (1998). . Aquaporin-4 water channel protein in rat retina and optic nerve: Polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* , 18, 2506-2519.
- Nagelhus, E. A., Horio Y, Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., et al. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* , 26, 47-54.
- Nagelhus, E. A., Mathiesen, T. M., & Ottersen, O. P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* , 129 (4), 905-913.
- Navone, F., Di Gioia, G., Jahn, R., Browning, M., Greengard, P., & De Camilli, P. (1989). Microvesicles of the neurohypophysis are biochemically related to small synaptic vesicles of presynaptic nerve terminals. *J Cell Biol* , 109, 3425-3433.
- Neely, J.D., Christensen, B.M., Nielsen, S., Agre, P. (1999). Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 38, 11156-11163.
- Neely, J. D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P., & Adams, M. E. (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* , 98, 14108-14113.
- Nicchia, G. P., Frigeri, A., Liuzzi, G. M., & Svelto, M. (2003). Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth and water transport and induces changes in ischemia-related genes, *FASEB JOURNAL*, 1508-1515.
- Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G. P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondomatteo, F. (2003). Severe alterations of endothelial and glial in the blood-brain -barrier of dystrophic md mice. *GLIA* , 42, 235-251.
- Nielsen, S., Agre, P. (1995). The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int*, 48, 1057-1068.
- Nielsen, S., Chou, C.L., Marples, D., Christensen, E. I, Kishore, B.K., & Knepper, M.A. (1995). Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by

inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 1013-1017.

- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., & Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17 (1), 171-180.
- Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T.H., Agre, P., & Knepper, M.a. (2002). Aquaporines in the kidney from molecules to medicine. *Physiol Rev*, 82, 205-244.
- Niermann, H., Amiry-Moghaddam, M., Holthoff, K., Witte, O. W., & Ottersen, O. P. (2001). A novel role of vasopressin in the brain: Modulation of activity-dependent water flux in the neocortex. *J Neurosci*, 21 (9), 3045-3051.
- Nordmann, J.J., & Morris, J.F. (1976). Membrane retrieval at neurosecretory axon endings. *Nature*, 261, 723-725.
- Nordmann, J. J. (1977). Ultrastructural morphometry of the rat neurohypophysis. *J Anat*, 123, 213-218.
- Nordmann, J.J.(1983). Stimulus-secretion coupling. *Progr Brain Res*, 60, 281-303.
- Nothias, F., Sicher, I., Murray, M., Mirman, S., & Vincent, J.D. (1996). Expression of phosphorylated isoforms of AP1B is maintained in the adult CNS areas that retain capacity for structural plasticity. *J Comp Neurol*, 368, 317-334.
- Nothias, F., Vernier, P., Von Boxberg, Y., Mirman, S., & Vincent, J.D. (1997). Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo-neurohypophysial system during lactation. *Eur J Neurosci*, 9, 1553-1565.
- Oliet, S. H., Piet, R., & Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science*, 923-926.
- Oliet, S. H., & Piet, R. (2004). Anatomical remodelling of the supraoptic nucleus: changes in synaptic and extrasynaptic transmission. *Journal of Neuroendocrinology*, 16 (4), 303-307.
- Peters, N.F., Sadoulet-Puccio, H.M., Kramarcy, N.R., Kunkel, N.M., Sanes, J.R., Sealock, R., & Froehner, S.C.(1998). Differential membrane localization and intermolecular association of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol*, 142, 1269-1278.

- Piet, R., Poulain, D.A., & Oliet, S.H.R. (2004). Contribution of astrocytes to synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus. *Neurochem Int*, 45, 251, 257.
- Pirnik, Z., & Kiss, A. (2005). Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull*, 65, 423-431.
- Pocsai, K., Bagyura, Z., & Kalman, M. (2010). Dystrophin-dystroglycan complex in hypophysis. *Journal of histochemistry cytochemistry*, DOI:10.1369/jhc.2010.954768.
- Pow, D.V., & Morris, J.F. (1989). Dendrites of hypothalamic magnocellular neurones release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience*, 32, 435-439.
- Pow, D. V. (1993). Immunocytochemistry of amino-acids in the rodent pituitary using extremely specific, very high titre antisera. *J Neuroendocrinol*, 5, 349-356.
- Preston GM, C. T. (1992). Appearance of water channels in xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, pp. 385-387.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., & Agre, P. (1992). Appearance of water channels in oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256, 385-387.
- Raff, H. (1993). Interaction between neurohypophysial hormones and the ACTH adrenocortical axis. *Ann NY Acad Sci*, 689, 411-425.
- Ramsell, K., & Cobbett, P. (1997). Serum uncouples elevation of cyclic adenosine monophosphate concentration from cyclic adenosine monophosphate dependent morphological changes exhibited by cultured pituitary cells. *Neurosci Lett*, 226, 41-44.
- Rash, J. E., Yasumura, T., Hudson, C. D., Agre, P., & Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11981-11986.
- Redecker, P., Wittkiowski, W., & Hoffmann, K. (1987). Glial cells positive for glial fibrillary acidic protein in the neurohypophysis of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Cell Tissue Res*, 249, 465-471
- Rhodes, C.H., Morrell, J.I., & Pfaff, D.W. (1981). Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J Comp Neurol*, 198, 45-64.
- Roberts, R.G., Freeman, T.C., Kendall, E., Vetrie, D.L., Dixon, A.K., Shaw-Smith, C., Bone, Q., & Bobrow, M. (1996). Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet*, 13, 223-226.

- Robertson, G. I. (1995). Posterior pituitary. (McGraw-HILL, Ed.) *In: Felig P, Baxter JD, Frohman LA, eds, Endocrinology and Metabolism* , 385-432.
- Robertson, G. L., & Berl, T. (1996). Pathophysiology of water metabolism. (B. B. FC, Éd.) *In: The kidney: Disturbances in control of body fluid volume and composition* , 873-928.
- Rosso, L., Peteri-Brunback, B., Vouret-Craviari, V., Deroanne, C., Van Obberghen-Shilling, E., & Mienville, J.M. (2002). Vasopressin and oxytocin reverse adenosine-induced pituicyte stellation via calcium-dependent activation of Cdc42. *Eur J Neurosci*, *16*, 2324-2332.
- Rosso, L., Peteri-Brunback, B., Poujeol, P., Hussy, N., & Mienville, J.-M. (2004a). Vasopressin-induced taurine efflux from rat pituicytes: A potential negative feedback for hormone secretion. *J Physiol* , *554*, 731-742.
- Rosso, L., & Mienville, J. M. (2009). Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia* , *57*, 235-243.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., & Krishna, S. (2003). Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review. *Journal of Clinical Pathology* , *56*, 972-975.
- Saito, N., Ikegami, H., & Shimada, K. (2005). Effect of water deprivation on AQP 4 (AQP4) mRNA expression in chickens (*Gallus domesticus*). *Molecular Brain Research* , *141*, 193-197.
- Salm, A.K. (2000). Mechanisms of glial retraction in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Exp Physiol*, *85*, 197-202.
- Sarfaraz, D., & Frazer, C. L. (1999). Effects of arginine vasopressin on cell volume regulation in brain astrocyte in culture. *Am J Physiol* , *276*, E596-E601.
- Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Steinbusch, H. W., & Verhoshad, A. A. (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat . *Brain Research* , *277*, 355-360.
- Scharrer, E., & Scharrer, B. (1937). Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. *Bio Re*, *12*, 185, 216.
- Scharrer, E., & Scharrer, B. (1940). Secretory cells within the hypothalamus. In: the hypothalamus and central levels of autonomic function. William and Wilkins Ed, Baltimore, 170-194.

- Schofield, J.N., Blake, D.J., Simmons, C., Morris, G.E., Tinsley, Y., J.M., Davies, K.E., & Edwards, Y.H. (1994). Apo-dystrophin-1 and Apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and cultured cell lines. *Hum Mol Genet*, 3, 1309-1316.
- Schrier, R.W., Chen, Y.C., & Cadnapaphornchai, M.A. (2004). From finch to fish to man: role of aquaporins in body fluid and brain water regulation. *Neuroscience*, 129, 897-904.
- Sene, A., Tadayoni, R., Pannicke, T., Wurme, A., El Mathari, B., Bernard, R., Roux, M.J., Yaffe, D., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J.A., & Rendon, A. (2009). Functional implication of Dp71 osmoregulation and vascular permeability of the retina, *PloSone*, 4 (10), 1-10.
- Sharif-Naeimi, R., Ciura, S., Stachniak, T.J., Trudel, E., & Bourque, C.W. (2008). Neurophysiology of supraoptic neurons in C57/BL mice studied in three acute *in vitro* preparations. *Prog Brain Res*, 170, 6079-6123.
- Shen, J., Larm, J.A., & Gundlach, A.L. (2001). Galanin-like peptide mRNA in neural lobe of rat pituitary. Increased expression after osmotic stimulation suggests a role for galanin-like peptide in neuron-glia interactions and/ or neurosecretion. *Neuroendocrinology*, 73 (1), 2-11.
- Sofroniew, M.W., Glasmann, W. (1981). Golgi-like immunoperoxidase staining of hypothalamic magnocellular neurons that contain vasopressin, oxytocin or neurophysine in the rat. *Neuroscience*, 6, 619-643.
- Sofroniew, M.W. (1983). Morphology of vasopressin and oxytocin neurons and their central and vascular projections. *Prog Brain Res*, 60, 101-114.
- Stoeckel, M. E., Porte, A., Klein, M. J., & Cuello, A. C. (1982). Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse compared with the distribution of other neuropeptides. *Cell and Tissue Research*, 223, 533-544.
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, J., & Sudhof, T.C. (2001). A stoichiometric complex of neuroxins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, 154, 435-445.
- Swaab, D.R., Nijveldt, F., & Pool, L.W. (1975). Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J Endocrinol*, 67, 461-462.
- Swanson, L.W., & Sawchenko, P.E. (1983). Hypothalamic integration : Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann Rev Neurosci*, 6, 269-324.

- Szabo, A., Jancsik, V., Mornet, D., & Kalman, M. (2004). Immunofluorescence mapping of dystrophin in the rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f, but this is confined to subpopulation. *Anat Embryol*, 208, 463-477.
- Takata, K., Matsusaki, T., & Tajika, Y. (2004). Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 39, 1-83.
- Takato, J., Kudoh, H., Kondo, S., & Hanaoka, K. (2008). Loss of short dystrophin isoform Dp71 in olfactory ensheathing cells causes vomeronasal nerve defasciculation in mouse olfactory system. *Exp Neur*, 213, 36-47.
- Theodosis, D. T., Poulain, D. A., & Vincent, J.D. (1981). Possible morphological bases for synchronisation of neuronal firing in the rat supraoptic nucleus during lactation. *Neuroscience*, 6, 919-929.
- Theodosis, D.T., & Poulain, D.A. (1984). Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. *Neuroscience*, 11, 183-193.
- Theodosis, D. T. (1985). Oxytocin-immunoreactive terminals synapse on oxytocin neurones in the supraoptic nucleus. *Nature*, 313, 682-684.
- Theodosis, D.T., Chapman, D.B., Montagnese, C., Poulain, D.A., & Morris, J.F. (1986). Structural plasticity in the hypothalamic supraoptic nucleus at lactation affects oxytocin, but not vasopressin-secreting neurones. *Neuroscience*, 17, 661-678.
- Theodosis, D.T., Rougon, G., & Poulain, D.A. (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 88, 5494-5498.
- Theodosis, D. T., & Poulain, D. A. (1993). Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience*, 57, 501-535.
- Theodosis, D.T., El Majdoubi, M., Gies, U., & Poulain, D.A. (1995). Physiological-linked structural plasticity of inhibitory and excitatory synaptic inputs to oxytocin neurons. *Adv Exp Med Biol*, 395, 155-171.
- Theodosis, D. T., & MacVica, B. (1996). Neurone-glia interactions in the hypothalamus and pituitary. *Trends Neurosci*, 19, 363-367.

- Theodosios, D.T., Pierre, K., Cadoret, M.A., Allard, M., Faissner, A., & Poulain, D.A. (1997). Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamo-neurohypophysial system. *J Comp Neurol*, 379, 386-398.
- Theodosios, D.T., El Majdoubi, M., Pierre, K., & Poulain, D.A. (1998). Factors governing activity-dependant structural plasticity of the hypothalamo-neurohypophysial system. *Cell Mol Neurobiol*, 18, 285-298.
- Theodosios, D.T., Trailin, A., & Poulain, D.A. (2006). Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R1175-1182.
- Tsushima, H., Mori, M., & Matsuda, T. (1993). Microinjection of dynorphin into the supraoptic and paraventricular nuclei produces antidiuretic effects through vasopressin release. *Japan J Pharmacol*, 63, 461-468.
- Turtzo, L.C., Lee, M.D., Lu, M., Smith, B.L., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., & Agre, P. (1997). *Genomics*, 41, 267-270.
- Tweedle, C. D., & Hatton, G. I. (1980). Evidence for dynamic interactions between pituicytes and neurosecretory axons in the rat. *Neuroscience*, 5, 661-671.
- Tweedle, C. D. (1983). Ultrastructural manifestations of increased hormone release in the neurohypophysis. *Prog Brain Res*, 60, 259-272.
- Tweedle, C. D., & Hatton, G. I. (1987). Morphological adaptability at neurosecretory axonal endings on the neurovascular contact zone of the rat neurohypophysis. *Neuroscience*, 20, 241-246.
- Tweedle, C.D., & Hatton, G.I. (1987). Synapse formation and disappearance in adult rat supraoptic nucleus during different hydration states. *Brain Res*, 309, 373-376.
- Vajda, Z., Pedersen, M., Fuchtbauer, E. M., Wertz, K., Stodkilde-Jorgensen, H., Sulyok, E., et al. (2002). Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Medical Sciences*, 99, 13131-13136.
- Van Leeuwen, F. W., & Swaab, D. F. (1977). Specific immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin and oxytocin in the neurohypophysis of the rat. *Cell tissue research*, 177, 493-501.
- Van Leeuwen, F. W., de Raay, C., Swaab, D. F., & Fisser, B. (1979). The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat neurohypophysis. *Cell and Tissue Research*, 202, 189-201.

- Van Leuwen, F.W., Poll, C.W., & Sluiter, A.A. (1983). Enkephalin immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the rat neural lobe. *Neuroscience*, 8, 229-241.
- Vandesande, F., Dierickx, K., & De Mey, J. (1975). Identification of the vasopressin-neurophysin II and the oxytocin-neurophysin I producing neurons in the bovine hypothalamus. *Cell Tiss Res*, 156, 189-200.
- Vasquez, R., Carretero, E., Blanco, E., & Carvajal, J. C. (1987). Morphology of the neural lobe of the hypophysis in rats treated with furosemide. *Cells Tissues Organs*, 128 (2), 171-176.
- Venero, J., Visuete, M. I., Machado, A., & Cano, J. (2001). Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 63, 321-336.
- Venero, J. L., Vizuette, M. L., Ilundain, A. A., Machado, A., & Cano, J. (1999). Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS. Preferential expression in periventricular organ. *Neuroscience*, 94, 239-250.
- Verbavatz, J. M., Brown, D., Sabolic, I., Valenti, G., Ausiello, D.A., Van Hoek, A.N., Ma, T., & Verkman, A.S. (1993). Tetrameric assembly of CHIP 28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study, *J Cell Biol*, 123, 605-618.
- Verbavatz, J. M., Ma, T., Gobin, R., & Verkman, A. S. (1997). Absence of orthogonal arrays in kidney, brain and muscle from transgenic knockout mice lacking water channel aquaporin-4. *Journal of Cell Science*, 110, 2855-2860.
- Verkman, A. S., & Mitra, A. K. (2000). Structure and function of aquaporin water channel. *Am Physiol Society*, 278, F13- F28.
- Verkman, A. S. (2005). More just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118 (15), 3225-3232.
- Verney, E. B. (1948). The antidiuretic hormones and the factors which determine its release. *Proc Royal Soc.*, 35, 25-106.
- Viero, C., & Dayanithi, G. (2008). Neurosteroids are excitatory in supraoptic neurons but inhibitory in the peripheral nervous system: it is all about oxytocin and progesterone receptors; Paru dans Advances in vasopressin and oxytocin_ from genes to behaviour to disease. *Progressin Brain Research*, 170, 177-192.

- Warth, A., Kroger, S., & Wolburg, H. (2004). Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol* , 107, 311-318.
- Weiss, M.L., Yang, Q.Z. & Hatton, G.I. (1989). Magnocellular tuberomammillary nucleus input to the supraoptic nucleus in the rat : Anatomical and in vitro electrophysiological investigations. *Neuroscience*, 31, 299-311.
- Wells, T. (1998). Vesicular osmometers, vasopressin secretion and aquaporin-4: a new mechanism for osmoreception? *Mol Cell Endocrinol* , 136, 103-107.
- Wen, H., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Pettersen, O. P., & Nielsen, S. (1999). Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci* , 11, 935-945.
- Wittkowski, W., & Brinkmann, H. (1974). Changes of extent of neurovascular contacts and number of neuroglial synaptoid contacts in the pituitary posterior lobe of dehydrated rats. *Anat Embryol (Berl)* , 146, 157-165.
- Wittkowski, W. (1980). Glia der neurohypophyse. In *Handbuch der mikroskopischen anatomie des Menschen*. Ed Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 667-756.
- Wittkowski, W. (1998). Tanicytes and pituicytes: Morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microscopy Research and Technique* , 41, 29-42.
- Wong, J. G., Izutsu, K. T., Robinovitch, M. R., Iversen, J. M., Cantino, M. E., & Johnson, D. E. (1991). Microprobe analysis of maturation -related elemental changes in rat parotid secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol* , 261, C1033-C1041.
- Yamamoto, N., Sobue, K., Miyashi, T., Inagaki, M., Miura, Y., Katsuya, H., & Asai, K. (2001). Differential regulation of aquaporin expression in astrocytes by protein kinase C. *Mol Brain Res*, 95, 110-116.
- Young, W.S., Sheppard, E. De Vries, A.C, Zimmer, A. Lamarca, M.E Ginns, E.I., Amoco, J., Nelson, R.J, Henninghausen, L., & Wagner, K.U. (1998). Targeted reduction of oxytocin expression provides insights into its physiological roles. *Adv Exp Med Biol*, 499, 231-20.
- Zaccaria, M.L., di Tommaso, F., Brancaccio, A., Paggi, P., & Petrucci, T.C. (2001). Dystroglycan distribution in adult mouse brain : a light and electron microscopy study. *Neuroscience*, 104, 311-324.

- Zelena, D., Domokos, A., Jain, S. K., Jankord, R., & Filaretova, L. (2009). The stimulus-specific role of vasopressin in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, response to stress. *Journal of Endocrinology*, *202*, 263-278.
- Zelena, D., Mergi, Z., Foldes, A., Kovacs, K. J., Toth, Z., & Makara, G. B. (2003). Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *285*, E1110-1117.
- Zhang, B. J., Kusano, K., Zerfas, P., Iacangelo, A., Young, W. S., & Gainer, H. (2002). Targeting of green fluorescent protein to secretory granules in oxytocin magnocellular neurons and its secretion from neurohypophysial nerve terminals in transgenic mice. *Endocrinology*, *143*, 1036-1046.

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Mécanismes moléculaires d'adaptation des cellules cérébrales aux variations de l'osmolarité extracellulaire

Figure 2: Facteurs qui influencent la sécrétion de la vasopressine

Figure 3 : Mécanismes de régulation de la volémie

Figure 4 : Localisation du système hypothalamo-neurohypophysaire et organisation anatomo-structurale des neurones magnocellulaires.

Figure 5 : Diagramme de l'organisation cytoarchitecturale des composantes gliale et neuronale, des noyaux supraoptiques, de l'hypothalamus de rat

Figure 6: Organisation des gènes AVP et OT

Figure 7: Rôles de la vasopressine

Figure 8 : Contrôle de l'osmoréception centrale

Figure 9 : Mécanismes moléculaires de l'osmorégulation de la fonction neuroendocrine du système hypothalamo-neurohypophysaire

Figure 10 : Représentation schématique de la plasticité neuro-gliale au niveau des noyaux supraoptiques (NSO)

Figure 11: Mécanismes moléculaires de la plasticité structurale, dans le lobe nerveux hypophysaire: implication des molécules du cytosquelette et d'adhésion cellulaire

Figure 12: Structure moléculaire des aquaporines (AQP)

Figure 13 : représentation schématique de la distribution de l'expression de l'AQP-4, au niveau des astrocytes : prédominance de l'AQP-4 au niveau des pieds astrocytaires perivasculaires et autour de la surface piale.

Figure 14 : Schéma récapitulatif de la distribution de l'AQP-4 dans certaines structures osmosensibles et leur rôle présumé dans l'osmoréception , dans les cellules ependymaires de l'organe subfornical (SFO) et dans les astrocytes des noyaux supraoptiques.

Figure 15 : Mécanismes d'action de la vasopressine sur l'expression de l'AQP-2 au niveau du tube collecteur du rein.

Figure 16: Représentation schématique du complexe des dystrophines et des glycoprotéines associées et de sa relation avec les canaux hydriques (AQP4) et potassiques (Kir-4.1), au niveau de la cellule gliale

Figure 17 : Principe du marquage indirect de la technique d'immunofluorescence

Figure 18 : Distribution des neurones magnocellulaires à ocytocine (OT) et à vasopressine (AVP) dans les noyaux supraoptiques de la souris C57/BL6 et stimulée par une surcharge saline

Figure 19 : Expression de l'ocytocine (OT) et de la vasopressine (AVP) dans les noyaux paraventriculaires (NPV) de l'hypothalamus, chez la souris C57/BL6, normale et stimulée osmotiquement par surcharge saline.

Figure 20 : Distribution de l'ocytocine (OT) de la vasopressine (AVP) dans l'éminence médiane, chez la souris C57/BL6, normale et stimulée osmotiquement (surcharge saline).

Figure 21 : Distribution de l'ocytocine (OT) de la vasopressine (AVP) dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris C57/BL6, normale comparée à la souris stimulée osmotiquement.

Figure 22 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans les noyaux supraoptiques (NSO) de la souris C57/BL6, en conditions normales et de surcharge saline.

Figure 23 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans les noyaux paraventriculaires (NPV), de la souris C57/BL6, en conditions normales et de surcharge saline.

Figure 24 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans l'éminence médiane (EM), au niveau de l'hypothalamus, chez la souris C57/BL6, en conditions normales et de surcharge saline.

Figure 25 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans le lobe nerveux (LN) de l'hypophyse de la souris C57/BL6, avant et après surcharge saline.

Figure 26 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans les noyaux supraoptiques (NSO) chez la souris C57/BL6, avant et après surcharge saline.

Figure 27 : Fort grossissement de la zone somatique des noyaux supra-optiques (NSO), chez la souris C57/BL6, avant et après surcharge saline.

Figure 28 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans les noyaux paraventriculaires (NPV), de la souris C57/BL6, en conditions normales et de surcharge saline.

Figure 29 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans l'éminence médiane (EM), au niveau de l'hypothalamus de la souris C57/BL6, avant et après surcharge saline (SS).

Figure 30 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans le lobe nerveux (LN) de l'hypophyse de la souris C57/BL6, avant et après surcharge saline.(SS).

Figure 31 : Vue d'ensemble du pituicyte et son environnement. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET

Figure 32 : Vue d'ensemble de l'environnement perivasculaire dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris normale et stimulée. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET

Figure 33 : Expression de l'aquaporine-4 (AQP-4) dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris normalement hydratée, comparée à la souris en surcharge saline. Technique d'immunoperoxydase et observation au microscope photonique.

Figure 34 : Expression de l'AQP-4 au niveau du pituicyte et ses contacts avec les fibres des neurones magnocellulaires, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris

Figure 35 : Expression de l'AQP-4 au niveau des prolongements pituicytaires et de leurs contacts avec les fibres des neurones magnocellulaires, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris contrôle. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET.

Figure 36 : Expression de l'AQP-4 dans les fibres des neurones magnocellulaires et au niveau de la membrane du pituicyte, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris en surcharge saline. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET.

Figure 37 : Expression de l'AQP-4 au niveau des expansions des pituicytes et de leurs contacts avec les fibres des neurones magnocellulaires, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris en surcharge saline. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET

Figure 38 : Expression de l'AQP-4, dans l'environnement périvasculaire, du lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris normalement hydratée . Technique d'immunoperoxydase et observation au MET

Figure 39 : Expression de l'AQP-4, au niveau des contacts neuro-gliaux et neurovasculaire, dans l'environnement périvasculaire du lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris contrôle. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET

Figure 40 : Environnement périvasculaire: expression de l'AQP-4 au niveau des terminaisons nerveuses, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris en surcharge saline. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET.

Figure 41 : Environnement périvasculaire: expression de l'AQP-4, dans la membrane des terminaisons nerveuses, dans le lobe nerveux de l'hypophyse, chez la souris en surcharge saline. Technique d'immunoperoxydase et observation au MET.

Figure 42 : Représentation schématique de la distribution des AQP-4 et interactions potentielles avec les membres du complexe des protéines associées aux dystrophines dans le SHNH de la souris.

Tableau 1 : Distribution des AQPs dans le SNC

Tableau 2: Distribution de l'AQP-4 dans différents organes périphériques et sensoriels

Tableau 3: Distribution cellulaire et subcellulaire de l'AQP-4 dans le SNC

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Adenylate Cyclase
AKAPs	Pka-Anchoring Proteins
AQP	Aquaporine
AMPC	Adenosine 3, 5-Cyclic Monophosphate
AVP	Arginine-Vasopressine
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BSA	Bovin Serum Albumin
cAMP	Adenosine Monophosphate Cyclique
CAMs	Cellular Adhesion Molecules
CCK	Cholecystokinin
CO	Chiasma Optique
CSF	Cerebrospinal Fluid
DAPC	Dystrophin Associated Proteins Complex
DA	Dopamine
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
DB	Dystrobrevine
DG	Dystroglycane
DMD	Dystrophie Musculaire De Duchenne
Dp	Dystrophine
DRP	Dystrophin-Related Protein
EE	Early Endosome
EIA	Enzyme Immunoassay

EM	Eminence Médiane
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoresceine Isothiocyanate
GABA	Γ-Aminobutyric Acid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GlyR	Glycine Receptor (Récepteur De La Taurine)
Gs	Gtp-Binding Protein
HIS	Hybridation <i>In-Situ</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
Kir4.1	Canal Potassique
LN	Lobe Nerveux
LI	Lobe Intermédiaire
VGL	Ventral Glial Limitens
MAP	Microtubule-Associated Protein
MEC	Matrice Extracellulaire
MnPo	Median Preoptic Nucleus
MVB	Multivesicular Bodies
NA	Noradrenaline
NH	Neurohypophyse
NMC	Neurone Magnocellulaire
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NO	Nitric Oxide
NP	Neurophysine
NPOM	Noyau Préoptique Médian
NPV	Noyau Paraventriculaire
NSO	Noyau Supraoptique

NT	Neurotransmetteur,
NTS	Noyau Du Tractus Solitaire
SFO	Subfornical Organe
OVL	Organe Vasculaire De La Lame Terminale
P	Phosphorylation
PB	Phosphate Buffer
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PBS	Phosphate Buffer Saline
PGE2	Prostaglandine E2
Pit	Pituitary
PKA	Protéine Kinase A
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PP	Posterior Pituitary
Rab11	Motor Proteins Coupling To Vesicles
SHNH	Système Hypothalamo-Neurohypophysaire
Rho	Small Gtp-Binding Protein
RhoGDI	Rho Inactive Form
SG	Sarcoglycane
SNC	Système Nerveux Central
SP	Surfactant Proteins
SS	Surcharge Saline
SRIF	Somatotropin Release Inhibitory Factor
Syn	Syntrophine
Up	Utrophine
3V	Troisième Ventricule
Vs	Vaisseau
V2R	Vasopressin Receptor 2

5HT

5-Hydroxytryptamine