

N° d'ordre :

**MINISTERE DE L'ENSEGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENE (U.S.T.H.B) ALGER**

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de :

Magister

EN SCIENCE DE LA NATURE

Spécialité : Biologie et physiologie animale

Par

Mme DJAZOULI – ALIM F. zohra

Sujet

**Etude de la co- distribution des Dystrophines et de la
Cavéoline-1 au niveau
de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire
chez le rat Wistar**

Soutenu publiquement le 22/06/2005 devant la commission d'examen composée de :

Mme Y. BENAZZOUG
Mme L. MAMINE -DORBANI
Mr G. AYAD
Mme A. BOUHADEF
Mme S. AOUICHET

Professeur. USTHB
Maître de conférence. USTHB
Professeur. USTHB
Professeur. Hôpital Parnet
Maître de conférence. USTHB

Présidente
Directrice de thèse
Examinateur
Examinatrice
Examinatrice

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

I-Organisation et physiologie du système hypothalamoneurohypophysaire

1- Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire.....	3
1.1- Le noyau supraoptique.....	4
1.2- Le noyau paraventriculaire.....	4
1.3- La neurohypophyse.....	5
1.3.1- L' éminence médiane.....	6
1.3.2- Le lobe nerveux.....	6
1.4- Les afférences des noyaux supraoptiques et paraventriculaires.....	7
2- Les hormones de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire.....	7
2.1- Structure.....	8
2.2- Biosynthèse.....	8
2.3- Transport.....	9
2.3- Maturation.....	9
2.5- Sécrétion.....	10
2.6- Actions de la vasopressine et de l'ocytocine.....	11
2.6.1- Les récepteurs de la VP et de l'OT.....	11
2.6.2- Rôle physiologique de la vasopressine et de l'ocytocine.....	12
2.6.2.1- L'équilibre hydrominéral.....	12
2.6.2.2- La reproduction.....	12
2.6.2.3- La vasoconstriction.....	12
2.6.2.4- La régulation de l'activité corticotrope.....	12

II- Implication du cytosquelette dans le processus sécrétoire peptidergique

1- cytosquelette filamenteux.....	13
1.1- Les microtubules.....	13
1.2- Les filaments intermédiaires	13
1.3- Les microfilaments.....	14
1.3.1- Organisation des microfilaments dans les cellules nerveuses.....	15
2- Le cytosquelette subcortical.....	15
2.1- Cytosquelette de la membrane de l'érythrocyte.....	15
2.2- Cytosquelette de la membrane de la cellule musculaire.....	16
2.3- Cytosquelette de la membrane de la cellule nerveuse.....	17
3- Données générale sur les dystrophines.....	17
3.1- Structure de la DP 427.....	17
3.1.1- Le domaine N-terminal	17
3.1.2- Le domaine centrale	17
3.1.3- Le domaine « riche en cystéine »	18
3.1.4- Le domaine C-terminal.....	18
3.2- Autres produits du gène DMD.....	18
3.3- Distribution des dystrophines au niveau du cerveau	19
3.4- Distribution des dystrophines au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire.....	19

4- Les protéines homologues à la dystrophine : Les Utrophines.....	20
5- Le complexe protéique associé à la dystrophine	20
5.1- Le groupe de dystroglycanes.....	21
5.2- Le groupe de sarcoglycane.....	21
5.3- Les dystrobrevines.....	22
5.4- Les syntrophines	22
6-Cavéolaes et cytosquelette subcortical.....	23
6.1- Définition des caveolaes.....	23
6.2- Les cavéolines marqueurs des cavéolaes.....	23
6.3- Structure des cavéolines.....	24
6.4- Genèse des cavéolaes.....	25
6.4.1- Oligomérisation des cavéolines.....	25
6.4.2- Rôle des cavéolines et du cholestérol dans la genèse des cavéolaes...	25
6.5- Rôles des caveolaes/Cavéolines dans les échanges cellulaire.....	26
6.5.1- L' Endocytose.....	26
6.5.2- La Pinocytose.....	27
6.5.3- La Transcytose.....	27
6.5.4- La Transduction du signal.....	27
7- Relations structurales des cavéolines avec le cytosquelette subcortical	28

MATERIEL ET METHODES

1- Matériel biologique.....	29
2- Etude morphologique.....	29
2.1- Préparation des coupes pour l'immunomarquage.....	29
2.1.1- Anesthésie.....	29
2.1.2- Perfusion	29
2.1.3- Préparation des blocs à la coupe.....	29
2.1.4- Coupes au vibratome.....	30
2.2- Immunohistochimie: Technique immunoperoxydase sur coupes flottantes..	30
2.3- Montage des coupes pour la microscopie photonique.....	31
2.3.1- Préparation des lames gélatinées.....	31
2.3.2- Montage des coupes.....	31
3- Etude biochimique.....	32
3.1- Isolement du matériel biologique.....	32
3.2- Préparation des fractions.....	32
3.3- Dosage des protéines et préparation des échantillons	32
3.4- Séparation des protéines par Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide –SDS.....	33
3.4.1 - Coloration du gel au bleu de Coomassie.....	34
3.5- Analyse qualitative des protéines par « western-blotting ».....	34
3.3.1- Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	34
3.3.2 - Coloration au rouge ponceau	35
3.3.3- Immunoréplique	35
3.3.4- Révélation.....	35
3.6 - Technique du « Ligand-Blotting ».....	36
3.6.1- Mise en évidence de l'interaction	36

RESULTATS

I-Immunoréactivité des cavéolines et des dystrophines dans l'axe hypothalamo -neurohypophysaire observée au microscope photonique

I.1- Au niveau du noyaux supraoptique	37
I.1.1- Immunoréactivité de la dystrophine.....	37
I.1.2- Immunoréactivité de la cavéoline.....	38
I.2- Au niveau du noyau paraventriculaire.....	38
I.2.1- Immunoréactivité de la dystrophine.....	38
I.2.2- Immunoréactivité de la cavéoline.....	39
I.3-Au niveau du lobe nerveux	40
I.3.1- Immunoréactivité de la dystrophine.....	40
I.3.2- Immunoréactivité de la cavéoline.....	40
1.4- Immunomarquage du GFAP des cellules gliales.....	41
1.4.1- Au niveau du noyaux supraoptique.....	41
1.4.2- Au niveau du noyau paraventriculaire.....	41
1.4.3- Au niveau du lobe nerveux.....	42

II-Immuno-détection de la dystrophine et de la cavéoline au niveau des fractions Neurohypophysaires

II.1- Immuno-détection des dystrophines et de la cavéoline-1 par « Western-blotting ».....	42
II.3- Immuno-détection de l'interaction des cavéolines	43

DISCUSSION

I-Distrubution des dystrophines au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire

I.1- Au niveau du noyau supraoptique.....	47
I.2- Au niveau du noyau paraventriculaire.....	48
I.3- Au niveau du lobe nerveux....	49
1.3.1- Dans les pituicytes.....	49
1.3.2- Dans les neurosécrétosomes.....	51
1.3.3- Dans le surnageant S.....	51

II- Distrubution des cavéolines dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire

II.1- Au niveau des noyaux supraoptique et paraventriculaire.....	52
II.2- Au niveau du lobe nerveux.....	53
II.2.1- Dans les pituicytes	54
II.2.2- Dans les neurosécrétosomes et le surnageant (S).....	55

III- Relation des dystrophines et de la cavéoline-1 au niveau du lobe nerveux..

Conclusion et perspectives.....	60
---------------------------------	----

Références bibliographiques	62
Annexes	81
Liste des produits utilisés.....	92

Liste des abréviations

aa	:	acide aminé
AC	:	Anticorps
AEC	:	3-Amine 9- éthyle carbazole
AVP	:	Arginine-Vasopressine
Cav	:	Cavéoline
DAB	:	Diamino-benzidine-tetrachloride
DAPC	:	Dystrophin- Associated- Protein Complex
DMD	:	Duchenne muscular dystrophy
Dp	:	Dystrophine
DsT	:	Dilatations subterminales
EM	:	Eminence médiane
GFAP	:	Glial-fibrillary-acidic protein
IP	:	inhibiteur de protéase
kDa	:	kiloDalton
LN	:	Lobe nerveux
MEC	:	Matrice extracellulaire
NMC	:	Neurones magnocellulaires
NPs	:	Neurophysines
NPV	:	Noyau paraventriculaire
NSO	:	Noyau supraoptique

OT	:	Ocytocine
P	:	Phosphate
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	:	Phosphate Buffered Saline-Tween
PM	:	Poids moléculaire
SHN	:	Système hypothalamo-neurohypophysaire
SNC	:	Système nerveux central
Tp	:	Tampon
TN	:	Terminaisons nerveuses
3V	:	Troisième ventricule
V	:	Volume

INTRODUCTION

**RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES**

**MATERIELS
ET
METHODES**

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

RESULTATS

DISCUSSION

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

ANNEXES

I. Organisation et physiologie du système hypothalamo–neurohypophysaire

Le système hypothalamo-neurohypophysaire (SHN) est constitué de neurones magnocellulaires (NMC) neurosécrétoires (Scharrer et Scharrer, 1940), ayant leurs péricaryons logés dans les noyaux supraoptiques (NSO) et paraventriculaires (NPV) hypothalamiques et leurs terminaisons axoniques dans le lobe nerveux (LN) de l'hypophyse (figure1).

Les fibres principales dérivant du NPV se dirigent vers la région latérale hypothalamique, contournent le fornix puis gagnent ventralement, celles issues du NSO. L'ensemble des deux groupes de fibres droites et gauches se mélangent et traversent la zone interne de l'éminence médiane (EM). Quelques fibres s'arrêtent à ce niveau, au contact du réseau capillaire primaire de la circulation porte hypophysaire, les autres se rejoignent pour former la tige infundibulaire et se terminent près des capillaires sanguins fenêtrés du LN (Alonso et Assenmacher, 1981).

L'injection de traceurs rétrogrades au niveau du LN indiquent l'existence de groupes de NMC accessoires localisés dans l'aire préoptique, dans les régions hypothalamiques latérales proches de la commissure antérieure et du troisième ventricule ainsi que dans le noyau perifornical et dans le noyau circularis (Sherlock *et al.*, 1975; Kelly et Swanson, 1980).

On retrouve deux types de NMC : vasopressinergiques et ocytocinergiques qui sont caractérisés par des corps cellulaires de grandes tailles (20 –40µm environ) et d'axones amyélinisés. Ces axones se terminent en formant des arborisations au niveau du lobe nerveux (Burbach *et al.*, 2001).

La machinerie relative à la fonction neurosécrétoire des NMC leur a permis l'acquisition d'un réticulum endoplasmique très abondant, un appareil de Golgi bien développé et de nombreux granules neurosécrétoires. Ces granules de 160 à 200 nm de diamètre, de part leur contenu élevé en protéines, apparaissent en microscopie électronique denses aux électrons, raison pour laquelle ils sont appelés granules à « core » dense (Castel *et al.*, 1984).

1- Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire

1.1- Le noyau supraoptique (NSO)

Les NSO se situent dans les zones hypothalamiques latérales gauche et droite de part et d'autre du chiasma optique. Les neurones de ce noyau commencent rostralement, par une large distribution et se condensent caudalement pour rejoindre le trajet optique. Postérieurement, une fine couche de neurones similaires (groupe de neurones retro-chiasmatisques) s'observe séparée du NSO par le trajet optique (Armstrong, 1995). A la partie corticale du NSO, se placent une faible population de neurones de petite taille qui pourraient jouer le rôle d'interneurones et être la cible de plusieurs afférences (Dyball et Kemplay, 1982; Bruni et Perumal, 1984).

Les corps cellulaires des NMC du NSO ont une forme ronde à ovale et possèdent de deux à trois dendrites (Morris *et al.*, 1987; Hatton, 1990); présentant des varicosités (Randle *et al.*, 1986; Smith et Armstrong, 1990). Ces dendrites se collectent en bandes dans une lame ventrale; région contenant aussi des cellules gliales (Sofniewet et Galasman, 1980). Les dendrites peuvent aussi renfermer des granules à « core » dense d'AVP et d'OT (Hatton, 1990).

Les axones des NMC du NSO quittent le noyau dorsomédialement en traçant un large arc puis passent à travers la partie dorsale de la couche interne de l'éminence médiane, avant d'atteindre le LN (Smith et Armstrong, 1990).

Chez le rat, les NMC à OT du NSO s'étendent en position dorsorostrale (Dierickx et Vandesande, 1977; Hou-yu *et al.*, 1986) et ceux produisant l'AVP, en position ventrocaudale (Swaab *et al.*, 1975). Les NMC à OT du NSO produisent également une variété de peptides (la corticotropine, la dynorphine, la galanine, et la colicystokenine etc...) et des substances neuroactives. Ces produits modulent la libération des hormones neurohypophysaires (Meister, 1993).

1.2- Le noyau paraventriculaire (NPV)

Les NPV se situent dans les zones hypothalamiques periventriculaires, formant une paire de noyaux symétriques par rapport au troisième ventricule (3V). Ces

noyaux sont hétérogènes car ils renferment des neurones de différentes tailles ; parmi eux on distingue ceux de grandes tailles (NMC) et ceux de petites tailles (neurones parvocellulaires).

La majorité des neurones magnocellulaires se terminant au niveau de la neurohypophyse à partir du NPV, sont divisés en deux groupes, médial et latéral.. Le premier, contient essentiellement des neurones ocytocynergiques qui se placent antéromédialement par rapport au noyau. Le second renferme principalement les neurones vasopressinergiques qui forment une masse ronde distincte à la partie dorsolatérale postérieure par rapport au premier groupe (Hatton *et al.*,1976).

Swanson et Kuypers (1980), incluent d'autres groupes de NMC ocytocynergiques dans les NPV comme le groupe magnocellulaire periventriculaire et le noyau commissural antérieur. Cependant, un certain nombre d'auteurs les considèrent comme des groupes de NMC neurosécrétoires accessoires.

Les neurones parvocellulaires occupent les parties médiane, ventrale et caudale du NPV. Leurs axones se terminent dans plusieurs régions de l'encéphale et en particulier dans l'éminence médiane (Gainer, 1988).

1.3- La neurohypophyse

La neurohypophyse reçoit les axones des corps cellulaires situés dans les NPV et les NSO. Elle comprend anatomiquement trois parties distinctes, l'éminence médiane, la tige infundibulaire et le processus infundibulaire appelé aussi pars nervosa ou lobe nerveux (LN).

L'origine embryonnaire de la neurohypophyse est ectodermique. Un bourgeonnement à partir du plancher diencephalique se forme, croît caudalement sous forme d'une tige puis se termine par un épaissement infundibulaire qui est le LN. Ce dernier est en dehors de la barrière hémato encéphalique.

L'irrigation du LN est différente de celle de l'adenohypophyse . Elle est principalement assurée par l'artère hypophysaire inférieure qui dérive de la carotide interne et son drainage se fait par la veine hypophysaire postérieure. Cependant, l'irrigation du LN et celle de l'éminence médiane sont séparées (Green, 1947).

1.3.1- L' éminence médiane (EM)

Un nombre de fibres d'environ 10 000 chez le rat et 100 000 chez l'Homme passent par l'EM et la tige infundibulaire pour aboutir au LN (Rasmussen, 1938). Cependant, la présence de fibres tuberohypophysaires dans ce trajet, n'est pas exclue (Haymaker *et al.*, 1969).

Les NMCs des NPV et des NSO envoient leurs axones vers l' EM, au niveau de sa zone interne. Les axones provenant des NPV occupent la partie la plus ventrale de cette zone. Par contre, ceux des NSO s'organisent dans sa région la plus dorsale. Certaines fibres s'arrêtent dans l'EM près du réseau capillaire primaire de la circulation porte (Alonso et Assenmacher, 1981). A ce niveau le phénomène d'exocytose d'AVP et d'OT a été observé (Buma et Nieuwenhuys, 1987).

Dans l'EM, on retrouve les cellules gliales spécifiques appelées « tanicytes ». Les tanicytes s'étendent du plancher du 3V jusqu'à la surface neurohemale de l'EM. Ces cellules semblent être impliquées dans les mécanismes de transport de molécules entre le 3V et les vaisseaux du système porte hypophysaire et dans le contrôle des hormones sécrétées à ce niveau (Wittkowski, 1998).

1.3.2- Le lobe nerveux (LN)

Le LN reçoit les arborisations terminales des NMC. Ces dernières, rentrent en contact avec la vascularisation du LN qui est caractérisée par la présence d'un espace perivasculaire. Cet espace contient une lame basale (Barer et Lederis 1966) et des cellules gliales appelées pituicytes. Ces dernières forment des contacts avec les terminaisons nerveuses et envoient leurs prolongements entre ces terminaisons et la lame basale. La réorganisation structurale des pituicytes est en relation avec le stade fonctionnel du LN (Wittkowski, 1998).

Les études ultrastructurales montrent l'existence de deux structures des terminaisons des NMC, les terminaisons nerveuses (TN) et les dilatations subterminales (DsT). Ces deux structures contiennent une variété d'organites comprenant des lysosomes, des vacuoles, des mitochondries, des microvésicules et des granules à « core » dense. Les vacuoles sont des structures de récupération membranaires (Morris *et al.*, 1987) et les microvésicules sont similaires à celles des synapses centrales. Leur rôle est la

séquestration du calcium entrant dans les terminaisons neurosécrétoires durant l'exocytose (Nordmann, 1983).

Les granules à « core » dense se divisent en deux populations qui se distinguent par leurs tailles, leurs pH, leurs densités et leurs localisations. La population qui se localise au niveau de la TN est prête à la sécrétion tandis que celle retrouvée dans les DsT est destinée au stockage (Nordmann et Labouesse, 1981; Nordmann, 1982).

Le site actif de sécrétion hormonale est la TN (Morris *et al.*, 1987). Cependant, ce processus a été observé à moindre importance au niveau des DsT même n'ayant pas de contact avec la lame basale (Morris et Pow, 1988).

1.4- Les afférences des noyaux para ventriculaires et supraoptiques

Les NSO et les NPV (figure 2) sont riches en connexions afférentes provenant du prosencephale et du tronc cérébral (Day *et al.*, 1989; Kannan *et al.*, 1987).

Le prosencephale envoie des fibres directes vers ces noyaux à partir de l'organe subfornical (SFO), de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et indirectement à partir de ces deux structures par l'intermédiaire du noyau préoptique médian (MnPO) (Miselis, 1981). Le SFO et l'OVLT sont en dehors de la barrière hématoencéphalique; ce qui leur permet d'intégrer des informations à partir de la circulation générale. Par l'intermédiaire de ces structures, l'angiotensine II et la relaxine stimulent les NMC et le peptide natriurique atriale inhibe les NMC à VP (Standaert *et al.*, 1987; Ferguson et Kating, 1988).

Les afférences venant du tronc cérébral, comprennent le noyau du tractus solitaire (NTS), le groupe cellulaire A6 noradrenergique du locus coeruleus (LC) et la bande diagonale de Broca. Ces neurones ont un effet inhibiteur indirect sur les NMC. Une hémorragie ou une stimulation électrique directe du NTS, provoque l'activation des NMC à VP par l'intermédiaire du groupe cellulaire A1 noradrenergique de la région ventrolatérale de la protubérance annulaire (Day et Sibbald, 1989; Raby et Renaud, 1989).

2- Les Hormones de l'axe hypothalamo- neurohypophysaire

La vasopressine (VP) et l'ocytocine (OT), sont deux peptides principalement

synthétisés par les NMC des NPV et des NSO (Vandesande et Dierickx, 1975). L'AVP a deux effets, un effet vasoconstricteur et un effet antidiurétique. L'effet antidiurétique résulte par l'action de l'hormone sur le tube contourné distal du rein (Orloff et Handler, 1967). L'OT a un effet contractile pendant et après la parturition par l'action sur les fibres musculaires lisses du myomètre utérin et des cellules myoépithéliales des alvéoles mammaires (Russell et Leng, 1998) .

2.1- Structure :

Chez les mammifères deux types de VP ont été identifiées. L'homme et la majorité des espèces étudiées expriment l'Arginine vasopressine (AVP) (résidu arginine en position 8), tandis que l'espèce porcine exprime la Lysine vasopressine (résidu lysine en position 8).

La VP et l'OT (figure 3) sont des nonapeptides avec un pont disulfure entre les résidus cystéine en position 1 et 6. Ces deux peptides diffèrent seulement par les amino acides présents en position 3 et 8.

2.2- Biosynthèse :

La biosynthèse de la VP et l'OT se déroule dans le corps cellulaire des NMC. Elle débute par l'expression du gène codant pour les protéines précurseurs ou préprohormones (préproressophysine et préproocyphysine) (Duvigneaud, 1956).

Les gènes codant pour l'AVP et l'OT sont localisées sur le même chromosome (chromosome 20 chez l'homme). Ils possèdent une organisation similaire et une orientation transcriptionnelle opposée (Summar *et al.*, 1990). Chez la plupart des espèces mammifères étudiées, ces deux gènes contiennent trois exons et deux introns (figure 4).

Le premier exon l'**exon 1** code pour le peptide signal suivi par le nonapeptide VP ou OT puis trois acides aminés (glycine-lysine-arginine) contenant le signal de l'endoprotease pour le clivage du précurseur. Cette séquence est suivie par les neuf acides aminés du N-terminal de la neurophysine : NP-I (liant l'OT) ou NP-II (liant la VP). Le second exon est l'**exon 2** contient la plus grande région conservée de la neurophysine (10-76 acides aminés). Le troisième exon est l'**exon 3** contenant le reste des acides aminés de l'extrémité C-terminal de la neurophysine, suivie chez le précurseur de VP par un glycopeptide de 39 acides

aminés tandis que chez celui de l'OT par les acides aminés de l'extrémité C-terminal de NP-I (Ruppert *et al.*, 1984).

L'ARNm transcrit, quitte le noyau après avoir subi l'épissage alternatif des introns. Sa traduction se déroule dans les ribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux (RER) avec une translocation simultanée dans les citernes, à ce niveau il y'a l'excision de la séquence signal, début de glycosylation du glycopeptide de la VP et formation de huit ponts intermoléculaires disulfure chez les deux précurseurs (Castel *et al.*, 1984).

Les précurseurs de l'OT et de la VP modifiés vont être par la suite, transloqués dans l'appareil de Golgi où ils subissent d'autres modifications telle qu'une sialylation, principalement l'enlèvement des oses mannose et l'addition de l'acide sialique et le fructose.

2.3- Transport:

Après leur bourgeonnement à partir du réseau trans golgien (figure 5), les granules subissent un transport antérograde sur les microtubules (Castel *et al.*, 1984), en utilisant probablement comme moteur moléculaire des protéines de la famille des kinésines (Kinesin Family : KIF) (Hirokawa, 1996) comme la KIF2 et la KIF3. Ces kinésines sont connues pour être les transporteurs des granules de 90-160 nm de diamètre (Gainer et Chin, 1998).

2.4- maturation :

Il est bien établi que l'élaboration peptidique finale se déroule au niveau des granules sécrétoires, au cours du transport axonal (Gainer et Wray, 1994).

Les modifications post-traductionnelles commencent au niveau du réseau trans du Golgi et se poursuivent dans les granules de sécrétion. Les prohormones subissent des modifications protéolytiques par l'action des endo-peptidases et des exo-peptidases et non protéolitiques par amidation et sulfatation .

La machinerie enzymatique et l'environnement favorable pour la maturation des peptides se trouve à l'intérieur des granules à core dense (Gainer, 1993). Le

pH intragranulaire acide (5-6 environ) (Russell, 1984), est essentiel pour la stabilisation du contenu granulaire et la liaison des nonapeptides à leurs neurophysines (NPs) (Breslow et Burman, 1990). Ce pH serait maintenu grâce à

une pompe ATPase à protons (Scherman *et al.*, 1982) et à un apport d'électrons, assuré par le cytochrome *b561* (Duong *et al.*, 1984).

2.5- Sécrétion :

Les influx nerveux, arrivant au niveau des corps cellulaires des NMC, se propagent tout au long des axones et provoquent la dépolarisation de la membrane synaptosomale qui provoque l'ouverture des canaux sodiques et l'entrée du sodium (Nordmann et Dynball, 1978). Cette dépolarisation entraîne également l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée du calcium (Bicknell *et al.*, 1993).

Le recrutement des granules à « core » dense et des vésicules synaptiques pour la libération de leur contenu, nécessite d'abord leur détachement du cytosquelette puis leur mobilisation au niveau des sites d'exocytose. Ceci va permettre le contact entre les deux membranes et la formation d'un pore suite à leur fusion .

Ce mécanisme fait intervenir en général, trois groupes de protéines (figure 5) , retrouvées dans les neurones et identifiées dans les NMC du SHN (Burbach *et al.*, 2001).

Le premier groupe de ces protéines est cytosolique, le deuxième est lié à la membrane plasmique et un troisième groupe est lié à la membrane granulaire. Parmi les protéines cytosoliques, le NSF (N-Ethyl-Maleimide-Sensitif-Factor) est le plus répandu dans le système nerveux. Ce dernier peut s'associer aux membranes et redevenir cytosolique lors de l'hydrolyse de l'ATP par son domaine D1. Le NSF interviendrait dans la formation du complexe de fusion par l'intermédiaire de co-facteurs appelés SNAPs (Soluble- NSF- Attachement Protein).

Les protéines de la membrane plasmique comprennent les protéines réceptrices de SNAPs , connues par les t-SNAREs (target-Soluble-NSF-Acceptor-Receptor) : La SNAP-25 (Oyler *et al.*, 1989), la syntaxine-1 et la syntaxine-IB (Jurgutis *et al.*, 1996).

Les protéines associées à la membrane granulaire comprennent des isoformes de la famille de la synaptobrevine (VAMP) la synaptobrevine-1 et -2, des

isoformes de la synaptotagmine la synaptotagmine -1 et -2 la cellubrevine, la rabphilin3A (Jurgutis *et al.*, 1996).

2.6- Actions de la vasopressine et de l'ocytocine

2.6.1- Les récepteurs de la VP et de l'OT :

Ces deux peptides exercent leurs effets physiologiques, par liaison à leurs récepteurs spécifiques, localisés à différents niveaux, centraux et périphériques. Les récepteurs connus de la VP (V1R, V2R, V3R) et celui de l'OT (OTR) appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Barberis *et al.*, 1998).

L'OTR est exprimé par les cellules utérines, mammaires (Rozen *et al.*, 1995) et cérébrales (Yoshimura *et al.*, 1993). Les NMC expriment également ce récepteur à leur surface. L'OTR est aussi capable de lier la VP (Adan *et al.*, 1995). Ce récepteur une fois lié à son ligand, active la phospholipase C β et augmente le taux du calcium cytosolique par la voie de transduction des phospho-inositides.

Le V1R ou (V1a) est exprimé au niveau du foie, des vaisseaux sanguins, des cellules musculaires lisses et d'autres tissus (Lolait *et al.*, 1992). Il est probablement le plus répandu au niveau du cerveau (Ostrowski *et al.*, 1993). Il agit en stimulant les phospholipases C, D par la voie des phospho-inositides, provoquant l'augmentation du taux du calcium intracellulaire. De plus, il provoque la diminution du pH intracellulaire par la stimulation de l'échangeur H⁺/Na⁺ (Briley *et al.*, 1994).

Le V2R est exprimé au niveau du rein chez le rat adulte (Lolait *et al.*, 1992). L'ARNm du V2R a été retrouvé dans le cerveau du nouveau né (Hirasawa *et al.*, 1994). Le V2R est couplé à la protéine G_s (stimulatrice) et agit par la voie de l'AMPc (Orloff et Handler, 1967).

Le V3R ou (V1b) est exprimé dans la majorité des cellules corticotrophes de l'adenohypophyse, dans des régions variables du cerveau et dans de nombreux tissus périphériques, comprenant le rein, le thymus, le cœur, le poumon, la rate, l'utérus, la mamelle (Lolait *et al.*, 1995). Ce récepteur stimule la phospholipase C et induit une augmentation du calcium intracellulaire.

2.6.2- Rôle physiologique de la vasopressine et de l'oxytocine :

2.6.2.1- Dans l'équilibre hydrominéral :

Le changement dans l'équilibre de l'osmolarité du compartiment extracellulaire est perçu au niveau des osmorecepteurs périphériques et centraux. Ces derniers forment un groupe d'afférences pour le NSO et le NPV et induisent la dépolarisation des NsMC puis la libération de la VP et l'OT.

Au niveau du cerveau, la VP et l'OT agissent comme des neurotransmetteurs, et ont un effet sur le comportement, en diminuant l'appétit vis à vis du sel et en induisant la sensation de soif. Au niveau périphérique, ils agissent comme des hormones. Une fois fixée sur son récepteur la VP provoque la réabsorption d'eau au niveau des tubes collecteurs rénaux (Orloff et Handler, 1967).

2.6.2.2- Dans la reproduction :

L'OT est beaucoup plus connue pour son activité dans la reproduction. Au début de la parturition, elle stimule la contraction du myomètre (Russell et Leng, 1998) et au moment de la lactation, elle induit la libération de la prolactine (Young *et al.*, 1998).

2.6.2.3- Dans la vasoconstriction :

L'hémorragie provoque une augmentation considérable du taux plasmatique de la VP. Celle-ci agit sur les vaisseaux sanguins, dans le but de réduire leurs calibres (Schrier, 1985).

2.6.2.4- Dans la régulation de l'activité corticotrope :

La vasopressine libérée dans la circulation porte de l'EM, par son action sur le V3R des cellules corticotropes adénohypophysaires, stimule la libération de l'hormone corticotrope ACTH (Antoni, 1993).

II. Implication du cytosquelette dans le processus sécrétoire peptidergique

Les cellules eucaryotes adoptent une variété de formes et effectuent des mouvements coordonnés et dirigés grâce à un réseau de filaments protéiques, appelé cytosquelette. Celui-ci est en continuelle réorganisation, en réponse à la physiologie cellulaire. Le cytosquelette se divise en fonction de sa répartition et de son organisation intracellulaire, en cytosquelette filamenteux et cytosquelette membranaire ou subcortical.

1 - Le cytosquelette filamenteux

Le cytosquelette filamenteux est constitué de trois types de filaments. Ils sont distingués par leurs diamètres, leurs compositions moléculaires et quelque fois par leurs distributions intracellulaires.

1.1- Les microtubules :

Ce sont des structures polaires et dynamiques. La forme des microtubules est cylindrique et rectiligne. Leur diamètre est de 25 nm. Ils sont formés par des protofilaments dont les molécules unitaires sont les tubulines α et β . Ces deux monomères globulaires de 55 kDa de poids moléculaire moyen, polymérisent en protofilaments avec la présence de protéines associées, les MAPs (Microtubule-Associated-Proteins). Treize de ces protofilaments s'assemblent pour former la paroi du microtubule.

Dans le neurone, les microtubules donnent l'organisation spatiale majeure des dendrites et de l'axone. Leurs extrémités dépolymérisantes (-), sont orientées du côté du pericaryon tandis que les extrémités polymérisantes (+), sont orientées vers la partie distale de l'axone. Ils participent en association avec les neurofilaments et les microfilaments dans le transport axonal, le stockage et la sécrétion.

1.2- Les filaments intermédiaires :

Ces structures, ont un diamètre de 10 nm, intermédiaire entre celui des microtubules et des microfilaments. Leurs molécules unitaires sont fibreuses et très allongées. Les neurofilaments sont les filaments intermédiaires spécifiques aux

neurones. Ils prennent une position parallèle à l'axe longitudinal de l'axone, jouant un rôle important dans la détermination de son calibre.

Dans les cellules gliales, le monomère qui est à la base de la formation de ces filaments est la GFAP (Glial-Fibrillary-Acidic-Protein). Cette protéine est utilisée comme marqueur des astrocytes du SNC (Luca et Salm, 1995) et des pituicytes dans la neurohypophyse (Murugaiyan et Salm, 1995). Dans les neurones magnocellulaires, les neurofilaments constituent avec les microtubules, les éléments majeurs du cytosquelette axonal (Senda, 1998).

1.3- Les microfilaments :

Ce sont les filaments les plus fins du cytosquelette filamenteux. De 5-9 nm de diamètre, ils sont formés par des polymères hélicoïdaux à deux brins d'actine-F (Filamenteux) dont la molécule unitaire est une protéine globulaire; appelée actine-G (globulaire) de 45-55 kDa. L'actine-G est retrouvée en isoformes α et β . Elle peut être phosphorylée, méthylée ou ADP-ribosylée. Sa polymérisation nécessite de l'ATP et de fortes concentrations de Mg^{++} et Mn^{++} .

Les filaments d'actine s'arrangent dans la cellule en bandes ou en réseaux. Les protéines responsables de ces organisations sont les protéines liant l'actine ou ABPs (Actin-Binding-Proteins). L'aspect d'arrangement dépend de la taille et la flexibilité des protéines de liaison. Ces protéines sont regroupés en trois classes : la classe I, classe de protéines monomériques parmi elles (la fimbrine et la plastine), la classe II, celle des protéines en hélice α entre autre (la spectrine, la fodrine, la dystrophine et l' α actinine) et la classe III, des protéines en feuillet β parmi elles (la filamine et l'ABP-120) (Matsudaira, 1991).

Les bandes sont formées d'un ensemble de rangées de filaments d'actine parallèle et en étroite association entre elles. L' α -actinine est parmi les protéines qui sont impliquées dans ce type d'organisation. Les réseaux, contrairement aux bandes, sont des structures ouvertes et lâches. Ils sont à la base de la propriété visco-élastique ou gélifiée du cytoplasme et permettent la résistance aux déformations locales et l'ancrage des organites et des protéines complexes, impliquées dans la biosynthèse et le métabolisme cellulaire (Matsudaira, 1991).

1.3.1-Organisation des microfilaments dans les cellules nerveuses :

Dans ces cellules, les filaments d'actine sont parallèles à l'axe longitudinal de l'axone. Leurs extrémités polymérisantes (+) sont du côté du bouton synaptique et les extrémités dépolymérisantes(-) sont du côté du pericaryon. Les filaments longs, sont concentrés vers l'intérieur, par contre les plus courts s'organisent en réseau sous-jacent à la membrane plasmique (Trifaro et Vitale, 1993).

Dans les neurones magnocellulaires du SHN, au niveau de la partie proximale des axones, région représentant la majeure partie de l'axone, les microfilaments se disposent parallèlement à l'axe longitudinal de l'axone. Ces structures sont courtes et forment des interconnexions entre elles et s'orientent parfois perpendiculairement par rapport à l'axe longitudinal de l'axone formant des pontages entre les microtubules et l'axolemme (Alonso *et al.*, 1981).

Au niveau de la partie distale des axones, région qui comprend les terminaisons nerveuses et les dilatations subterminales, une grande concentration d'actine s'observe. L'actine-F forme un réseau tridimensionnel très complexe (Alonso *et al.*, 1981) et apparaît ancrée à l'axolemme, particulièrement dans les terminaisons nerveuses perivasculaires. Elle présente des interactions étroites avec les granules neurosécrétoires et les vésicules synaptiques trouvées dans cette région. Cette organisation est observée aussi avec les vésicules recouvertes des terminaisons nerveuses et des pituicytes. Dans les dilatations subterminales, le réseau d'actine prend une localisation plus centrale (Alonso *et al.*, 1981).

2- Le cytosquelette subcortical

Le cytosquelette subcortical est constitué d'une famille de protéines comprenant des protéines membranaires et des protéines sous-membranaires. Parmi les protéines sous-membranaires du cytosquelette subcortical, on retrouve l' α -actinine, la spectrine et la dystrophine qui sont des éléments dont le rôle est très important puisque en leur absence, de pathologies très graves se produisent. L'elliptocytose et la sphérocytose par exemple sont des anémies hémolytiques héréditaires causées par l'absence de la spectrine dans le globule rouge. Les dystrophies musculaires de type Duchenne (DMD) ou de Becker (DMB) sont dues quant à elles, à une absence ou à un défaut de la dystrophine, suite à des mutations sur le gène DMD (Koeing *et al.*, 1988).

2.1- Cytosquelette de la membrane de l'érythrocyte

Le cytosquelette subcortical de l'érythrocyte humain n'est pas statique. Il s'organise grâce à des interactions structurales entre des protéines sous-membranaires et des protéines membranaires. Le premier groupe représente la spectrine, l'ankyrine, la protéine 4.1. Le deuxième groupe comprend l'échangeur d'anions ou bande3 (protéine membranaire) et la glycopherineC (figure 6).

La spectrine est une molécule flexible et allongée. Elle existe sous différentes isoformes dans plusieurs cellules. Elle est composée de deux sous-unité α et β , associées en dimères, puis en tétramères, puis en oligomères. cette protéine est le composant majeur du cytosquelette membranaire érythrocytaire.

L'ankyrine existe sous plusieurs isoformes dans les cellules autres que l'érythrocyte. Elle lie le cytosquelette subcortical à un nombre de protéines membranaires telle que la Na^+/K^+ ATPase (Nelson *et al.*, 1990), les canaux Na^+ voltage-dépendants dans le cerveau et les jonctions neuromusculaires (Coleman *et al.*, 1989) et aux molécules d'adhésion cellulaire telle que la E-cadherine au niveau de certaines cellules rénales (Nelson *et al.*, 1990).

La protéine4.1 se lie à la glycopherineC par le domaine amino-terminal et avec l'actine par le domaine carboxy-terminal. Elle peut être phosphorylée par différentes kinases. Plusieurs isoformes et protéines relatives comme l'eitrine et la taline sont exprimées par d'autres cellules (Hays *et al.*, 1994).

La tropomyosine et la protéine 4.1, sont attachées à la membrane plasmique par la spectrine qui est, elle même reliée fortement à la bande 3 membranaire grâce à l'ankyrine.

2.2- Cytosquelette de la membrane de la cellule musculaire :

La répartition du cytosquelette subcortical au niveau de la cellule musculaire est fonction des régions membranaires. La jonction neuro-musculaire est une partie du sarcolemme riche en récepteurs d'acétylcholine. A ce niveau, l'actine est reliée à la matrice extracellulaire (MEC) par l'intermédiaire de l'utrophine (protéine homologue à la dystrophine)(Culligan *et al.*, 1998) qui se fixe à la membrane par le complexe dystroglycane α et β (voir plus loin). Cet ensemble, avec certains composants de la MEC (l'agrine), participent au regroupement des récepteurs nicotinique de

l'acétylcholine. Dans les régions hors de la jonction neuro-musculaire,, c'est la dystrophine qui assure cette liaison. L' α -dystroglycane lie l'ensemble de ces protéines sous-membranaires par l'interaction avec son récepteur au niveau de la MEC qui est l'agrine. Du côté cytoplasmique, la dystrophine et l'utrophine peuvent fixer les dystrobrevines et l' α 1- et la β 1- syntrophine (Grady *et al.*, 2000).

2.3- Cytosquelette de la membrane de la cellule nerveuse :

Il a été rapporté que les dystrophines sont exprimées par le cerveau (Jung *et al.*, 1991). La liaison membranaire est médiée par le β -dystroglycane qui se lie à l' α -dystroglycane. L' α -dystroglycane se lie dans la matrice extracellulaire à une protéine présynaptique impliquée dans l'agrégation cellulaire, connue sous le nom de neuron-spécific α -dystroglycane-binding protein .

L'addition de protéines de la famille des dystrobrevines et des syntrophines (protéines associées à la dystrophine), recrutent des éléments de signalisation cellulaire comme le nNOS (nitroxyde syntase neuronale) enzyme responsable de la synthèse de la molécule signalétique NO (monoxyde d'azote) (Rando, 2001).

3- Données générales sur les dystrophines

3.1- Structure de la dystrophine 427 (Dp427) :

La dystrophine est le produit du gène DMD, localisé au niveau du chromosome X. Elle comprend 4 domaines distincts (figure 7) :

3.1.1- Le domaine N-terminal :

Ce domaine, constitué de 261 acides aminés, présente une importante homologie de séquence avec l' α -actinine (Hammond, 1987) et avec la β -spectrine (Beyers *et al.*, 1989). Il contient 3 sites liant l'actine-F (ABS : Actine-Binding-Sites) (Levine *et al.*, 1992) et deux sites de liaison de la calmoduline. La liaison à la calmoduline est dépendante du Ca^{++} et inhibe la liaison de l'actine à la dystrophine.

3.1.2- Le domaine central :

Ce domaine, de 2705 acides aminés, est composé de plusieurs éléments structuraux répétés, en triple hélice, de façon analogue à la β -spectrine et l' α -actinine. A chaque extrémité de ce domaine, sont placées deux zones charnières riches en résidus proline.

Deux modèles ont été proposés quant à l'organisation du domaine central. Koenig et Kunkel (1990), suggèrent qu'il est constitué de 24 éléments répétés de 109 résidus avec une zone charnière entre les éléments 3 et 4 et entre les éléments 19 et 20. Chaque élément répété est constitué de 4 hélices α reliées par trois segments. Le deuxième modèle a été décrit par Gross et collaborateurs (1990). Ces auteurs suggèrent qu'il est composé de 25 éléments répétés de longueur variable, constitués de deux hélices α et deux segments de liaison. Le motif structural créé par le repliement de trois hélices, serait plus épais que celui observé pour la spectrine. Ces deux modèles suggèrent que la dystrophine adopte une forme allongée et un comportement élastique.

Dans le domaine central, il existerait des sites capables de lier la dystrophine à la membrane plasmique (Rybakova *et al.*, 1996), deux autres sites liant l'actine (Winder, 1997) et sept sites de phosphorylation (Luise *et al.*, 1993)

3.1.3- Le domaine « riche en cystéine » :

Ce domaine renferme de nombreux résidus cystéine parmi ses 260 acides aminés. Il est situé à la suite de la zone charnière du long domaine central et présente une homologie de séquence avec le domaine C-terminal de l' α -actinine qui contient les motifs EF en forme de «doigts de la main», capables de lier le Ca^{++} et la calmoduline. Ce domaine contient aussi une région impliquée dans les interactions protéine-protéine (WW/WWP). Cette région de la protéine est très importante car elle est capable d'assurer la liaison de la dystrophine au complexe protéique transmembranaire, les DAGs (dystrophin-associated-glycoproteins) (Suzuki *et al.*, 1992).

3.1.4- Le domaine C-terminal :

Ce domaine, constitué de 345 acides aminés, est spécifique à la famille des dystrophines. Des sites de liaison aux protéines appartenant à la famille de DAPs comme les syntrophines, ont été mis en évidence dans ce domaine (Gorecki *et al.*, 1997).

3.2- Autres produits du gène DMD :

Le gène DMD possède 7 promoteurs (Amiel *et al.*, 1995). Il code pour des protéines de grandes et de petites tailles (figure 7).

Trois produits de grandes tailles(Dp427) ont été identifiés : la DpM, identifiée au niveau du muscle, la DpB, au niveau du cerveau et la DpP dans les cellules de purkunje (Gorecki et Barnard, 1992; Blake *et al.*, 2002). Les produits de petite taille, les plus connus sont au nombre de cinq et comprennent : la Dp260 (R) (D'Souza *et al.*, 1995), la Dp140 (B₃) (Lidov *et al.*, 1995; Durbeej *et al.*, 1997), la Dp116 (S) (Byers *et al.*, 1993), la Dp71(G)(Bar *et al.*, 1990) et la Dp45 (Tinsley *et al.*, 1993). Les Dp de petite taille ne possèdent pas le domaine N-terminal et une partie ou la totalité du domaine central de la Dp427.

3.3- Distribution des dystrophines au niveau du cerveau :

La Dp427 est largement distribuée dans le cerveau. Elle est retrouvée dans l'hippocampe, le cervelet et dans les cellules gliales du néocortex (Chelly *et al.*,1990).

La Dp260 est principalement exprimée dans la rétine (D'Souza *et al.*, 1995), par les photorecepteurs (Claudepierre *et al.*, 1999).

La Dp140 est abondante dans le cerveau foetal (Morris *et al.*,1995) et dans la rétine où son taux augmenterait avec l'âge (Rodius *et al.*, 1997).

La Dp116 est retrouvée principalement dans les nerfs périphériques (Byers *et al.*,1993) et dans les cellules de Schwann (Saito *et al.*, 1998). Elle s'associe à ce niveau, aux sarcoglycanes et aux dystroglycanes (Imamura *et al.*, 2000).

La Dp71 est la forme la plus exprimée dans les tissus autres que le muscle. Elle est fortement retrouvée dans les neurones, les cellules gliales (Rappaport *et al.*, 1992) et dans les cellules gliales de Müller de la rétine (Claudepierre *et al.*, 1999).

3.4- Distribution des dystrophines au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire :

Dans les neurones magnocellulaires et les cellules gliales du SHN, les produits du gène DMD ont été retrouvés (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998).

La Dp427 serait associée à la membrane plasmique des terminaisons nerveuses ou des dilatations subterminales et à la membrane des pituicytes au niveau de la neurohypophyse. La Dp140, la Dp 116 et la Dp 71 seraient associées à la membrane des granules en stock sur la face cytoplasmique, par le biais du β -dystroglycane. Cette distribution suggère un rôle dans le stockage des granules de sécrétion et dans les relations dynamiques des neurones magnocellulaires avec les cellules gliales (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998).

4- Les protéines homologues des dystrophines : Les Utrophines :

Certains anticorps dirigés contre le domaine C-terminal de la dystrophine, utilisés dans le tissu musculaire squelettique de malades atteints de DMD, réagissent positivement avec une protéine de 400 kDa (Tanaka *et al.*, 1989 ; Fardeau *et al.*, 1990; Pons *et al.*, 1991). De la même façon, cette protéine a été détectée dans le cerveau de souris *mdx* (déficiente en Dp427)(Ishiura *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1991). Cette protéine apparentée immunologiquement à la dystrophine a été dénommée DRP (Dystrophin-Related- Protein). Par la suite, des DRP de différents poids moléculaires ont été identifiées (Jung *et al.*, 1991; Blake *et al.*, 2002)(figure 7).

La plus connue parmi les DRP est l'utrophine ou DRP1, de 400kDa. Elle présente une forte homologie de séquence avec la dystrophine. Elle est codée par un gène autosomal, localisé au niveau du chromosome 6 (Khurana *et al.*, 1990). Elle est constituée d'une extrémité N-terminale contenant des sites de liaisons à l'actine, un domaine central à 22 motifs répétés, un domaine riche en cystéine et une extrémité C-terminale possédant des sites de liaison au Ca^{++} .

L'utrophine est exprimée par la majorité des tissus (Love *et al.*, 1991). Dans les neurones et les cellules gliales des souris *mdx* (Khurana *et al.*, 1992) et pourrait exister dans les neurones magnocellulaires, les pituicytes et les astrocytes de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998). En particulier, les utrophines pourraient être retrouvées dans les jonctions neuromusculaires des muscles squelettiques de malades atteints de DMD (Tanaka *et al.*, 1989).

5- Le complexe protéique associé à la dystrophine :

La dystrophine se lie avec une variété de protéines membranaires et sub membranaires (figure8), formant un complexe appelé le complexe protéique associé à la dystrophine DAPC (Dystrophin-Associated-Protein-Complex).

Selon les données bibliographiques, ce complexe de protéines est composé par le groupe de dystroglycanes et le groupe de sarcoglycanes qui sont membranaires et par la dystrobrevine et la syntrophine qui sont cytosoliques.

Dans la cellule musculaire, le DAPC joue un rôle structural dans la liaison de l'actine à la matrice extracellulaire et dans la stabilisation du sarcolemme dans les cycles répétés de contractions et de relaxations, en transmettant la force générée

dans la fibre à la matrice extracellulaire (Petrof *et al.*, 1993). Il a été montré par ailleurs, que le DAPC est impliqué dans la signalisation cellulaire par ses interactions avec la calmoduline et le nNOS (Rando, 2001).

Les composants du DAPC sont des protéines transmembranaires et sous-membranaires, le premier groupe se compose du complexe dystroglycane, sarcoglycane et le sarcospan alors que le deuxième est formé par les dystrobrevines, les syntrophines et la syncoiline.

5.1- Le groupe de dystroglycanes :

Les dystroglycanes identifiées dans l'extrait de muscle, la DAG-156 (l' α -dystroglycane), la DAG-43 (le β -dystroglycane). L' α -dystroglycane et le β -dystroglycane sont issus du même gène qui code pour un seul ARNm. Le polypeptide produit est par la suite clivé en deux pour donner l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane. l' α -dystroglycane est une protéine membranaire périphérique, située sur vers la face extracellulaire. Elle se lie à la membrane cellulaire par le β -dystroglycane. Le β -dystroglycane quant à lui, est transmembranaire et capable d'interagir avec certains composants intracellulaires comme les dystrophines. L'ensemble (α -dystroglycane et β -dystroglycane) forme un complexe membranaire qui a pour rôle d'ancrer le reste des composants du DAPC à la membrane plasmique (Ervasti et Campbell, 1991).

5.2- Le groupe de sarcoglycanes :

Ce complexe est constitué d'isoformes, α -, β -, δ -, γ - et ϵ -sarcoglycanes qui sont des polypeptides transmembranaires, ayant respectivement des poids moléculaires de 50, 43, 35, 35, et 50 kDa (Hack *et al.*, 2000). Les cellules musculaires striées contiennent les isoformes α -, β -, δ -, γ -sarcoglycanes tandis que les cellules musculaires lisses renferment les isoformes β -, δ -, γ -et ϵ -sarcoglycanes (Straub *et al.*, 1999). les isoformes β -, δ -, et γ -sarcoglycanes appartiennent aux protéines transmembranaires de type I (N-terminal est à la face interne de la cellule) tandis que l' α - et l' ϵ -sarcoglycanes appartiennent à la famille de type II (N-terminal vers la face extracellulaire).

Les β -, δ -, et γ -sarcoglycanes renferment au niveau de leurs extrémités C-terminales, un ensemble de résidus cystéine similaire aux récepteurs de molécules comme l'EGF (Epidermal Growth Factor) et la laminine.

Des études d'immuno précipitation suggèrent que les trois isoformes β -, δ -, et γ - sont étroitement liées. L' γ - sarcoglycane peut interagir directement avec la dystrophine et le δ -sarcoglycane avec le complexe dystroglycanes (Chan *et al.*, 1998).

5.3- Les dystrobrévines :

Ce sont des protéines analogues de la dystrophine (figure 7) et faisant partie du complexe protéique qui lui est associée (Peters *et al.*, 1997). L' α -dystrobrévine possède 5 isoformes : α -dystrobrévine-1 (84-94 kDa), -2 (62-65 kDa), -3 (42 kDa) , -4(44 kDa) et -5(22 kDa). Elles sont exprimées par plusieurs tissus chez la souris (Ambrose *et al.*, 1997). Ces isoformes diffèrent dans la région de coupure de l'extrémité C-terminale qui est formée de 108 résidus d'aa (la région unique de la dystrobrévine : RUD). Cette famille de protéines contient plusieurs sites de phosphorylation par la tyrosine kinase. L' α -dystrobrévine-1 a une localisation synaptique et se lie avec la dystrophine et l'utrophine (Wagner *et al.*, 1993). Elle serait indispensable dans le regroupement des récepteurs d'acétylcholine (Grady *et al.*, 2000).

L' α dystrobrévine-2 est la plus abondante dans le sarcolemme. Elle contient deux sites de liaison à la syntrophine et un seul à la dystrophine.

La β -dystrobrévine est similaire à l' α -dystrobrévine mais avec une RUD plus courte (Puca *et al.*, 1998).

5.4- Les syntrophines :

C'est une famille de protéines hétérogènes de 58 kDa de PM moyen. Trois isoformes sont décrites : L' α_1 - syntrophine isoforme acide (pH_i :6,4), la β_1 - et la β_2 - syntrophine sont basiques. Ces protéines sont issues de gènes différents (Wagner et Haganir, 1994) et sont retrouvées au niveau des jonctions neuromusculaires. Cependant, seules l' α_1 - et la β_1 -syntrophines sont réparties tout au long de la face cytoplasmique du sarcolemme où elles se lient à la dystrophine. Au niveau du SNC l' α_1 -syntrophine est capable d'interagir avec le nNOS (Hashida-Okumara *et al.*, 1999) et les canaux sodium, dépendants du voltage (Gee *et al.*, 1998).

6- Caveolae et cytosquelette subcortical

6.1- Définition des caveolae :

Les cavéolae forment un sous ensemble de vésicules non-clathrine-dépendantes de 50 à 100 nm de diamètre, identifiées dans la plupart des cellules des mammifères (Palade, 1953; Yamada, 1955). Plusieurs études morphologiques ont montré l'extraordinaire abondance des cavéolae au niveau des différentes cellules telles que les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et striés et les pneumocytes de type I (Moblely et Eisenberg, 1975; Gabella, 1976; Gil, 1983). Il a été rapporté que plus de 70% de la membrane plasmique de la cellule endothéliale et du pneumocyte type I peuvent être occupés par les cavéolae (Gil, 1983).

En fonction du type cellulaire, les caveolae, en se détachant de la membrane plasmique, forment diverses structures, donnant un aspect de grappe dans les cellules musculaires squelettiques, de rosettes dans les adipocytes ou fusionnent pour former un tubule allongé ou un canal trans-cellulaire dans la cellule endothéliale (Simionescu *et al.*, 1975; Scherer *et al.*, 1994; Parton *et al.*, 1997) .

Les cavéolae sont considérées comme une forme spécialisée des radeaux lipidiques de la membrane plasmique ou « lipid-rafts » (figure 9).

Les « lipid-rafts » sont des microdomaines spécialisés, enrichis en cholestérol et en sphingolipides (glycosphingolipides, et sphingomyelines) ayant une organisation en bicouche hautement rigide empêchant les mouvements lipidiques.

Ces domaines subissent des changements fonctionnels et morphologiques par l'intégration d'une classe de protéines structurales appelée MORFs (Modifiers Of Rafts Function). Parmi ces protéines on retrouve les flotillines, les cavatellines et les cavéolines (Galbiati *et al.*, 2001b).

6.2- Les cavéolines marqueurs des cavéolae :

Les cavéolines sont des protéines de 21--24 kDa, qui s'intègrent aux « lipid rafts », Une fois attachées à ces domaines, elles forment des invaginations appelées cavéolae (Razani *et al.*, 2002) (figure 9).

Les cavéolines sont les produits de différents gènes et présentent trois isoformes nommés CAV1, CAV2 et CAV3. Les CAV-1 et CAV-2 sont exprimées à des taux plus

élevés par les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les pneumocytes. Par contre, l'expression de la CAV-3 est limitée aux cellules musculaires lisses, squelettiques et cardiaques (Scherer *et al.*, 1994,1996; Tang *et al.*, 1996).

6.3- Structure des cavéolines :

La CAV-1 a été la mieux étudiée (Razani *et al.*, 2002). C'est une protéine à double passage transmembranaire (Sargiacomo *et al.*, 1995) dont les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (Dupree *et al.*, 1993). L'analyse de sa séquence a montré qu'elle contient une seule région hydrophobe de 32 résidus d'acides aminés (102-134). Cet région se présente sous un aspect incomplet d'épingle à cheveux à travers la bicouche lipidique (figure 10).

La cavéoline-1 est subdivisée en cinq domaines :

- **Le domaine N-terminal d'attachement à la membrane (N –MAD)**

Le N-MAD (N-terminal- Membrane- Attachment Domain) comprend les résidus (82-101), de l'extrémité N-terminale qui s'attache à la membrane (Schlegel et Lisanti, 2001). Ce domaine dirige la CAV-1 vers la membrane plasmique (Dietzen *et al.*, 1995).

- **Le domaine C-terminal d'attachement à la membrane (C–MAD) :**

Le C–MAD (C-terminal-Membrane-Attachment Domain) comprend les résidus 135-150, de l'extrémité C-terminale qui s'attache à la membrane (Schlegel et Lisanti, 2000). Le C–MAD dirige la CAV-1 vers la région trans de l'appareil de Golgi où elle est palmitoylée sur trois résidus cystéine du C-terminal (133, 143 et 156)(Dietzen *et al.*, 1995).

- **Le domaine transmembranaire (TM) :**

Le TM (Transmembrane Domain) est un domaine hydrophobe, représentant la partie enfouie de la protéine.

- **Le domaine d'oligomérisation (OD) :**

Le domaine d'oligomérisation comprend les résidus (61-101). Il permet l'association d'une molécule de cavéoline avec d'autres molécules pour la formation d'un oligomère. Ce domaine peut englober le N –MAD (Song *et al.*, 1997b).

- **Le domaine terminal (TD) :**

Le domaine terminal est positionné sur la partie terminale de l'extrémité C-terminale. Il permet l'interaction de la cavéoline avec une autre cavéoline appartenant à un oligomère voisin.

6.4- Genèse des caveolaes :

6.4.1- Oligomérisation des cavéolines :

La CAV-1 se présente sous forme d' homo-oligomère de 14 à 16 unités ou d'hetero-oligomère avec la CAV-2 (Scherer *et al.*, 1997), avant même de s'intégrer à la membrane pour former les cavéolaes (Sargiacomo *et al.*, 1995). Ces complexes, de 350 à 400 kDa de PM, se forment rapidement après la synthèse de la cavéoline dans le RER et avant d'achever le transit dans l'appareil de Golgi (Monier *et al.*, 1995). En absence des CAV-1, les CAV-2 ne sont pas capables de former de larges homo-oligomères. Elles existent alors sous forme mono ou dimérique et sont retenues dans le compartiment golgien. Ces observations montrent que la CAV-2 dépend de la CAV-1 dans son oligomérisation et son trafic intracellulaire (Mora *et al.*, 1999; Parolini *et al.*, 1999).

La CAV-3 peut former un complexe homo-oligomérique de 350 à 400 kDa de PM qui sera dirigé vers les domaines des cavéolaes (Tang *et al.*, 1996). Contrairement à la CAV-1, la CAV-3 ne peut pas former d' hétéro-oligomères avec la CAV-2 (Das *et al.*, 1999).

6.4.2- Rôle des cavéolines et du cholestérol dans la genèse des cavéolaes :

Les différentes caractéristiques de la cavéoline expliquent la manière dont elle transforme les régions appropriés de la membrane plasmique en invaginations puis en caveoles. La CAV-1 lie le cholestérol et les sphingolipides des « lipid-rafts » (Thiele *et al.*, 2000). Le cholestérol présente une forte affinité avec les cavéolines et demeure lié avec elles même en présence de détergents puissants tel que le Dodecyl Sulfate de Sodium (Murata *et al.*, 1995). La grande concentration du cholestérol et de cavéoline au niveau de la membrane des cavéolaes, lui donne la propriété d'invagination à la membrane plasmique. Ceci a été déduit de l'absence de la formation d'invaginations cavéolaires, après le traitement des cellules avec des

agents liant le cholestérol, tels que la nystatine, la filipine ou la cyclodextrine (Rothberg *et al.*, 1992; Hailstones *et al.*, 1998).

Les cavéolines tendent alors à former dans un premier temps, des complexes (homo-ou hétéro-oligomères) de 14 à 16 unités. Ces oligomères passeront par un second stade d'oligomérisation, dans le compartiment trans du Golgi au cours de leur transit vers la membrane plasmique. Ce processus est assuré par l'interaction des molécules de cavéolines d'un oligomère avec celles d'un autre oligomère adjacent par l'intermédiaire du domaine TD de l'extrémité C-terminale. Ces complexes forment alors un réseau continu sous la membrane plasmique. Ce processus est similaire à celui des puits recouverts de clathrine (Song *et al.*, 1997b).

6.5- Rôles des caveolae/Cavéolines dans les échanges cellulaires :

6.5.1- Dans l'endocytose :

Il est bien établi que certains récepteurs et macromolécules extracellulaires sont exclusivement transportées par les caveolae (figure 11). On a constaté que les caveolae lient certaines toxines comme ceux du choléra et du tétanos (Montesano *et al.*, 1982).

Il a été, par ailleurs, démontré que le traitement des cellules par la nystatine bloque l'endocytose de certaines molécules comme l'albumine, sans affecter la voie dépendante de clathrine utilisée par d'autres molécules (Schnitzer *et al.*, 1994; Minshall *et al.*, 2003). Sous certaines conditions, les caveolae transportent directement le contenu à partir de la membrane plasmique vers les compartiments RE/Golgi où elles le localisent dans une structure membranaire qui n'est pas actuellement bien connue, appelée cavéosome. Le cavéosome est différent de l'endosome et du lysosome (Conrad *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1999).

La purification des domaines cavéolaires a montré la présence de grandes concentrations de molécules qui interviennent dans le trafic membranaire. On retrouve des molécules comme le NSF (N-Ethyl-Maleimide-Sensitif-Factor), les SNAPs (Soluble-NSF-Attachement-Proteins), la VAMP (Vesicle-Associated-Membrane-Proteins) et la GTPase (Guanosine Triphosphatase). Ces protéines que nous avons cités comme les VAMP, s'associent probablement avec la CAV1 (Schnitzer *et al.*, 1995b; Predescu *et al.*, 2001). Le clivage de la VAMP avec des neurotoxines spécifiques, bloque l'endocytose et la fusion des caveolae avec les compartiments cibles intracellulaires (Schnitzer *et al.*, 1999).

6.5.2- Dans la Pinocytose :

La cellule transporte les petites molécules (<1 kDa) par pinocytose. Il a été mis en évidence que le récepteur de l'acide folique est localisé au niveau des cavéolae (Rotherberg *et al.*, 1990). La caveolae internalise l'acide folique par la fermeture des deux bouts de l'invagination (Anderson *et al.*, 1992).

6.5.3- Dans la Transcytose :

L'utilisation de protéines sériques conjuguées à certains traceurs comme l'albumine couplée à l'or, a montré une interaction dynamique entre les cavéolae et l'endothélium capillaire, dans le but de transporter des molécules protéiques à travers les cellules endothéliales (Simionescu *et al.*, 1975; Schnitzer *et al.*, 1994). Les cavéolae forment quelque fois des tubules ou des canaux transcellulaires entre la face luminale et la face abluminale de l'endothélium capillaire (Parton *et al.*, 1997).

6.5.4- Dans la transduction du signal :

La cavéoline appartient aux protéines échafaudages ou « Scaffolding proteins ». Ces protéines ont la particularité de réduire, d'organiser et/ou de réguler la distribution subcellulaire d'autres molécules signalétiques. La cavéoline, par l'intermédiaire de son domaine CSD (Cavéoline Scaffolding Domaine), lie un certain nombre de protéines signal par leur domaine de liaison avec le CSD, le CBD (Caveolin-Binding Domain) (Razani *et al.*, 2002).

La modulation du eNOS (endothélium monoxyde d'Azote synthase) par les cavéolines a été la mieux étudiée. L'interaction CAV-1/eNOS par le CSD/CBD respectivement, maintient le eNOS inhibé jusqu'à ce que cette liaison soit rompue, par une augmentation du calcium cytosolique, suivie par une interaction calcium-calmoduline/ eNOS. Une mutation au niveau du domaine CBD du eNOS conduit à une perte de liaison avec la CAV-1 et un maintien de son activité enzymatique (Razani *et al.*, 2002).

De plus, les cavéolae concentrent les récepteurs couplés aux protéines-G. Après une stimulation adrénérgique les récepteurs β_2 adrénérgique quittent les caveolae. Par contre la stimulation des récepteurs β_1 et β_2 bradikinine conduit à leur déplacement à l'intérieur des cavéolae. Le déplacement de ces récepteurs à l'intérieur ou à l'extérieur des caveolae induit leur participation dynamique dans la transduction du signal (Razani *et al.*, 2002).

7- Relations structurales des cavéolines avec le cytosquelette subcortical

Des études récentes ont montré que le facteur responsable de la fission des cavéolae est un facteur dépendant du GTP (Guanosine TriPhosphate) (Schnitzer *et al.*, 1996). Ce facteur est la dynamine, impliquée aussi dans l'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine (Henley *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1998).

Par ailleurs, la cavéoline-3 est considérée comme une protéine associée à la dystrophine dans la cellule musculaire striée (figure 12). En effet, la caveoline-3 co-immunoprécipite avec les composants du DAPC: l' α -sarcoglycane, le β -dystroglycane et la dystrophine (Song *et al.*, 1996b; Sotgia *et al.*, 2000) et interagit avec des protéines qui s'associent à ce complexe comme le nNOS (Brenman *et al.*, 1995). La CAV-3 possède un domaine « WW » (domaine d'interaction protéine-protéine) unique qui lie le motif « PPXY » (existant au niveau de l'extrémité N-terminale) du β -dystroglycane. La dystrophine de son côté, par son domaine « WW », interagit avec ce même motif. L'existence d'une liaison de compétition entre la dystrophine et la CAV-3 avec le β -dystroglycane, un des composants principaux du DAPC (Sotgia *et al.*, 2000); indique que l'interaction cavéolaire avec cette moindre portion du DAPC serait nécessaire pour l'intégrité structurale du muscle squelettique (Razani *et al.*, 2002).

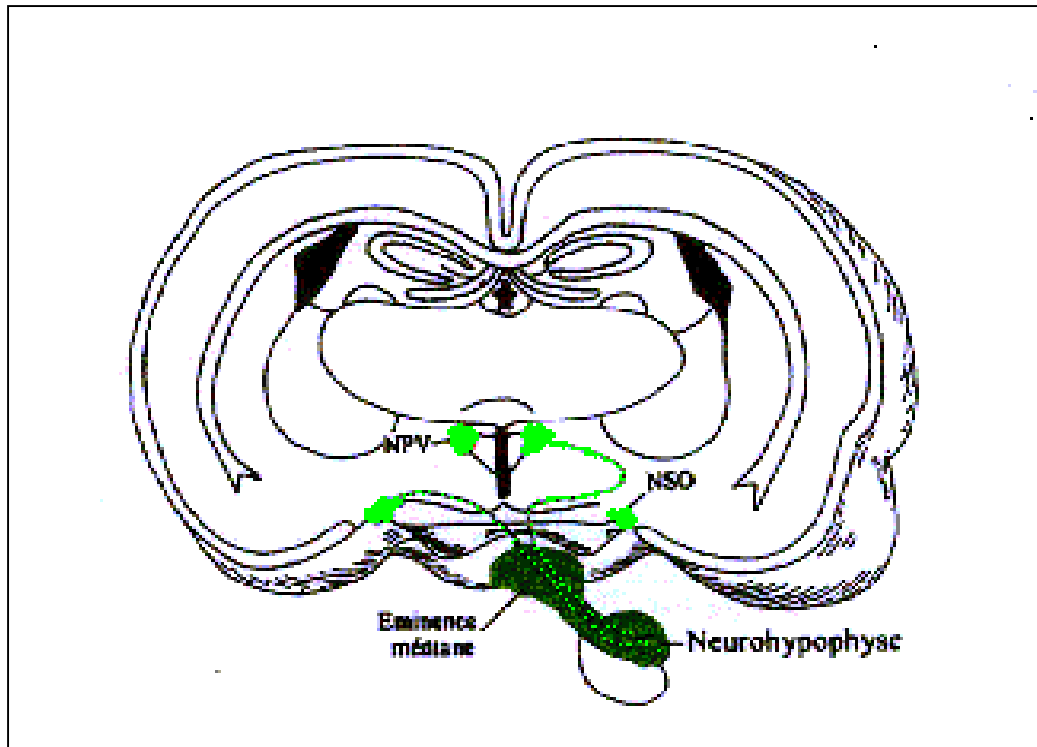


Figure1

Schéma du système hypothalamo-neurohypophysaire

(D'après Hatton, 1990)

Les noyaux supraoptiques **NSO** et les noyaux paraventriculaires **NPV** en verts ainsi que le trajet de leurs fibres projetant dans la neurohypophyse

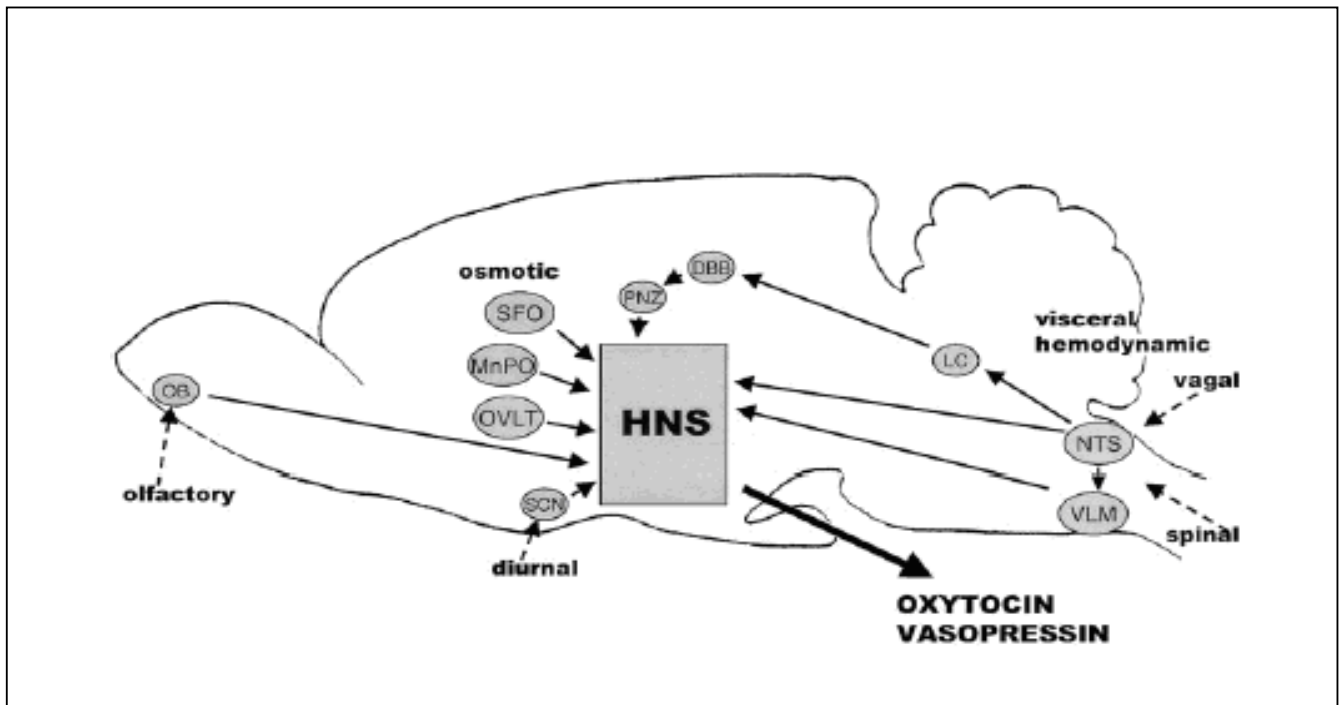
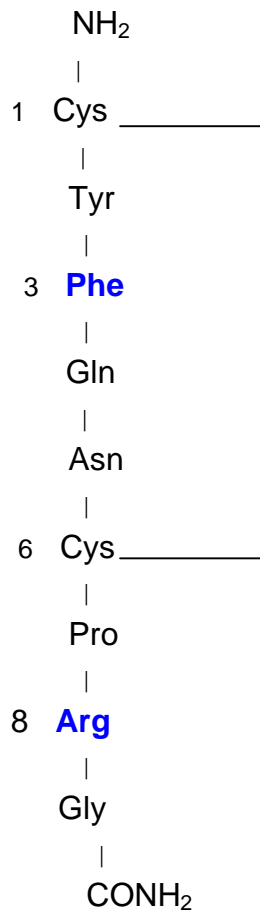


Figure 2

Schéma montrant les majeures structures nerveuses afférentes aux neurones magnocellulaires du SHN (Burbach *et al.*, 2001)

HNS : SHN ; **DBB** : Bande diagonale de Broca; **PNZ** : zone perinucléaire du noyau supraoptique et du noyau tuberomammillaire; **LC** : Locus coeruleus; **MnPO** : noyau préoptique médian; **SFO** : Organe subfornical; **NTS** : noyau du tractus solitaire; **OB** : bulbes olfactifs principaux et accessoires; **OVLT** : organe vasculaire de la lame terminale; **SCN** : noyau suprachiasmatique ; **VLM** : zone ventrolatérale de la protubérance annulaire.

Vasopressine



Ocytocine

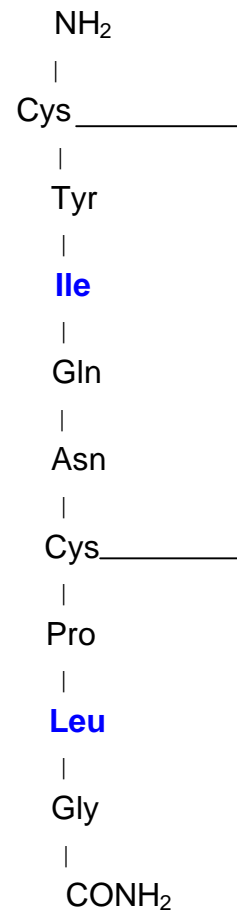


Figure3

Structure de la vasopressine et de l'ocytocine

La vasopressine ne diffère de l'ocytocine que par les aa en position 3 et 8. Un pont disulfure existe entre les résidus cystéine en position 1 et 6 dans les deux molécules

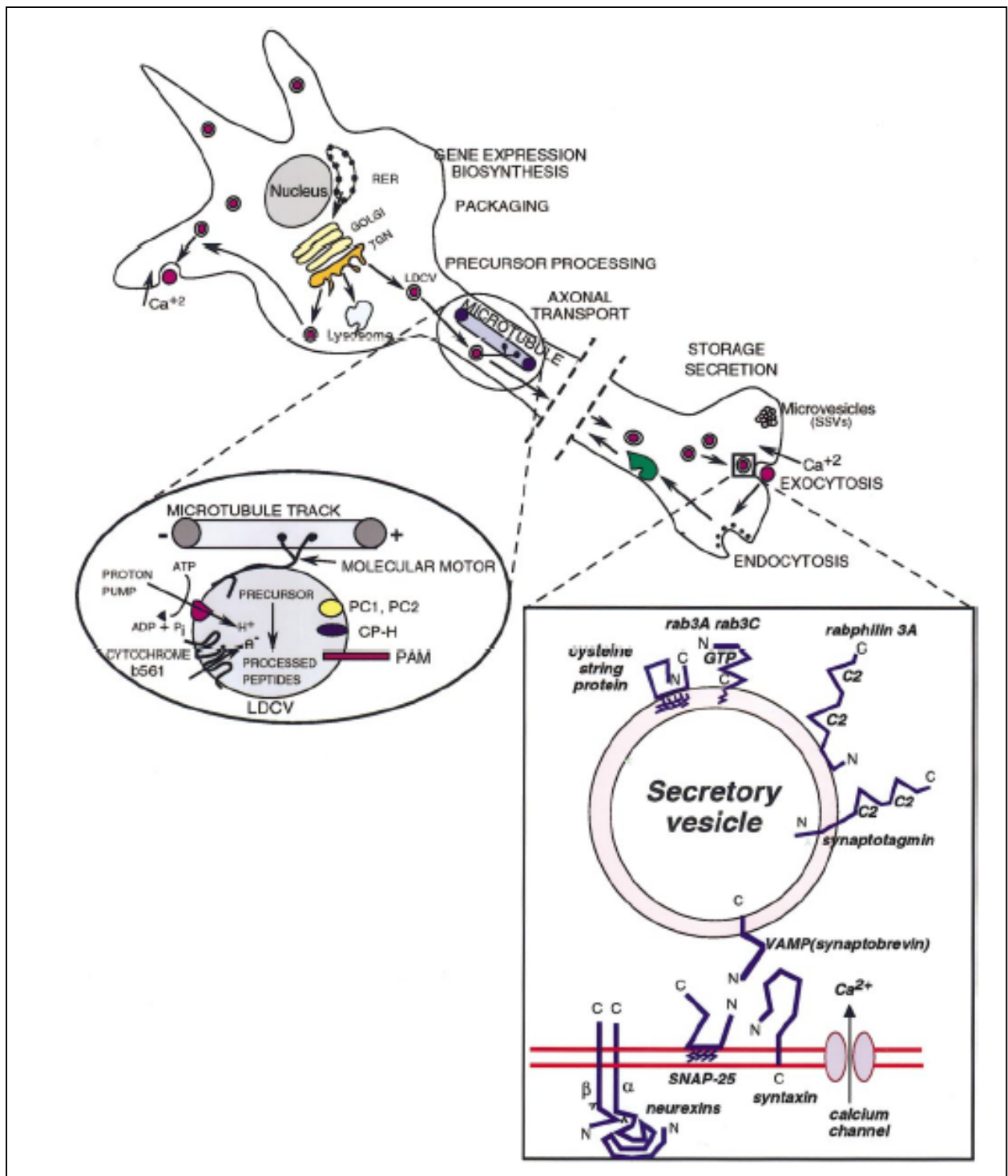


Figure 5

Schéma présentant les propriétés moléculaire d' un neurone peptidergique
(Burbach *et al.*, 2001)

La biosynthèse commence du RER jusqu'à la région trans du Golgi, là où il y a l' emballage et le bourgeonnement du produit sous forme de LDCVs ; ces dernières subissent un transport axonal antérograde vers les terminaisons nerveuses en empruntant comme support les microtubules; pendant ce trajet un phénomène de maturation peptidique s'observe dans ces granules ; une augmentation de la concentration du Ca^{++} induit l'exocytose suivie par l'endocytose de la membrane granulaire ; cette dernière subit un transport rétrograde vers le corps cellulaire pour être dégradé ou réutilisée.

LDCVs : large dense core vesiculs ; **TGN** : trans-Golgi, **SSV** :small synaptic vesiculs ; **PC1** ou **PC2** :pro-hormone convertase 1ou 2 ; **CPH** : carbopeptidase H ; **PAM** : peptidyl-glycine α -amidating monoox-ygenase.

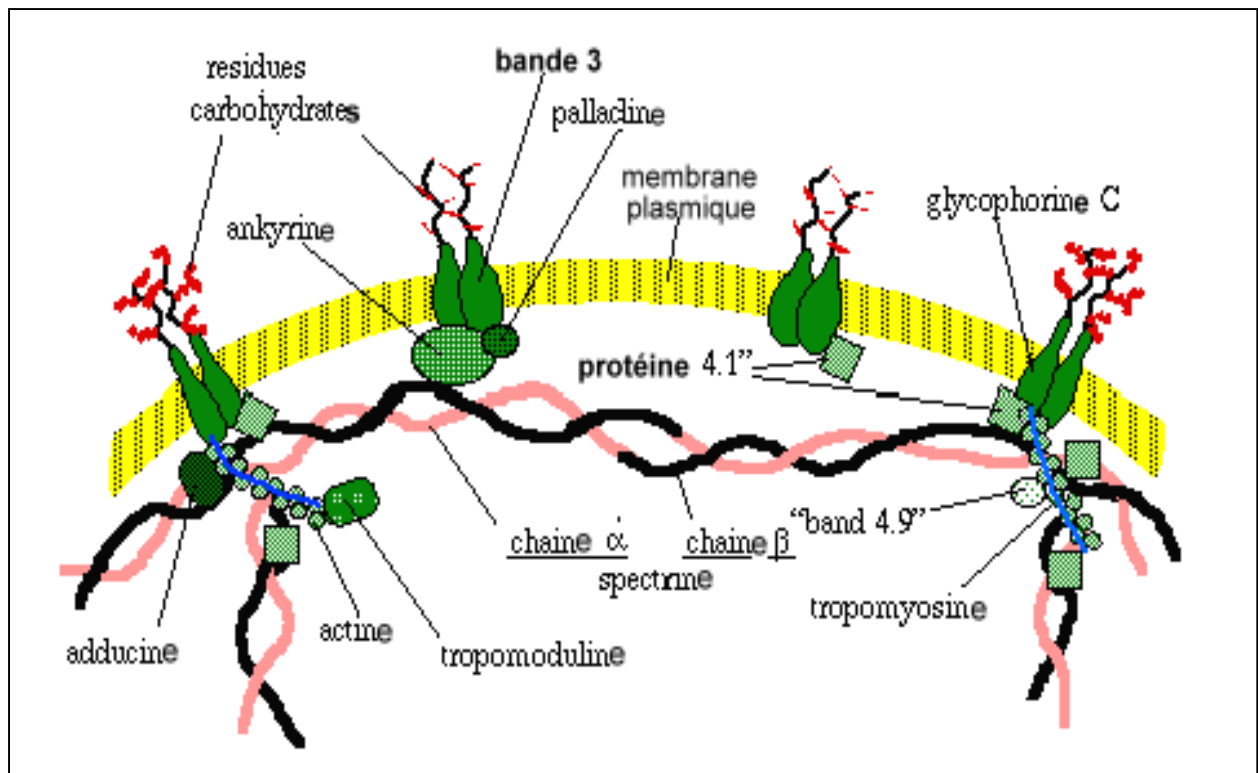


Figure 6

Complexe du cytosquelette subcortical du globule rouge

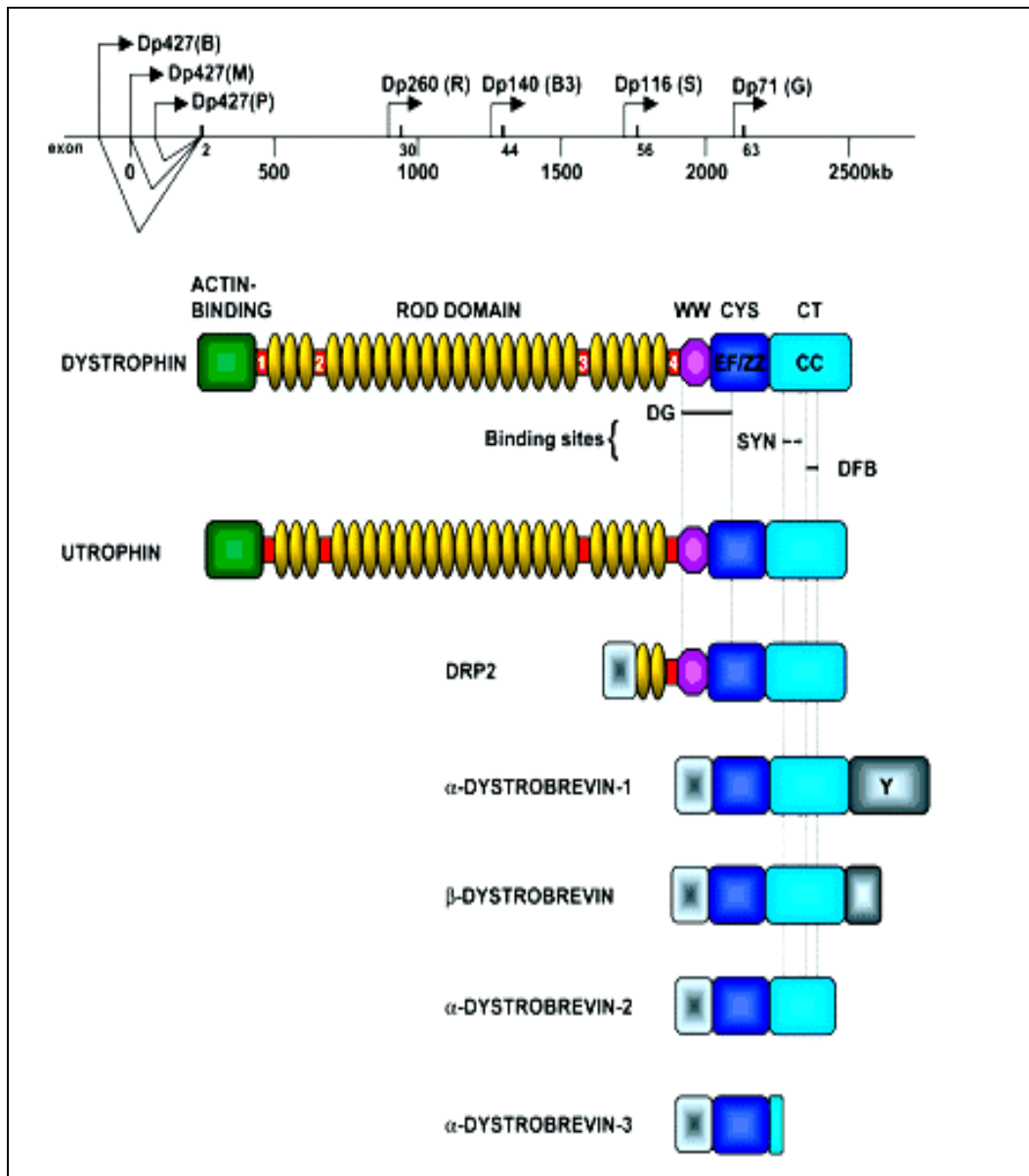


Figure 7

Schéma montrant l'organisation du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et les protéines homologues à la dystrophine

(Blake *et al.*, 2002)

Le gène DMD est de 2.5 Mb et code pour 7 différentes isoformes. Les produits de grandes tailles sont transcrits à partir de l'extrémité 5' du gène (délimitée par les flèches). Les trois produits sont désignés par la Dp427 (B)(cerveau), la Dp427 (M)(muscle), la Dp427(P)(cellules de Purkinje). Les produits de petite taille sont transcrits à partir des promoteurs localisés en aval, exprimés dans la rétine (R: Dp260), dans le cerveau (B3: Dp140), dans les cellules de Schwann (S: Dp116) et ubiquitaires (G: Dp71).

Le N-terminal de la dystrophine, le domaine central, le domaine riche en cystéine et le C-terminal, contiennent des sites de liaison à l'actine. La région riche en cystéine (**CYS**) de la dystrophine contient le domaine **WW**, le motif **Ef** et le domaine **ZZ**. Le domaine C-terminal contient deux polypeptides superenroulés (**CC**). Les 4 régions charnières riches en résidu proline (de 1 à 4) sont des sites de liaison du β -dystroglycan (**DG**), de la syntrophin (**SYN**) et des protéines de la famille des dystrophines (**DFB**).

L'utrophin est similaire à la dystrophine. La DRP2 et les dystrobrevines s'apparentent à la dystrophine seulement par leur partie C-terminal.

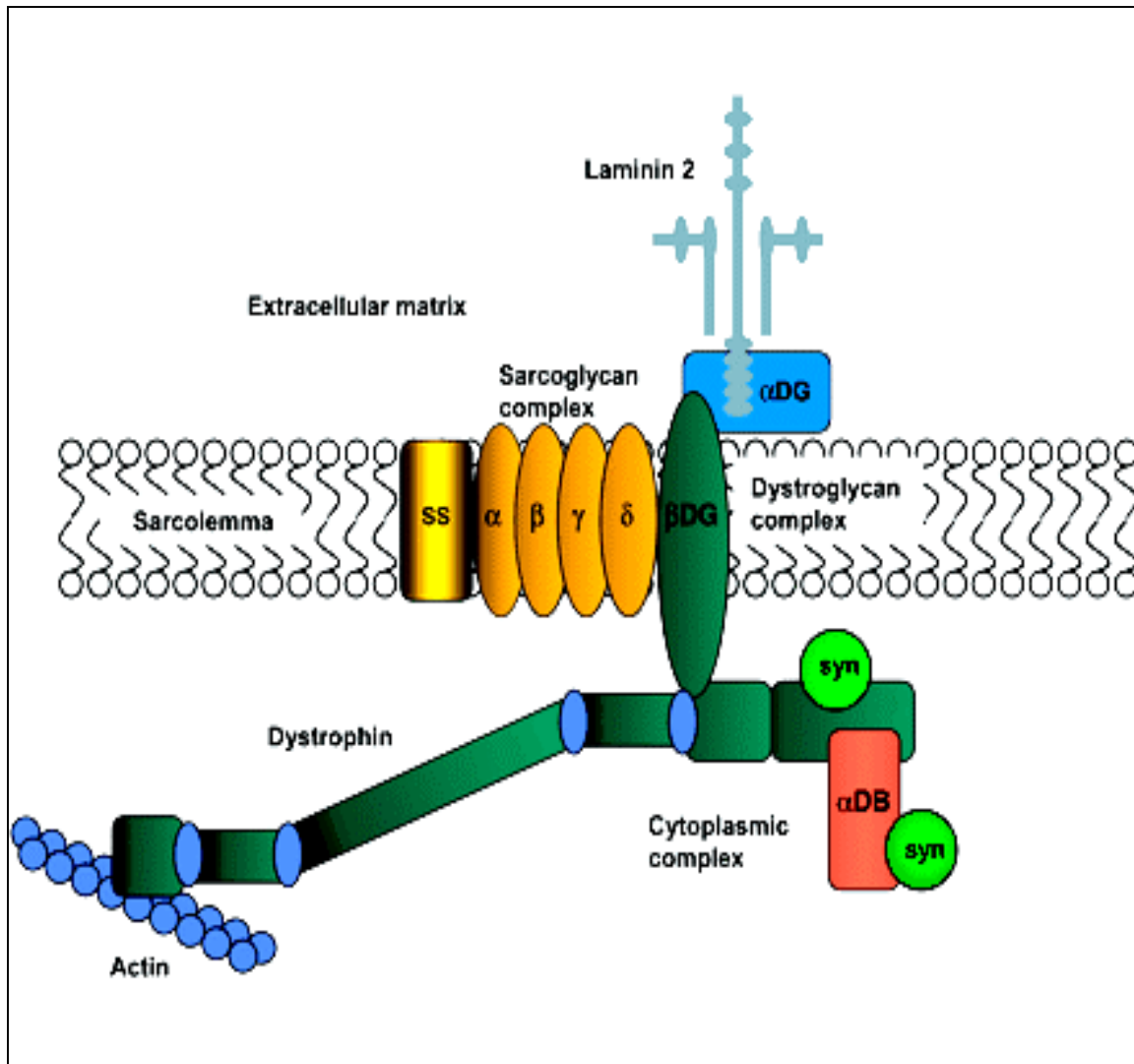


Figure 8












Schéma du complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC) dans la cellule musculaire (Blake *et al.*, 2002)

la dystrophine lie l'actine par son extrémité N-terminale. Par son extrémité C-terminale, elle lie les groupes de protéines membranaires dystroglycane, sarcoglycan-sarcospan et submembranaire syntrophins (**syn**) dystrobrevin (**α-DB**).

Le β-dystroglycane lie la dystrophine à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de l'α-dystroglycane qui interagit avec la laminine-2.



View larger version (30K):
[\[in this window\]](#)
[\[in a new window\]](#)

(DPC) in skeletal muscle. **Dystrophin** binds to cytoskeletal actin at its NH₂ terminus. At its COOH terminus, **dystrophin** is associated with a number of integral and peripheral membrane proteins that can be classified as the dystroglycan subcomplex, the sarcoglycan-sarcospan subcomplex, and the cytoplasmic subcomplex. The cytoplasmic subcomplex includes the syntrophins (syn) and -dystrobrevin (DB). The sarcoglycan-sarcospan subcomplex comprises the sarcoglycans (, , , ) and sarcospan. The extracellular component of the dystroglycan complex, -dystroglycan (DG), binds to laminin-2 in the extracellular matrix and -dystroglycan (DG) in the sarcolemma. In turn, -dystroglycan binds to the **dystrophin**, thus completing the link between the actin-based cytoskeleton and the extracellular matrix. Additional DPC binding partners are omitted for clarity, but a full list of the proteins can be found in Table [1](#).

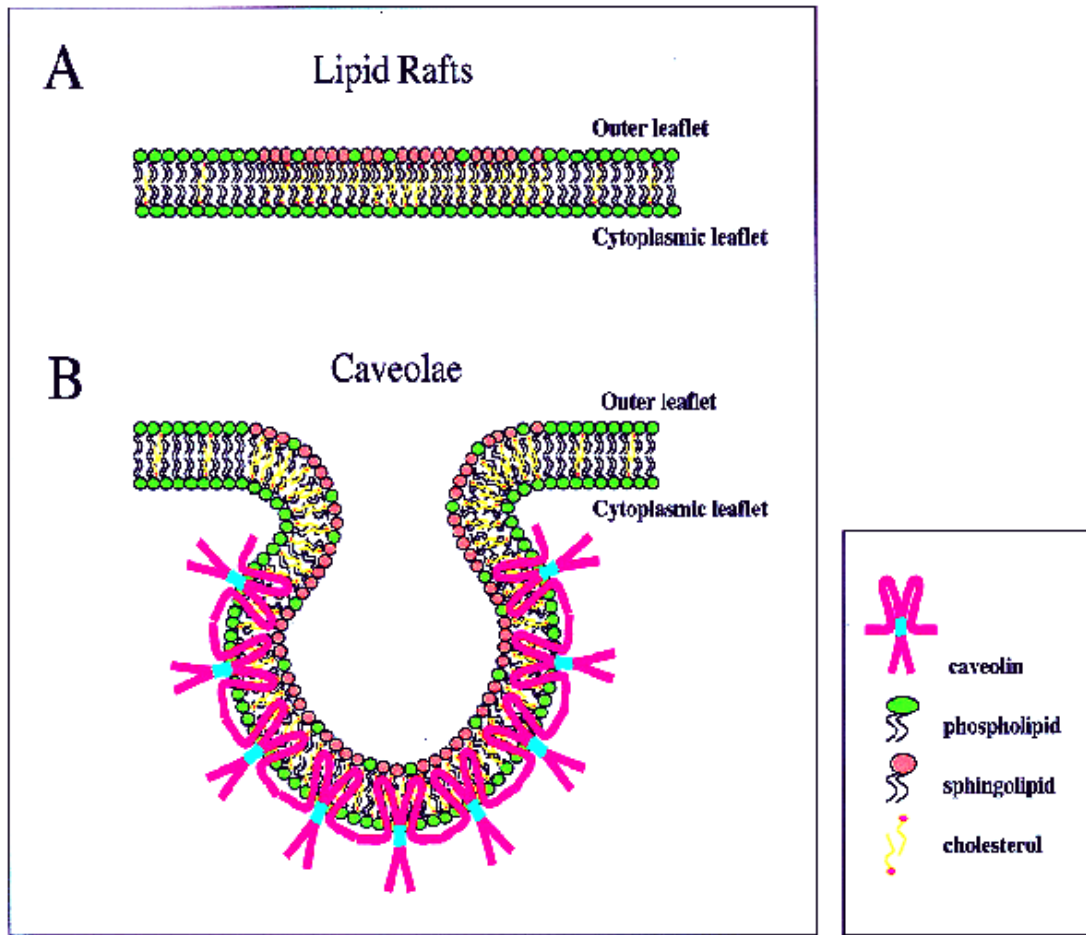


Figure 9

Organisation des domaines spécialisés « lipide rafts », ciblés par les cavéolines (Razani *et al.*, 2002)

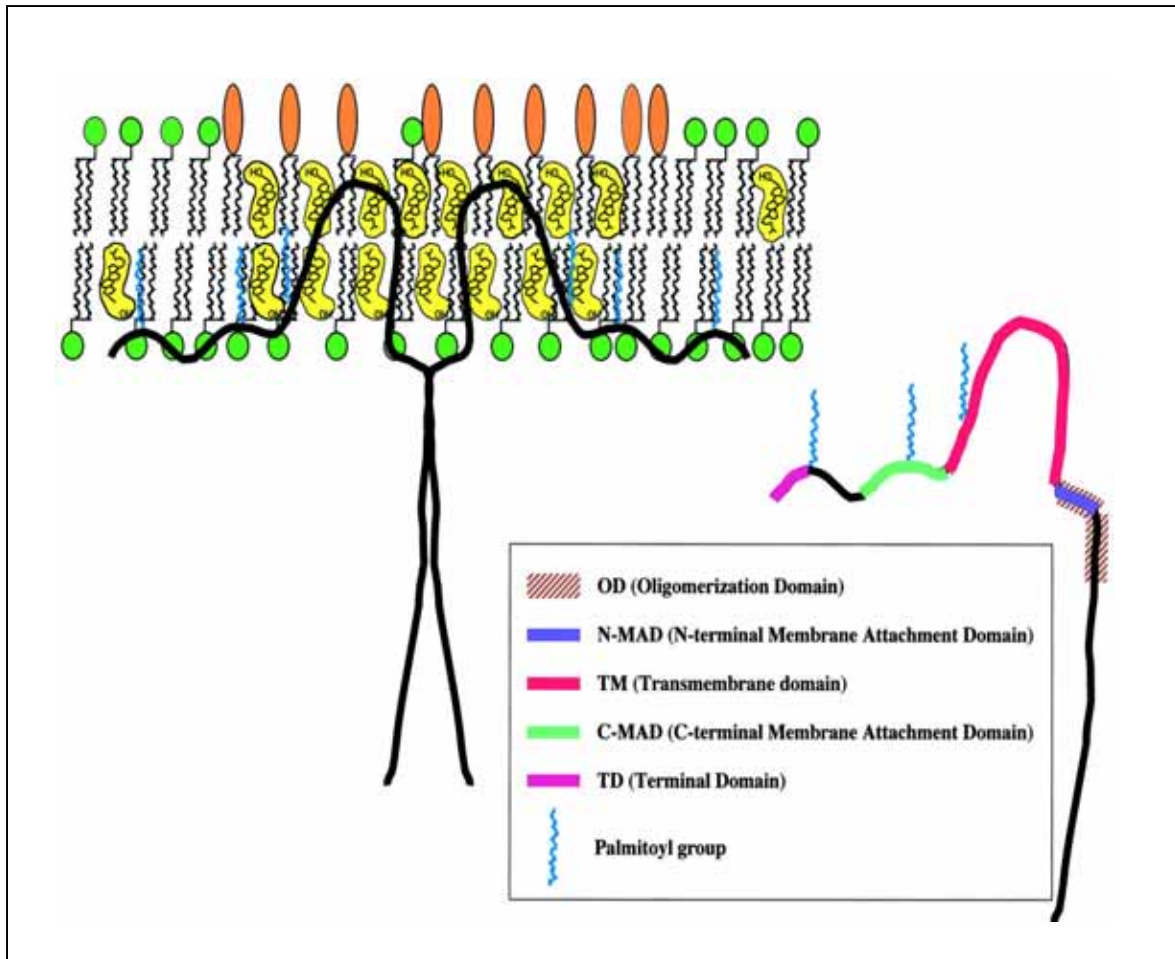


Figure 10

Structure de la cavéoline-1
(Razani *et al.*, 2002)

La CAV-1 existe sous forme d'homooligomères de 14-16 monomères (représentée en dimères pour simplifier), la CAV-1 pénètre la membrane plasmique par le domaine **TM**, le **C-MAD** et le **N-MAD** sont des domaines de liaisons étroites avec la membrane, l'**OD** est le domaine d'oligomérisation qui peut englober aussi le **N-MAD**, le **TD** est le domaine d'interaction avec l'oligomère adjacent.

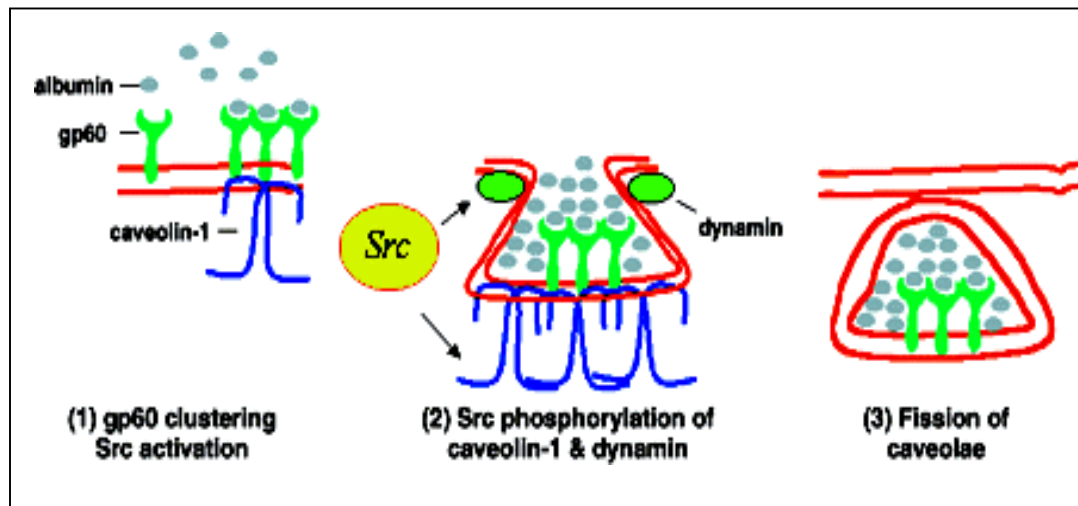


Figure 11

Rôle de la cavéoline-1 dans l'endocytose de l'albumine
(Minshall *et al.*, 2003)

Les caveolae de la cellule endothéliale sont des transporteurs de l'albumine. Une glycoprotéine de 60kDa (**gp60**) lie l'albumine et déclenche son endocytose par l'association avec la caveoline-1 et l'activation d'une enzyme kinase la **Src**. La **Src** phosphoryle la **caveoline-1** et la **dynamine-2**, ce qui va permettre le détachement de la caveolae.

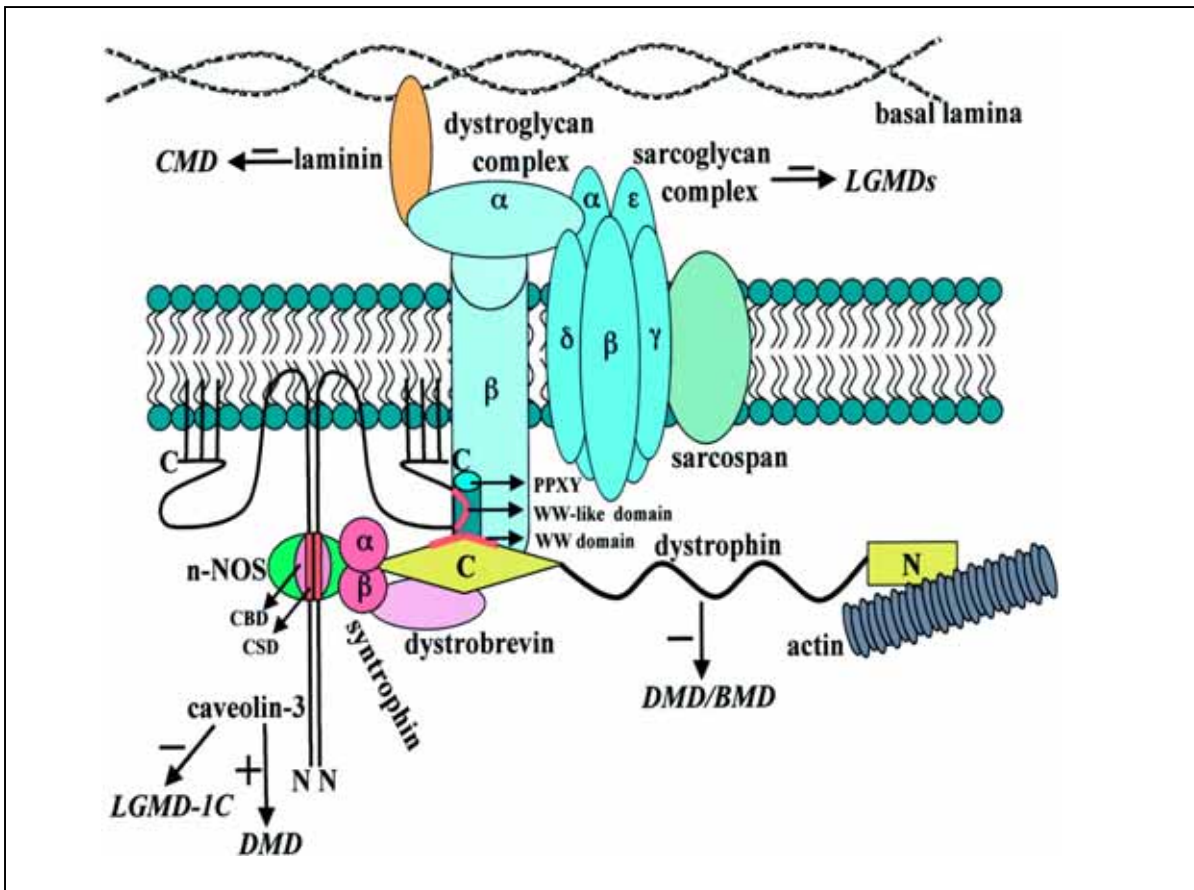


Figure 12

Schéma représentant la relation structurale entre le complexe protéique associé à la dystrophine et la cavéoline-3 au niveau de la cellule musculaire (Razani *et al.*, 2002)

Le domaine (WW) de la dystrophine et le domaine(WW-like) de la cavéoline-3 s'associent au motif (PPXY) du β -dystroglycane.

Les flèches indiquent les maladies causées par l'absence (-) ou la sur-expression (+) du gène indiqué :

BMD:Becker muscular dystrophy, **CMD**: congenital muscular dystrophy , **DMD**:Duchenne muscular dystrophy, **LGMD**: limb-girdle muscular dystrophy, **LGMD-1C**: limb-girdle muscular dystrophy type 1C.

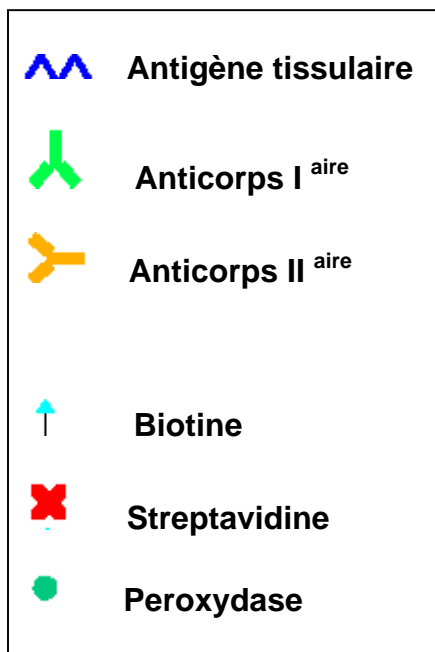
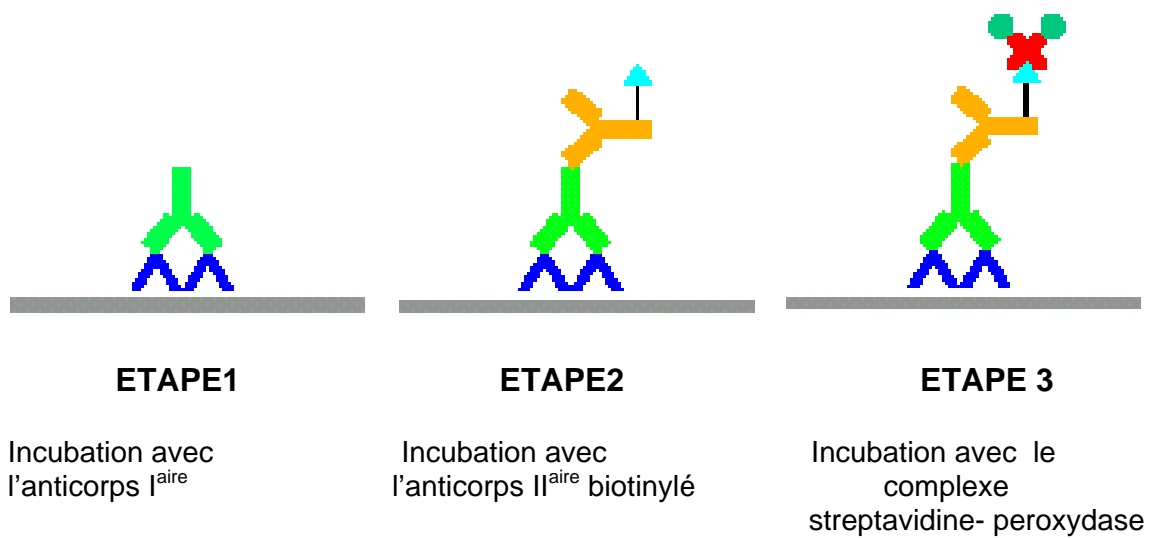


figure 14

Principe d'immunoenzymologie

1- Matériel biologique

Les cerveaux et les neurohypophyses sont obtenus à partir de rats Wistar mâles. Les poids de ces animaux varient de 200 à 290 g. Maintenus à une température de 20-25°C et un cycle d'éclairage 12/24 h. Ils reçoivent une alimentation standard; sous forme de granulés et de l'eau *ad libitum*.

Le prélèvement du matériel biologique est effectué après décapitation rapide des animaux pour l'étude biochimique et après anesthésie et perfusion pour l'étude morphologique.

2- Etude morphologique

2.1 - Préparation des coupes pour l'immunomarquage

2.1.1 - Anesthésie

L'animal est anesthésié par injection intraperitoniale de l'uréthane à 25% à raison de 1 ml/100 g de poids corporel. Après 5 à 10 minutes et avant qu'il ne perde son activité autonome, on procède à la perfusion.

2.1.2 - Perfusion

Dans le but de fixer le cerveau et hypophyse, l'animal est perfusé par voie intracardiaque à travers l'aorte ascendante par 50ml de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH :7.4 suivi par 250 ml de paraformaldehyde (voir annexe) à 4% dans du tampon phosphate 0.1M, pH : 7.4. Le débit de perfusion est maintenu à 13 ml/min et la voie de la grande circulation est supprimée par clampage de l'aorte descendante afin de diriger le liquide de perfusion vers la tête.

Après prélèvement, le cerveau et l'hypophyse sont post-fixés par immersion dans le liquide de perfusion pendant 4h à +4°C puis conservés dans du tampon phosphate 0.1 M –thimérosol 0.1% à +4°C pendant 24h.

2.1.3 - Préparations des blocs à la coupe

Le cerveau est délicatement prédécoupé à la lame de bistouri pour se rapprocher des zones hypothalamiques. L'hypophyse est placée dans un milieu d'inclusion l'agar-agar à 5%. La dissolution de l'agar s'effectue au bain-Marie à une température n'excédant pas 80°C et son agitation doit être très douce pour éviter la formation de bulles d'air qui pourraient, si elles se trouvent au contact de l'échantillon, le détacher de son milieu d'inclusion lors de la coupe.

2.1.4 - Coupes au vibratome

Le bloc est collé à la colle forte « super-glue » sur le support du vibratome (AMERICAN OPTICAL -séries 1000). le bac du vibratome est rempli par du tampon PBS de telle sorte que le bloc soit complètement immergé. Les coupes sont de 50µm d'épaisseur et sont récupérées à l'aide d'un pinceau puis conservées à +4°C dans du tampon PBS ,PH 7.4-timerosal 0.1% jusqu'à leur utilisation limitée à une semaine.

2.2–Immunohistochimie: Technique immunoperoxydase sur coupes flottantes

Les coupes sont traitées par une succession d'étapes d'incubations et de lavages dans des puits (Cultur Wells), sous agitation douce et à une température de 20 à 25°C.

Les coupes sont perméabilisées par incubation d'une heure dans une solution de Triton X-100 à 0,5 % dans du tampon PBS. Cette étape est suivie par trois lavages successifs au PBS de 10 minutes chacun. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par l'incubation des coupes dans l'hydrogène peroxyde 0,3% dans du tampon PBS pendant 30 min. Cette étape est suivie comme l'étape précédente par trois lavages au PBS. Pour le blocage des liaisons non spécifiques, les coupes sont incubées dans du sérum de cheval à 5% dans le PBS pendant 1 heure. Les coupes, après avoir subi trois lavages successifs au PBS, sont incubées en présence de l'anticorps primaire monoclonal, anti-dystrophine (**DYS2**), dilué à 1/20 dans le PBS (Tableau) pendant 15 heures (ou une nuit) à +4°C ou 1 heure à 25°C dans une chambre humide. Après trois lavages successifs, on procède à l'étape de révélation qui débute par l'incubation des coupes avec l'anticorps secondaire anti-souris biotynilé, dilué dans le PBS pendant 1 heure. Après trois lavages, les coupes sont ensuite incubées dans une solution streptavidine peroxydase pendant 1 heure. Cette étape est suivie par trois lavages au PBS. Le substrat utilisé pour révéler la peroxydase est soit le diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)(DAKO® LIQUID DAB+) qui donne une coloration marron, soit le 3-amine 9- éthyle carbazole (AEC)(DAKO® AEC+ substrate-chromogen) qui donne une coloration rouge. Le temps d'incubation en présence du substrat est de 10 à 30 min à l'obscurité. La réaction est bloquée par trois lavages successifs à l'eau distillée.

Le même procédé est suivi pour la mise en évidence de la cavéoline excepté que les coupes ont été prétraité pendant 10 min avec la protéinase (DAKO® Ready-to-Use PROTEINASE K) dans le but d'un démasquage des sites antigéniques. Ce prétraitement est effectué entre l'étape de perméabilisation et l'étape de blocage de l'activité peroxydase endogène. L'anticorps **anti-Cav1**, cavéoline polyclonal est dilué à 1/100 dans du PBS (tableau 1).

La révélation consiste en une incubation pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire anti-lapin. Après 3 lavages de 10 minutes chacun, les coupes sont incubées dans une solution streptavidine peroxydase pendant 1 heure puis suivie par trois lavages. Dans notre expérimentation, nous avons choisi d'utiliser le DAB comme substrat de la peroxydase pour révéler la réaction immunologique de la cavéoline.

Il était souhaitable de cibler la localisation des astrocytes dans le NSO et le NPV et celle des pituicytes dans le LN; pour pouvoir comparer la distribution du marquage au DYS2 et à l'anti-CAV1 par rapport à leur emplacement dans ces zones. Pour cela nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-**GFAP** (DAKO® Ready-to-use, EPOS, HRP) capable de reconnaître la molécule unitaire des filaments intermédiaires spécifiques aux cellules gliales qui est la GFAP (Glial-Fibrillary-Acidic Protein). L'anti-GFAP est capable aussi de marquer positivement les cellules ependymaires.

Toujours le même procédé suivi pour la révélation de la dystrophine, est appliqué pour l'immunomarquage à l'anti-GFAP, le substrat de la peroxydase utilisé est l'AEC ou le DAB.

2.3 – Montage des coupes pour la microscopie photonique

2.3.1 - Préparation des lames gélatinées

Les lames sont dégraissées dans un bain d'alcool 95%-HCl 1N puis lavées par un détergent liquide. Ces lames sont rincées par la suite à l'eau courante pendant 1 heure puis à l'eau distillée. Les lames sont par la suite trempées dans une solution de gélatine mélangée avec l'alun de chrome dans de l'eau distillée (voir annexe). Les lames sont ensuite mises à sécher dans l'étuve à 60°C.

2.3.2 – Montage des coupes

A la fin du traitement immunohistochimique, les coupes flottantes sont délicatement étalées sous loupe binoculaire et montées sur les lames gélatinées puis mises à sécher en étuve à 60°C. Les coupes traitées par les chromogènes

insolubles dans les solvants organiques, comme le DAB, sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool à degrés croissants (70°, 95°, 100°) de 1 min chacun puis par deux bains de Xylol de 1 min chacun. Le montage entre lame et lamelle est fait au baume de Canada (Prolabo 8007-47-4).

Les coupes traitées par les chromogènes solubles dans les solvants organiques comme l'AEC sont d'abord trempées 10 secondes dans une solution 37 mM d'hydroxyde d'ammonium puis rincées dans l'eau distillée pendant 5 min et sont montées par un milieu de montage aqueux (DAKO® Faramount, aqueous Mounting medium). Les lames traitées à l'AEC sont stockées à +4°C.

3- Etude biochimique

3.1- Isolement du matériel biologique

16 rats sont décapités. L'hypophyse est délicatement prélevée par microdissection sous une loupe binoculaire. Le lobe nerveux (LN) est séparé des lobes intermédiaire et antérieur.

L'homogénéisation des LN est effectuée dans un milieu de récupération de tissus, appelé tampon MOPS (Acide morpholino-4 propanesulfonique) constitué de 20 mM MOPS, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, pH 6.8 à +4°C, auquel est ajouté, un mélange d'inhibiteurs de protéase (IP) à 1% final (voir annexe).

3.2- Préparation des fractions

Trois fractions différentes sont isolées à partir du lobe nerveux selon la méthode décrite par Nordmann et collaborateurs (1986) (figure15).

Les fractions sont obtenues après centrifugation de l'homogénat à +4°C en utilisant une microcentrifugeuse de type 5415 R.

L'homogénat est centrifugé à 800 rpm pendant 3 min. Le culot (**P₁**) obtenu est récupéré dans 100 µl de tampon MOPS/IP (voir annexe). Le **P₁** représente la fraction riche en pituicytes. Le surnageant est remis à centrifuger à 6000 rpm pendant 10 min pour obtenir un culot (**P₂**) qui est resuspendu dans 100 µl de tampon MOPS/IP et un deuxième surnageant (**S**). **S** est la fraction qui contient entre autres, les granules de sécrétions tandis que **P₂** est la fraction enrichie en neurosecretosomes.

3.3- Dosage des protéines et préparation des échantillons

Dans le but de diluer les fractions neurohypophysaires (**P₁**, **P₂**, **S**) obtenues; les protéines de chaque fraction sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant de la BSA comme standard à raison de 0.1% (voir annexe). Les protéines des fractions, sont par la suite diluées à concentration finale de 1µg/ µl avec du tampon de dénaturation de Laemmli (1970) composé de Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, Dodecyl Sulfate de Sodium 2 %, Glycérol 25 % et le Bleu de bromophenol 0.003%. Les échantillons sont chauffés au bain-Marie pendant 5 min à 100°C. Après refroidissement, on rajoute le β-mercaptoethanol à 5%. Ces échantillons peuvent être conservés à -20°C pendant plusieurs semaines.

Ce traitement confère aux protéines la même charge et la séparation s'effectuera seulement en fonction du poids moléculaire. Le SDS solubilise les protéines et se fixe dessus en masquant leurs charges natives et les transforme en polyanions. Le β-mercaptoethanol est un agent réducteur capable de rompre les ponts disulfures existant au sein des protéines.

3.4 - Séparation des protéines par Electrophorèse mono dimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse monodimensionnelle a pour but de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Elle est réalisée par l'utilisation d'un appareil à migration verticale de type (Mini-PROTEAN 3Cell BIO-RAD).

Deux gels différents sont préparés selon la méthode de Laemmli (1970) : Un gel inférieur ou gel de séparation et un gel supérieur ou gel de concentration (voir annexe). Le gel de concentration est coulé sur le gel de séparation à deux cm de hauteur, entre deux plaques de verre de dimensions (75mm x 83 mm x 1.5 mm). Un peigne de 10 puits, est placé sur le gel de concentration coulé avant sa polymérisation. Le gel de concentration assure le regroupement des protéines dispersées lors du dépôt d'échantillons.

Suivant la masse moléculaire des protéines recherchées, deux concentrations d'acrylamide/bisacrylamide sont utilisées, pour le gel de séparation: 10% pour récupérer les protéines de PM moyen et 12% pour récupérer les protéines de plus faible PM.

Pour un gel de séparation à 10%, on mélange 2.5ml d'acrylamide/bisacrylamide (40%)(38.9g d'acrylamide et 1.1g de bisacrylamide dans 100ml d'eau distillée) (voir

annexe), 2.5 ml tampon (Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 0.4% SDS) 4.9ml d'eau distillée, 1ml de glycérol, 50µl de temed et 50µl de persulfate d'ammonium à 10%. Ces deux derniers composants déclenchent la réaction de polymérisation de l'acrylamide.

Pour le gel de concentration, on mélange 0.8ml d'acrylamide/bisacrylamide 40%, 2.5ml de tampon (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 0.4% SDS), 6.6ml d'eau distillée, 10µl de temed et 100µl de persulfate d'ammonium à 10%.

Le dépôt de 20 µl d'échantillon s'effectue à l'aide d'une seringue Hamilton dans les puits formés dans le gel de concentration. Le premier puit est réservé aux protéines standards de PM connus 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6 et 4 kDa (Kit Invitrogen).

La migration se fait dans un tampon de migration composé de 25mM Tris-glycine 192mM, 0.1% SDS, pH 8.3, sous une intensité de 100 mA pendant 2 heures à température ambiante.

On procède aussi pour deux gels, l'un sera coloré au bleu de Coomassie et l'autre servira pour le Western- et le ligand-blotting.

3.4.1 - Coloration du gel au bleu de Coomassie

Après électrophorèse, un gel est coloré 30 min à 50°C dans une solution de bleu de Coomassie. La mise en évidence des protéines colorées est obtenue après décoloration du fond avec une solution de décoloration (voir annexe).

3.5 – Analyse qualitative des protéines par « western-blotting »

3.5.1- Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le transfert se déroule à température ambiante dans un tampon de transfert composé de 25mM Tris-glycine 192mM, 0.1% SDS, 20% de méthanol (V/V) PH : 8.3, sous une intensité de 100 mA pendant 1 heure et demi dans un appareil de type Genie, IDEA (Scientifique compagny, USA). Les protéines sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose de type optitran (BA-S85 : reinforced NC depoly labo ,France). La membrane de nitrocellulose a été préalablement incubée dans le tampon de transfert pendant 30 min avant le montage du « sandwich » (voir annexe).

3.5.2 - Coloration au rouge ponceau

la membrane de nitrocellulose est lavée avec l'eau distillée, puis colorée pendant 15 min par une solution contenant 0.5% de rouge Ponceau, 20% de

méthanol et 1% d'acide acétique. Les protéines apparaissent, après décoloration de la membrane par simple lavage à l'eau distillée. La décoloration totale est obtenue par lavage de la membrane avec le tampon PBS-T(Phosphate Buffered Saline-Tween) (voir annexe).

Cette coloration a pour but de s'assurer que les protéines ont été complètement transférées du gel vers la membrane de nitrocellulose et de visualiser le trajet de leur migration ; Ce qui permettra une meilleure découpe de la membrane de nitrocellulose en bandes qui seront séparément traitées par des anticorps différents.

3.5.3-Immunoréplique

La détection immunologique des protéines sur les membranes de nitrocellulose, est réalisée après blocage pendant 1 heure à température ambiante des sites non spécifiques par 1% de BSA (p/v) / 3% lait écrémé (p/v) dans une solution de PBS-T (voir annexe). Les membranes sont ensuite lavées 3 fois successivement 10 min et incubées pendant 15 heures à 4°C avec les anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines à détecter (tableau).

3.5.4 - Révélation

Après trois lavages successifs de 10 min chacun, sous agitation, la révélation est réalisée par l'utilisation du kit DAKO LSAB®+. Un second anticorps biotinylé, dilué avec le tampon PBS-T, est incubé avec la membrane pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C. L'anticorps secondaire doit être produit chez le lapin s'il s'agit d'un anticorps primaire polyclonal ou produit chez la souris s'il s'agit d'un anticorps primaire monoclonal. Trois lavages successifs de 10 min sont nécessaires avant l'incubation de la membrane, pendant 1 heure entre 20 à 25°C, dans une solution streptavidine–peroxydase/PBS-T. Après trois lavages, les membranes sont incubées à l'obscurité avec la solution DAB (voir annexe) de 10 à 30 min. La réaction est stoppée par 3 lavage successives de la membrane à l'eau distillée 3 fois, pendant 10 min chacun.

3.6 - Technique du « Ligand Blotting »

Cette technique est choisie dans le but de rechercher une liaison structurale pouvant exister entre la cavéoline et la dystrophine. Etant donnée que la cavéoline-1 est la protéine structurale prédominante des caveolaes, nous utilisons dans notre expérimentation les cavéolaes comme le porteur du ligand qui est la cavéoline. Les

cavéolaes sont un don d'un laboratoire étranger offert par le Docteur Gerard Cremel (Centre de neurochimie, Unité 338, Université Louis Pasteur, Strasbourg). Comme il est mentionné plus haut, les protéines des trois fractions (P₁, P₂, S) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS puis électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose.

Après coloration au rouge ponceau suivie d'une décoloration totale, la membrane est incubée 1 heure à 4°C sous agitation dans une solution 3% lait écrémé(p/v) / BSA 1% (p/v), dans du tampon PBS-T. Après un lavage de 10 min, la membrane est équilibrée pendant 10 min dans le tampon d'overlay (de recouvrement) (25mM Hepes pH : 7.0, 0.5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.9M glycérol, 1 mM NaN₃, 4 mM MgSO₄ , 0.1% Tween-20, 3% BSA) puis incubée 15 heures à +4°C, sous agitation avec les caveolaes, à raison de 40 µg /ml dans le tampon overlay. La membrane, par la suite, est lavée avec le tampon overlay et recouverte avec du papier filtre Whatman puis mise à sécher à température ambiante. Cette dernière étape sert à stabiliser la liaison entre la protéine transférée sur la membrane de nitrocellulose et le ligand qui lui est spécifique.

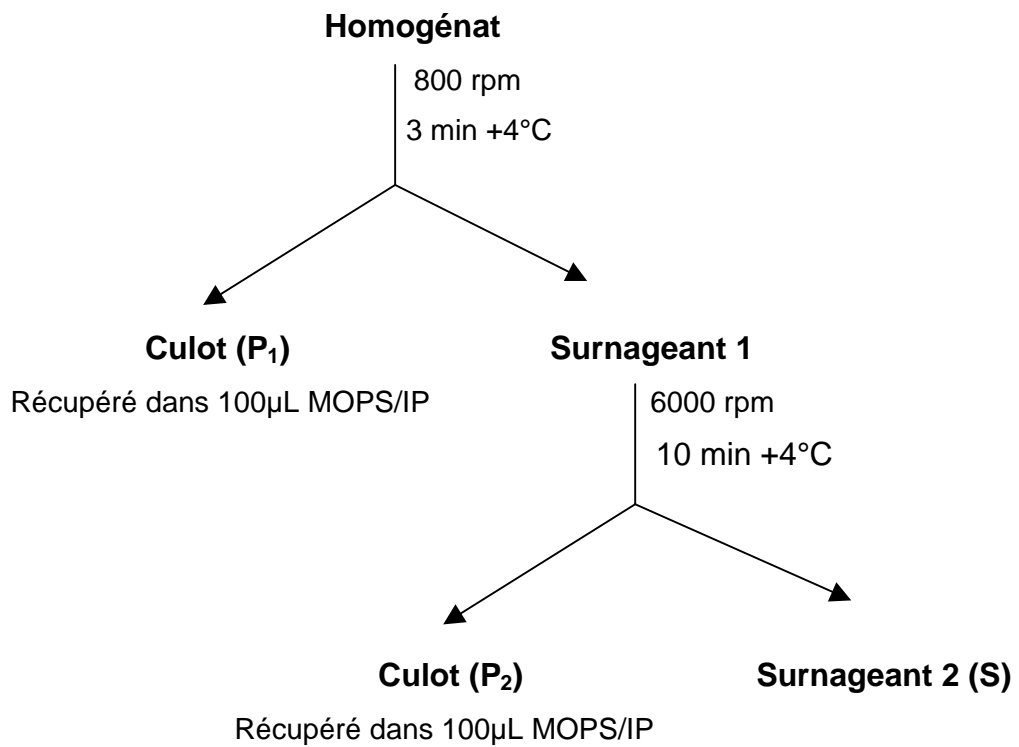
La membrane une fois séchée, est réhydratée avec le tampon PBS-T puis incubée avec l'anticorps anti-Cav1 dilué à 1/5000 pendant 15 heures sous agitation à +4°C.

3.6.1 - Mise en évidence de l'interaction

Après trois lavages successifs de 10 min chacun sous agitation, la révélation de la cavéoline est réalisée par l'utilisation du kit DAKO LSAB®+. Un second anticorps anti-lapin biotinylé dilué avec le tampon PBS-T est incubé avec la membrane pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C. Trois lavages successifs de 10 min sont nécessaires avant l'incubation de la membrane pendant 1 heure entre 20 à 25°C avec une solution streptavidine–peroxydase/PBS-T . Après 3 lavages successifs, la membrane est incubée à l'obscurité avec la solution DAB de 10 à 30 min. La réaction est stoppée par 3 lavage successifs de la membrane, pendant 10 min chacun à l'eau distillée.

anticorps	Nomenclature	Type	Dilution		épitope
			WB	IH	
Anti-dystrophine	DYS ₂	monoclonal	1/1000	1/20	Ext. C-terminal 3669 –3685 de la DP 427
Anticavéoline	Anti-cav1	polyclonal	1/5000	1/100	Ext. N-terminal de la cav1

**Tableau des dilutions des anticorps utilisés en Immuno-histochimie (IH)
et en Western-blot (WB)**



P₁ : fraction enrichie en pituicytes

P₂ : fraction enrichie en neurosécrétosomes

S : fraction contenant entre autres des granules de sécrétion

Figure 15

Préparation des fractions à partir des lobes nerveux hypophysaires

I- Immunoréactivité des cavéolines et des dystrophines dans l'axe Hypothalamo-neurohypophysaire

I.1- Au niveau du noyau supraoptique (NSO) : (Planche1)

I.1.1- immunoréactivité de la dystrophine (Dp)

Pour la dystrophine, le substrat utilisé pour la révélation du second anticorps combiné à la peroxydase; est le 3-amine 9-éthyle carbazole (AEC). L'AEC donne une coloration rouge en présence de la peroxydase.

La planche1A, présente une immuno-réaction positive au niveau du NSO qui jouxte latéralement le chiasma optique (CO). Au niveau de la limitante gliale ventrale (LGV); zone du regroupement des dendrites des neurones magnocellulaires et des expansions astrocytaires (flèches), le marquage augmente d'intensité et présente un aspect filamenteux.

La planche1B montre qu'au fort grossissement, les neurones magnocellulaires sont marqués au niveau des régions périphériques (flèches noires). De plus, des structures qui semblent être des coupes transversales de vaisseaux sanguins sont immunopositives à cet AC (flèches vertes). Ce dernier marquage pourrait être localisé au niveau des pieds d'astrocytes perivasculaires (voir immunomarquage du GFAP des cellules gliales :Planche 4 A).

Planche1. Immunoréactivité de la dystrophine (Dp) et de la cavéoline (Cav) sur coupe au vibratome du noyau supraoptique du rat.

- 1- Localisation par immunoperoxydase (AEC) de la dystrophine par le DYS2. . A (x100), B (x200), C (x1000).
- 2- Localisation par immunoperoxydase (DAB) de la cavéoline par l'anticorps anti-CAV1. D (x100), E (x200), F (x400).

CO : Chiasma Optique. N : Neurone magnocellulaire . LGV : Limitante Gliale Ventrale. Ny: Noyau.

Au plus fort grossissement (planche1C), on observe des neurones magnocellulaires présentant un marquage dont la localisation est sous-jacente à la membrane plasmique. Le marquage à ce niveau est discontinu. On remarque qu' il s'étend dans l'un des prolongements cytoplasmiques des neurones magnocellulaires (flèches noires). On observe aussi un vaisseau sanguin (flèches rouge) entouré par le même marquage (flèches vertes).

I.1.2- Immunoréactivité de la cavéoline (Cav)

Pour la cavéoline, le substrat utilisé pour la révélation du second anticorps combiné à la peroxydase, est le diaminobenzidine tetrachloride (DAB) qui donne une coloration marron en présence de la peroxydase.

La planche1 D montre une immunoréactivité positive au niveau du NSO. Un amas de neurones magnocellulaires, situés sur le côté du chiasma optique (CO) sont marqués. On remarque que leurs axones marqués quittent le noyau dans sa partie dorso-mediane et longent le chiasma optique (CO) (flèches) .

La planche1E montre, au fort grossissement, qu'en plus des neurones magnocellulaires, les parois des vaisseaux sont marquées (flèches).

Au plus fort grossissement (planche1F), les neurones magnocellulaires présentent un marquage cytoplasmique, ayant un aspect granulaire qui s'étend de la partie périnucléaire à la région périphérique du corps cellulaire. Certaines granulations sont plus denses que d'autres. Cet aspect ponctué s'étend aux prolongements cytoplasmiques de ces neurones (flèches).

I.2- Au niveau du noyau paraventriculaire (NPV) : (Planche 2)

I.2.1- immunoréactivité de la dystrophine

La planche 2 A montre la zone des noyaux paraventriculaires. On remarque une immuno-réaction positive pour la dystrophine par un marquage de couleur rouge, bien limité au niveau du NPV.

On remarque aussi dans cette figure, que la paroi du troisième ventricule, constituée de cellules épendymaires, réagit fortement à l'anticorps dirigé contre les dystrophines.

Les structures montrant une réaction au DYS2, au fort grossissement (figure **B**) le marquage s'observe dans les neurones magnocellulaires (flèches noires) et au niveau les vaisseaux sanguins (flèches rouges). Sur l'un de ces vaisseaux, s'applique un marquage qui semble être localisé dans les pieds astrocytaires (flèche verte) (voir immunomarquage du GFAP des cellules gliales : planche 4 **B**).

Au plus fort grossissement, la planche 2 **C** montre le détail de ce marquage sur des neurones magnocellulaires. Le marquage apparaît sous jacent-membranaire plasmique avec quelquefois une discontinuité de son intensité. Le marquage paraît également plus diffus et moins intense au niveau cytoplasmique (flèche noire). Sur des vaisseaux sanguins (flèches rouges) vient s'appliquer un marquage qui semble être localisé dans les pieds astrocytaires (flèches vertes).

I.2.2- immunoréactivité de la cavéoline

La planche 2 **D** montre une immuno-réaction positive, par la répartition du chromogène sur toute la surface du noyau paraventriculaire avec une plus grande intensité dans sa région latérale, riche en magnoneurones.

Au plus fort grossissement (planche 2 **E**), on remarque que l'intensité de ce marquage est plus importante au niveau membranaire plasmique qu'au niveau cytoplasmique des neurones magnocellulaires (flèches noires). L'aspect du marquage paraît granuleux.

De plus, un immunomarquage positif (flèches vertes) s'observe dans des structures qui butent contre les parois vasculaires (flèches rouges). Ce marquage serait localisé au niveau des prolongements des cellules gliales (astrocytes) qui forment généralement des manchons autour des capillaires.

Planche 2. Immunoréactivité de la dystrophine (Dp) et de la cavéoline (Cav) sur coupe au vibratome du noyau paraventriculaire du rat.

- 1- Localisation par immunoperoxydase (AEC) de la dystrophine par le DYS2 .
A (x100), B (x200), C (x1000).
- 2- Localisation par immunoperoxydase (DAB) de la cavéoline par l'anticorps anti-CAV1. D (x100), E (x200), F (x1000).

3V: Troisième Ventricule. N: Neurone magnocellulaire. Ny: Noyau.

Au plus fort grossissement (planche 2 F), on observe que le marquage d' aspect granuleux dans ce neurone magnocellulaire, s'étale depuis la surface périnucléaire jusqu'à la région sous jacente à la membrane plasmique. Ces granulations présentent des marquages hétérogènes en intensité et en taille.

I.3- Au niveau du lobe nerveux (LN) : (Planche 3)

Au niveau du lobe nerveux, le DAB a été utilisé comme substrat de la peroxydase pour la révélation des dystrophines et de la cavéoline-1.

I.3.1- Immunoréactivité de la dystrophine

La planche 3A, montre une immuno-réaction positive au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse.

On remarque au fort grossissement (planche 3B), que le marquage se répartit aussi bien à proximité des vaisseaux que dans le reste du lobe.

Au plus fort grossissement (planche3C), le marquage s'observe de façon importante dans la région périvasculaire (flèches blanches). A ce niveau, l'observation au microscope photonique ne permet pas de distinguer la localisation du marquage, il semble que les pieds des pituicytes perivasculaires qui soient porteurs de cette immunoréaction (voir immunomarquage du GFAP des cellules gliales : planche4 C et D) et/ou les terminaisons nerveuses des NMC.

I.3.2- Immunoréactivité de la cavéoline :

La planche3D présente un marquage au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse.

Planche 3. Immunoréactivité de la dystrophine (Dp) et de la cavéoline (Cav) sur coupe au vibratome de l'hypophyse du rat.

- 1- Localisation par immunoperoxydase (DAB) de la dystrophine par le DYS2.
A (x100), B (x200), C(x1000).
- 2- Localisation par immunoperoxydase (DAB) de la cavéoline par l'anticorps anti-CAV1. D (x100), E (x200), F(x1000).

LA : Lobe Antérieur. LI : Lobe Intermédiaire. LN : Lobe Nerveux. VS : Vaisseau Sanguin. * Cytoplasme

Le marquage dans le LN est plus important et plus significatif par rapport aux deux autres lobes (intermédiaire et antérieur).

Au fort grossissement (planche3 E), le marquage s'observe essentiellement aux régions perivasculaires. En effet, les capillaires sanguins sont fortement marqués en périphérie.

planche3 F, présente un gros vaisseau sanguin dont la périphérie est fortement marquée. Ce marquage semble suivre le trajet des prolongements de pituicytes (flèches blanches) dont les noyaux s'observent à proximité (flèches vertes). On remarque qu'au niveau cytoplasmique de ces cellules gliales, le marquage est d'aspect granuleux et concentré au niveau perinucléaire (voir immunomarquage du GFAP des cellules gliales : planche4 C et D).

1.4-Immunomarquage du GFAP des cellules gliales : (Planche 4)

1.4.1- Au niveau du noyau supraoptique :

La planche 4 A montre un immunomarquage positif au GFAP dans le NSO. Ce marquage augmente d'intensité au niveau de la limitante gliale ventrale (LGV) et au niveau du contour vasculaire (flèche noire).

1.4.2- Au niveau du noyau para ventriculaire :

On remarque dans la planche 4 B, que le marquage est plus important au niveau

FIGURE 4. Immunomarquage des cellules gliales du système hypothalamo-neurohypophysaire par le GFAP

A -Localisation par Immunoperoxydase (AEC) des cellules gliales au niveau du noyau supraoptique (x100)

B -Localisation par immunoperoxydase (AEC) des cellules gliales au niveau du noyau paraventriculaire (x200)

C , D- Localisation par immunoperoxydase (DAB) des cellules gliales au niveau de la neurohypophyse C (x100), D (x400).

CO : Chiasma Optique. LGV : Limitante Gliale Ventrale. 3V: Troisième ventricule
LI : Lobe Intermédiaire. LN : Lobe Nerveux.

de la paroi du troisième ventricule (**3V**) et dans des prolongements butant sur cette dernière. Le marquage est observé aussi au niveau perivasculaire (flèches vertes).

1.4.3- Au niveau du lobe nerveux :

On remarque dans la planche 4 C que l'immunomarquage au GFAP se répartie uniformément sur tout la surface du LN; suivant des trajets filamenteux qui semblent être des prolongements pituicytaires. Le marquage s'observe aussi au niveau de la périphérie des vaisseaux (flèche verte).

Au plus grossissement planche 4 D , le marquage (flèche verte) présente un aspect filamenteux qui semble buter contre les parois vasculaires (flèches noires).

En récapitulatif, les résultats obtenus, semblent montrer une distribution relativement similaire entre les dystrophines et la cavéoline-1. Cependant leurs présences sont qualitativement différentes. Ces deux protéines présentent une distribution similaire avec celle des cellules gliales du SHN.

II- Immuno-Détection des dystrophines et de la cavéoline-1 au niveau des fractions neurohypophysaires

Le gel coloré au bleu de Coomassie (planche 5) montre la présence de protéines de différents poids moléculaires (flèches) dans les trois fractions neurohypophysaires **P₁**, **P₂** et **S**, avec une prédominance pour les protéines de faible PM.

II.1- Immuno-détection des dystrophines et de la cavéoline-1 par western-blotting :

Avant d'entreprendre l'étude sur la liaison possible de la cavéolin-1 et des dystrophines dans la neurohypophyse , nous avons voulu vérifier qu'elles y sont exprimées.

La planche 6 montre une membrane de nitrocellulose traitée par l'anticorps **DYS2**. On remarque que l'anticorps **DYS2** réagit positivement dans les trois fractions avec

des protéines de poids moléculaires différents. La protéine immunopositive au DYS2 dont le PM est supérieur à 250 kDa, est présente dans les trois fractions neurohypophysaires. Cette protéine pourrait correspondre à la Dp 427. La protéine qui se situe par rapport au marqueur de PM entre 148 et 98 kDa dans les fractions P₁ et P₂, correspond probablement à la dystrophine de 116 kDa (Dp116).

Dans la planche 7, la membrane de nitrocellulose traitée par l'anticorps anti-cav1 montre que l'anticorps réagit positivement avec une protéine de 22 kDa dans les fractions P₁ et S. Il s'agit de la cavéoline-1.

L'anticorps reconnaît aussi une protéine dans la fraction P₁ ayant un poids moléculaire de 400 kDa. Ceci correspondrait au complexe oligomérique des cavéolines. Ce complexe est connu avoir un PM entre 300 et 400 kDa.

II.3- Immuno-détection de l'interaction des cavéolines:

La planche 8 montre la membrane de nitrocellulose contenant les fractions neurohypophysaires, incubées dans un premier temps avec les cavéolines (ligand). La fixation du ligand sur cette membrane est révélée par l'anticorps anti-Cav1. On remarque que l'anti-Cav1 réagit dans les trois fractions avec une protéine ayant un poids moléculaire supérieur à 250 kDa, à ce niveau serait localisée la Dp 427.

L'anti-Cav1 réagit aussi avec une protéine dont le poids moléculaire est de 116kDa . A ce niveau est révélée la Dp116.

La planche 9A présente un gel de 12%, contenant deux fractions neurohypophysaires (P₁ et S). Le gel à 12% d'acrylamide ayant des mailles plus serrées que le 10%, permet de retenir les protéines de faible PM ; l'inconvénient est que les protéines de haut PM ne peuvent pas pénétrer dans le gel de séparation. On remarque au niveau de P₁ , que l'anti-cav1 révèle une liaison avec des protéines de différents PM, avec une de 71kDa, une de 43 kDa,et une autre de 22 kDa.

Pour la fraction S, cet anticorps révèle une liaison avec une protéine de 43 kDa.

Dans la planche 9B, Une fraction témoin de surnageant cerveau dont les protéines ont été séparées par un gel de 12% a été incubée en présence de l'anticorps DYS2. Cet anticorps réagit positivement avec des protéines ayant des poids moléculaires de 427, 71 et 43 kDa.

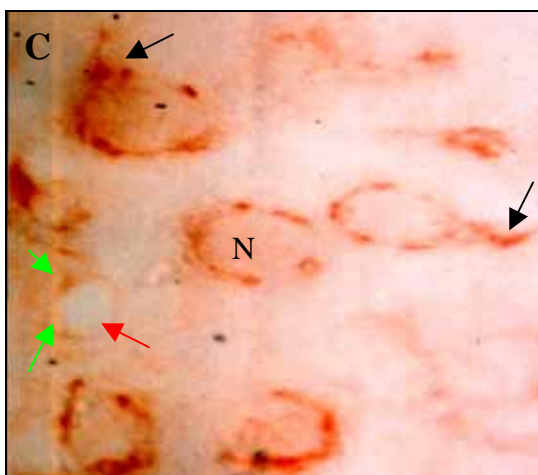
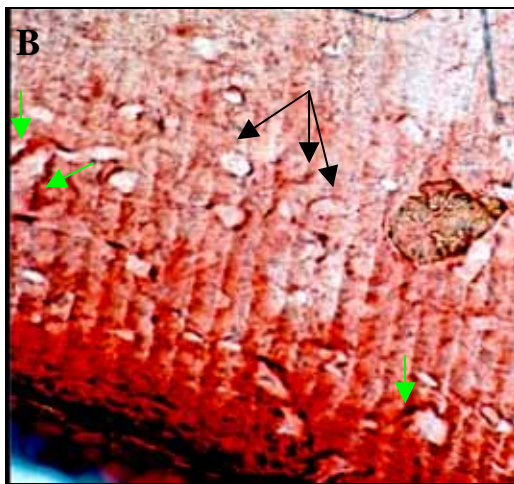
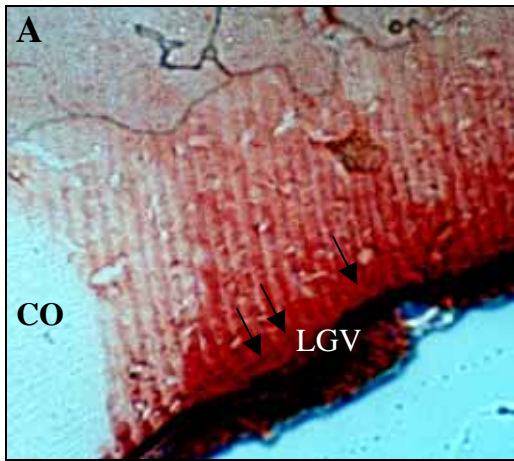
En récapitulatif :**Résultats morphologiques**

	NSO	NPV	LN
Dystrophine (DYS2)	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage important sous-jacent membranaire plasmique neuronale (Aspect discontinu) - Marquage dans des régions périvasculaire - Marquage au niveau de la 	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage important sous-jacent membranaire plasmique neuronale (Aspect discontinu) - marquage dans des régions périvasculaire - Marquage au niveau de la paroi du troisième ventricule 	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage accentué homogène dans des régions périvasculaires
Cavéoli (Anti-Cav1)	<ul style="list-style-type: none"> périnucléaire, cytoplasmique et périphérique sous-jacent à la membranaire plasmique des magnoneurones - Marquage dans des régions périvasculaire -Marquage au niveau de la limitante gliale ventrale 	<ul style="list-style-type: none"> jaçant membranaire plasmique, moins intense au niveau cytoplasmique - Marquage dans des régions périvasculaire - Marquage au niveau de la paroi du troisième ventricule 	<ul style="list-style-type: none"> périvasculaires - Marquage Cytoplasmique périnucléaire dans les cellules pituicytaires

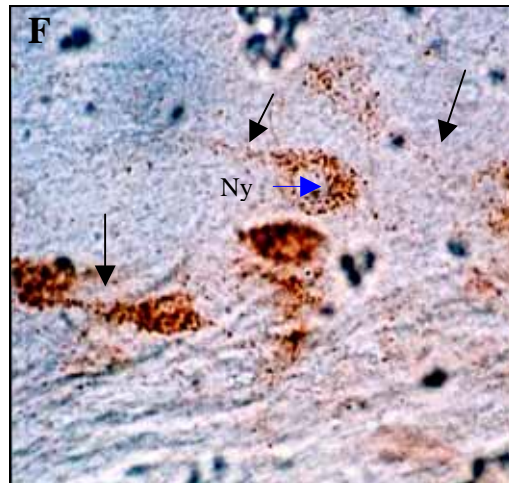
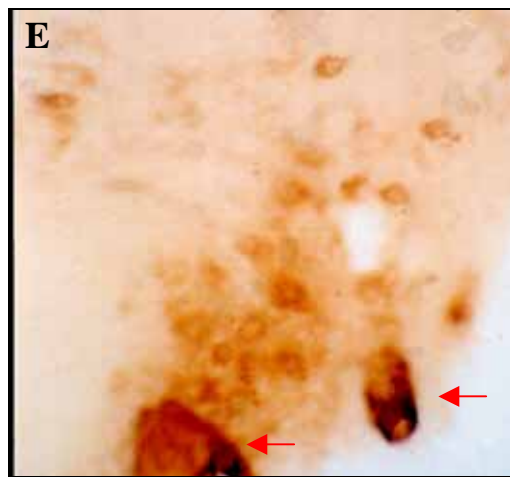
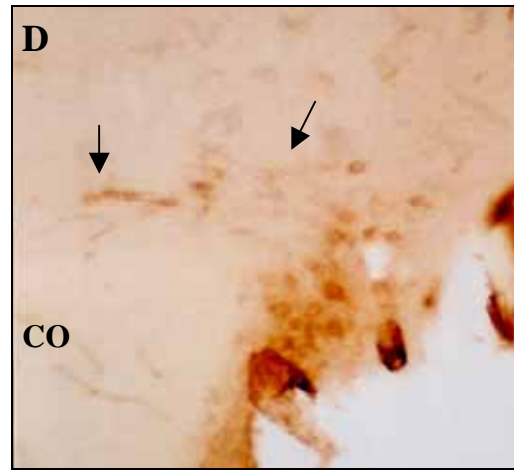
Résultats biochimiques

Anticorps		P1 (pituicytes)	P2 (neurosecretosomes)	S (surnageant riche en granules)
Fractions				
Dystrophine (DYS2)		- Une bande protéique de 427 kDa - Une bande protéique de 116 kDa	- Une bande protéique de 427 kDa - Une bande protéique de 116 kDa	- Une bande protéique de 427kDa - Une bande protéique de 71kDa
Cavéoline (Anti-Cav1)		- Une bande protéique de 400 kDa - Une bande protéique de 22 kDa	- Absence de réaction	- Une bande protéique de 22 kDa
Ligand blotting (anti-Cav1)	Gel 10%	- Liaison avec une protéine de 427 kDa - Liaison avec une protéine de 116 kDa	- Liaison avec une protéine de 427kDa - Liaison avec une protéine de 116kDa	- Liaison avec protéine de 427 kDa - Liaison avec une protéine de 116 kDa
	Gel 12%	- Liaison avec une protéine de 71 kD - Liaison avec une protéine de 43 kDa - Liaison avec une Protéine de 22kDa	Pas de fraction	- Liaison avec une protéine de 43 kDa

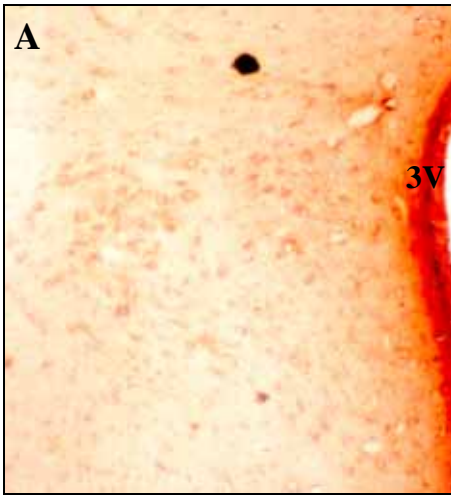
Dp



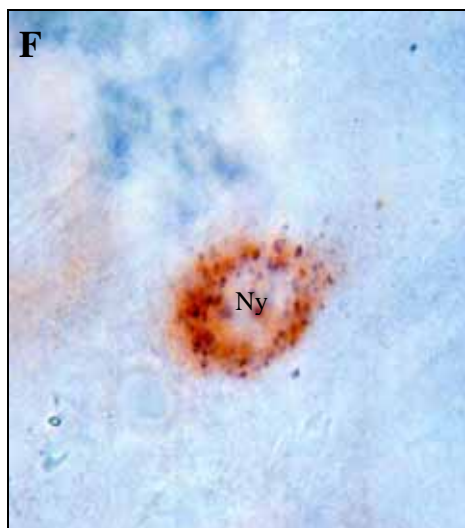
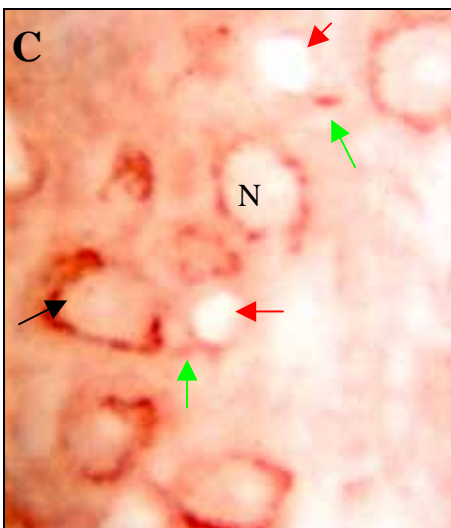
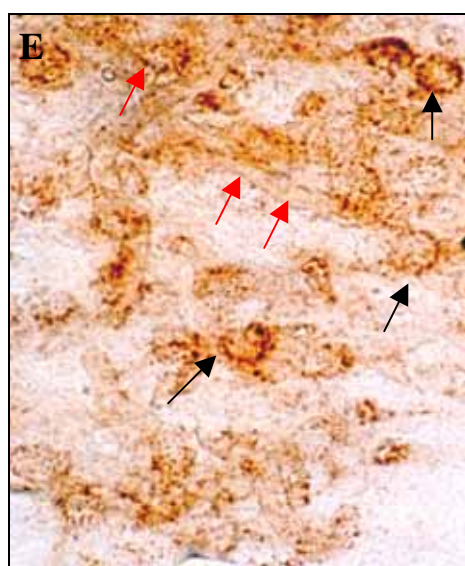
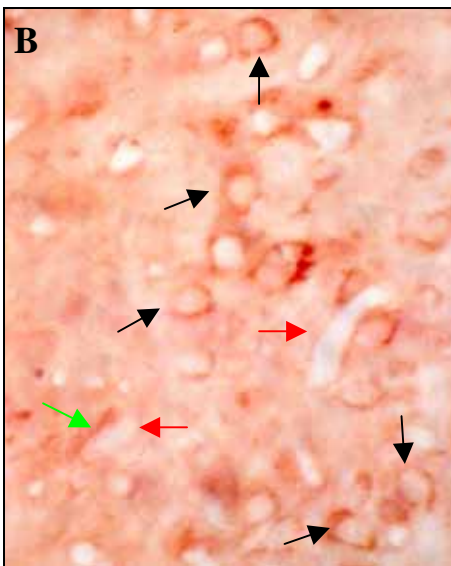
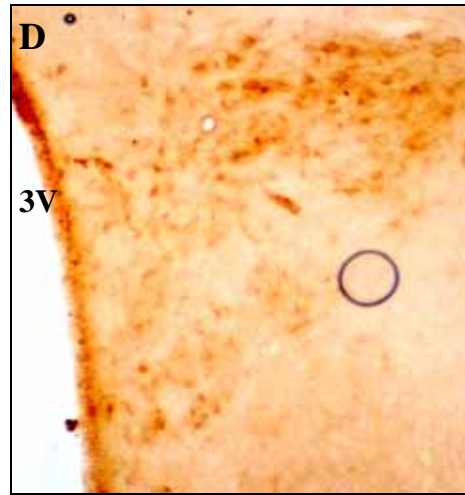
Cav



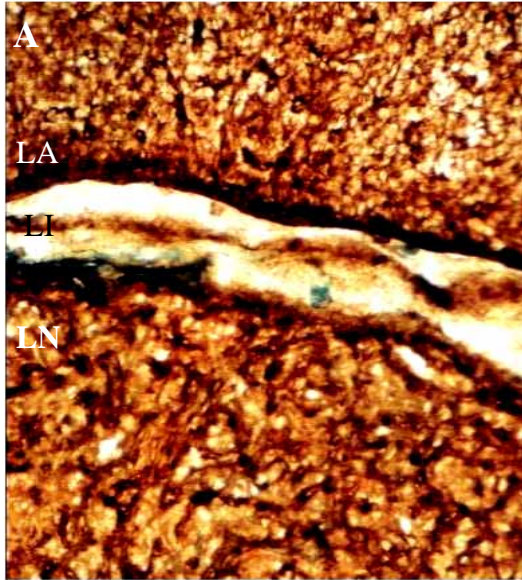
Dp



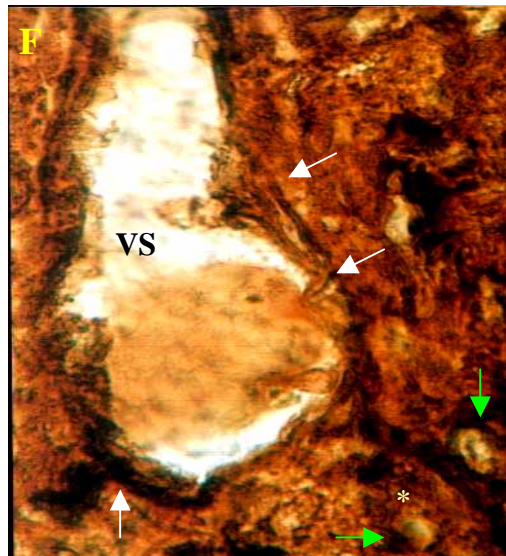
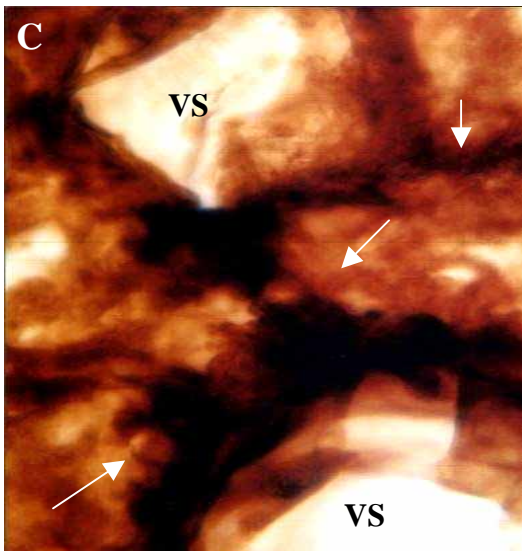
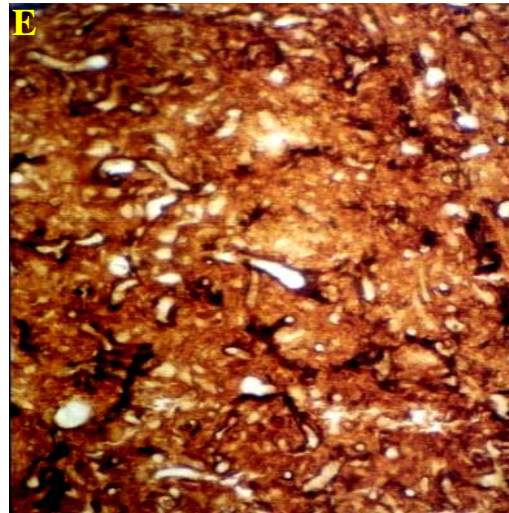
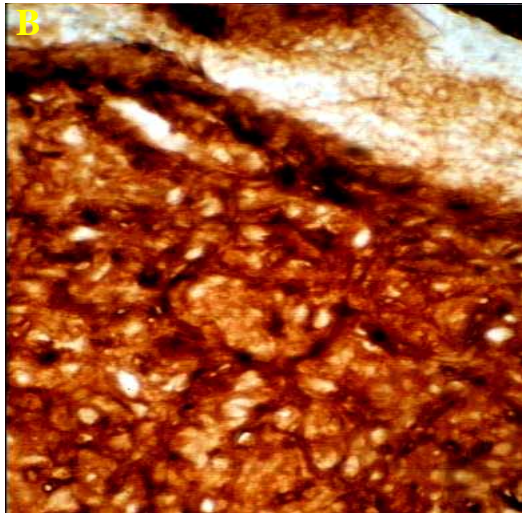
Cav



Dp



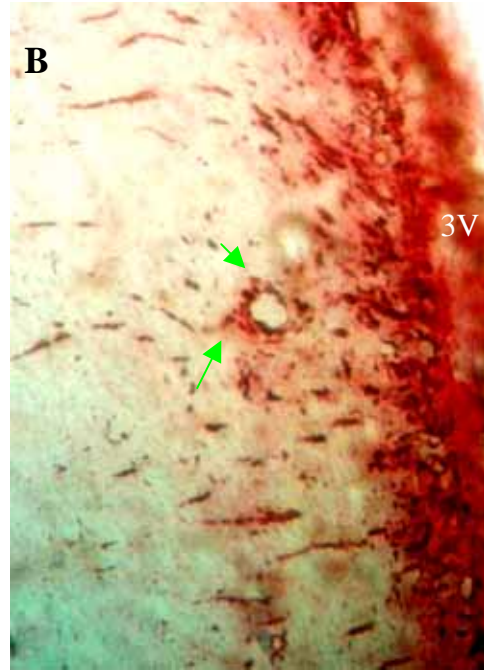
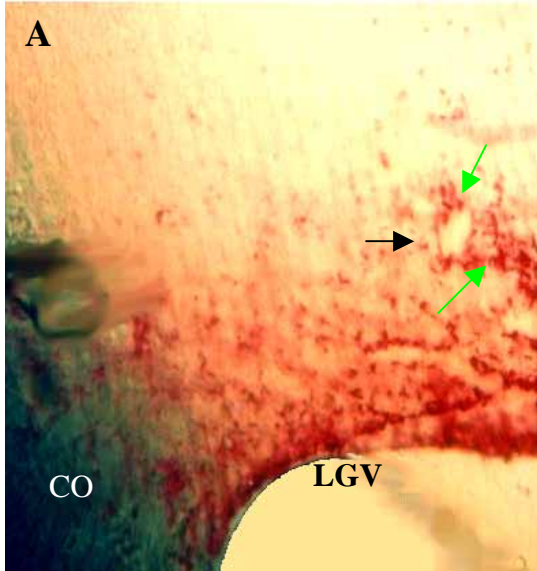
Cav



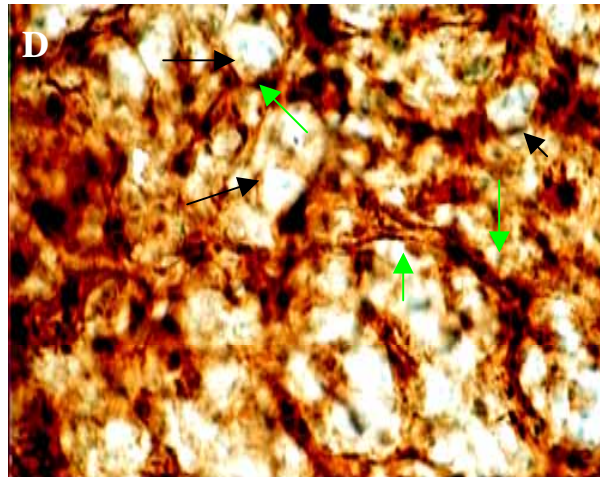
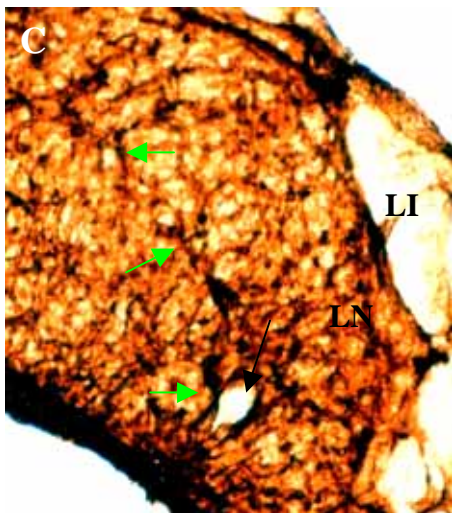
GFAP

NSO

NPV



LN



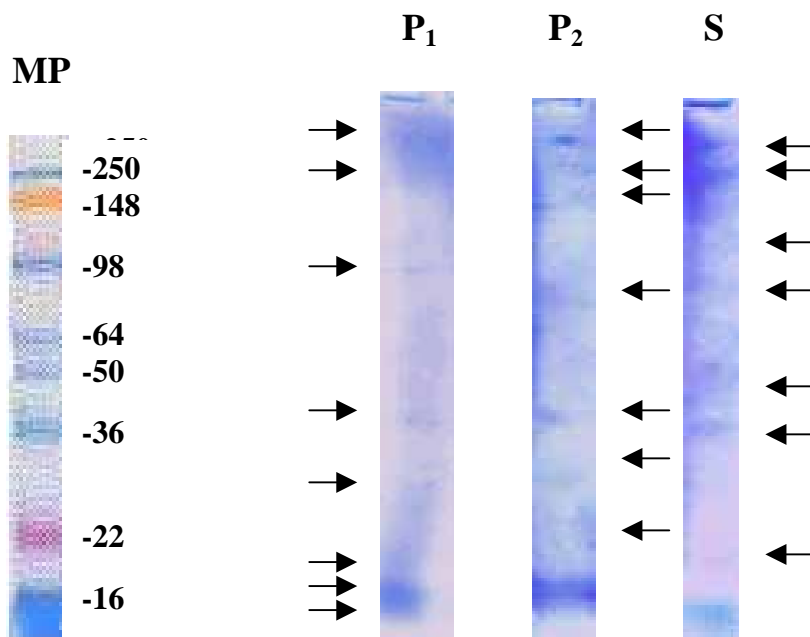


Planche5

Séparation des protéines des trois fractions neurohypophysaires

20 µg de protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide à 10%, coloré au bleu de Coomassie.

MP : Marqueur de poids moléculaire, **p₁** : fraction enrichie en pituicytes, **p₂** : fraction enrichie en neurosecrétosomes , **S** : fraction contenant des granules de sécrétion .

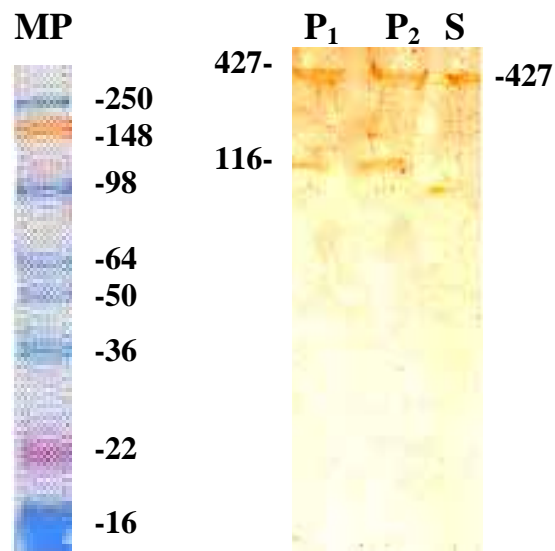


Planche6

Immunodétection de la dystrophine par le DYS2 et par des IgG combinés à la peroxydase dans les fractions neurohypophysaires

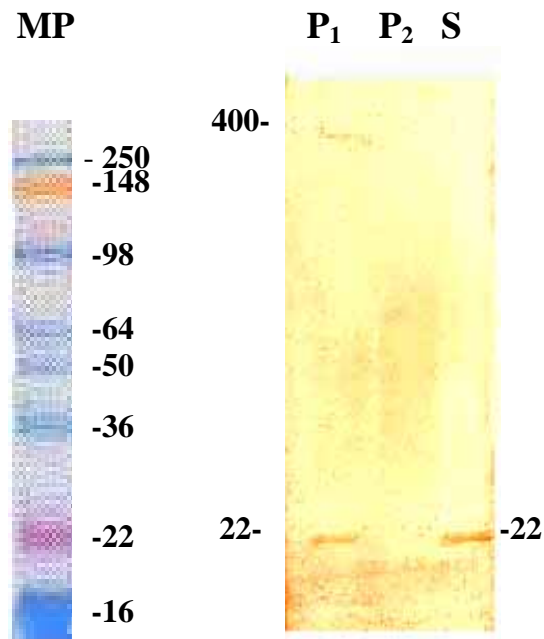


planche7

Immunodétection de la cavéoline-1 par l'anti-CAV1 et par des IgG combinés à la peroxydase dans les fractions neurohypophysaires

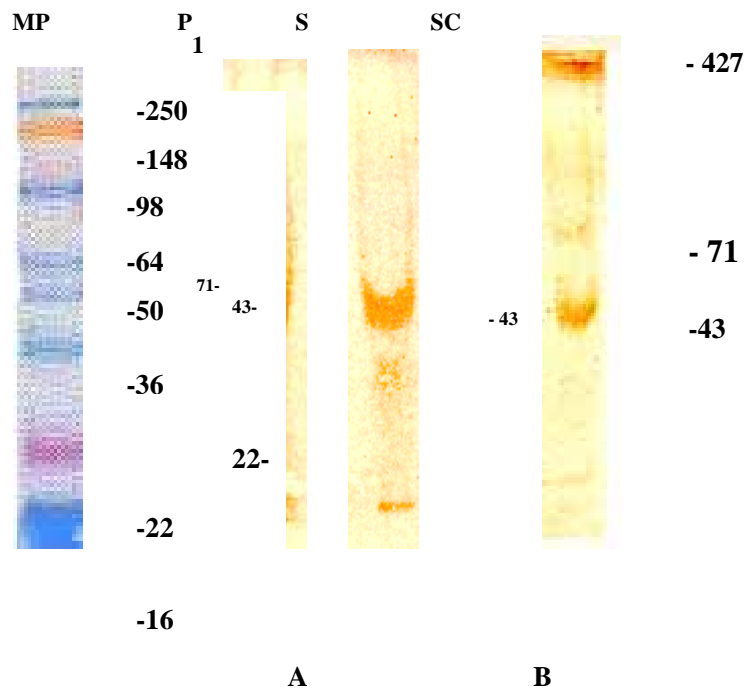


planche9

A. Immunodétection de la cavéoline-1 par l'anti-CAV-1 et des IgG combinés à la peroxydase, après un ligand blotting d'un gel électrotransféré de 12% de deux fractions neurohypophysaires p₁ et S .

B. Immunodétection de la dystrophine par le DYS₂ et des IgG combinés à la peroxydase, dans une fraction de surnageant de cerveau (SC) .

I-Distribution des dystrophines au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire

I.1- Au niveau du noyau supraoptique (NSO)

L'immunomarquage par le DYS2, semble augmenter d'intensité vers la partie ventrale du noyau : la limitante gliale ventrale (LGV). La LGV est une zone de regroupement des expansions astrocytaires et des dendrites des neurones magnocellulaires. Il nous semble, à cette échelle d'observation, que les dystrophines pourraient être localisées dans l'une ou l'autre des structures ou les deux à la fois.

Les dendrites des neurones magnocellulaires constituent les éléments post-synaptiques des neurones afférents qui pourraient être GABAergiques, Glutamatergiques, Histaminergiques et/ou Angiotensinergiques (Hatton, 1990). Dans ce cas, les dystrophines dans cette zone, pourraient être localisées dans les terminaisons de ces axones afférents. Elles pourraient donc être pré- et/ou post-synaptiques. On pense que si les dystrophines sont localisées dans ces régions, elles seraient impliquées dans la transmission de l'information; probablement par le regroupement des canaux ioniques dépendant du voltage au niveau pré-synaptique et / ou des récepteurs des neurotransmetteurs dans la membrane post-synaptique.

En effet, des études morphologiques ont montré une localisation post-synaptique des dystrophines dans le système nerveux central (Jancsik et Hajos, 1998). Ces dystrophines pourraient avoir un rôle dynamique dans l'organisation des protéines impliquées dans la transduction des signaux (Brenman *et al.*, 1996). Il a été démontré aussi par immunocytochimie, que la dystrophine possède une localisation pré et post-synaptique dans les neurones de la couche plexiforme externe de la rétine (Bordais *et al.*, 2004). Ces auteurs suggèrent que chez les patients atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne, la réduction de l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme, est à la base d'une altération de la neurotransmission rétinienne et qui a pour origine l'absence de la dystrophine, proposant que la dystrophine joue un rôle dans le regroupement des récepteurs et /ou des canaux ioniques dans les zones pré- et post-synaptiques. Dans les neurones centraux post-synaptiques les dystrophines, essentiellement la Dp 427 attacherait l'actine au complexe membranaire β -dystroglycane/ α -dystroglycane, ce dernier est ancré à la membrane pré-synaptique par la nerexine (Culligan et Ohlendieck ,2002).

Par ailleurs, les astrocytes sont les cellules gliales prédominantes au niveau du NSO, leurs corps cellulaires se localisent au niveau de la LGV et leurs expansions se prolongent plus de 500 μm vers la partie dorsale du noyau et forment de fines séparations entre les magnoneurones (Miyata et Hatton, 2002). Il a été observé chez le rat sous certaines conditions physiologiques que ces expansions astrocytaires se rétractent et permettent l'apposition des corps cellulaires des magnoneurones (Hatton, 1990). Cet aspect suggère une grande plasticité de ces cellules, dans laquelle il semble que les dystrophines pourraient être impliquées.

Par ailleurs, l'adhésion étant un processus dynamique, la liaison des filaments d'actine au complexe d'adhésion génère une force motrice entre la cellule et sa matrice extracellulaire. Il est probable que les dystrophines interviendraient dans l'arrangement spatial de ces cellules, en relation avec des composants moléculaires du cytosquelette, auxquelles elles seraient liées, notamment l'actine. Comme dans tous les types cellulaires, dans les cellules du système nerveux central, les dystrophines établissent des liaisons structurales avec l'actine (Bonnet-Kerrache *et al.*, 1994). Ceci laisse à penser que les dystrophines dans les expansions des astrocytes du NSO, pourraient être impliquées dans le changement de leur forme en réponse aux stimulations physiologiques telle que la déshydratation (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998).

Au niveau des corps cellulaires des NMC du NSO, le marquage semble avoir une distribution sous-jacente à la membrane plasmique neuronale, présentant un aspect de bandes discontinu. Ces bandes correspondraient à des zones de contact avec les prolongements astrocytaires et/ou à des zones post-synaptiques qui pourraient faire intervenir la dystrophine, respectivement dans la liaison de l'actine au complexe d'adhésion membranaire et dans le regroupement des récepteurs et/ou des canaux ioniques pour la neurotransmission. Cet aspect est en corrélation avec ce qui a été observé dans les autres neurones du système nerveux central des murins (Lidov *et al.*, 1993), suggérant que les endroits plus denses sont des sites de connexion post-synaptiques.

I.2- Au niveau du noyau paraventriculaire (NPV)

L'immunomrquage par le DYS2 est accentué au niveau de la paroi du troisième

ventricule (3V). La paroi du 3V est formée par les ependymocytes. Le même résultat a été observé par Lidov et collaborateurs (1993) dans les cellules ependymaires des murins.

La zone proche de la paroi du 3V est également fortement marquée. Vers cette zone, se prolongent les dendrites des neurones magnocellulaires du NPV (Hatton, 1990). Etant donné que, les corps cellulaires du NPV sont riches en connexion afférentes et les dendrites forment généralement leurs éléments post-synaptiques, l'existence probable de la dystrophine au niveau dendritique pourrait l'impliquer dans le phénomène de la neurotransmission, Ceci par son implication dans le regroupement des récepteurs des neurotransmetteurs et/ou des canaux ioniques.

Dans les corps cellulaires, le marquage au DYS2 délimite la périphérie du corps cellulaire avec une discontinuité d'intensité. En effet, les corps cellulaires du NPV reçoivent une riche connexion afférente, avec des neurones GABAergiques, glutamatergiques et/ou angiotensinergique (Hatton, 1990). Ceci pourrait suggérer, que les dystrophines dans les régions où le marquage est plus intense, interviendraient dans l'établissement de densités post-synaptiques comme il a été suggéré pour les neurones du système nerveux central des murins (Lidov *et al.*, 1993).

I.3- Au niveau du lobe nerveux (LN)

I.3.1- Dans les pituicytes

Nos résultats indiquent que l'immunoréactivité des dystrophines est présente au niveau des régions perivasculaires et dans des endroits isolés du parenchyme nerveux. A ce niveau de la microscopie, il ne nous est pas permis de distinguer les éléments du LN. Il semble cependant, que le marquage pourrait être au niveau pituicytaire, endothélial ou dans les terminaisons nerveuses ou dans les trois structures à la fois. En effet, la plus grande population de cellules du LN, est celle des pituicytes. Ces cellules tendent à former un réseau spongieux à travers la totalité du lobe. Les espaces restants sont essentiellement occupés par les éléments nerveux tels que parties distales des axones et les terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires ainsi que par les cellules endothéliales des capillaires

fenêtrés (Miyata et Hatton, 2002). L'immunomarquage du GFAP au niveau du LN, par l'anticorps anti-GFAP (marqueurs des astrocytes notamment les pituicytes), nous a permis de déduire que la dystrophine est présente dans les pituicytes. Parallèlement, les résultats biochimiques que nous avons obtenus dans les fractions neurohypophysaires, semblent confirmer les résultats morphologiques. Nos résultats indiquent la présence de la Dp427 et de la Dp 116 dans la fraction contenant les pituicytes.

Ces résultats suggèrent que la dystrophine 427, pourrait intervenir dans la plasticité des pituicytes probablement, par interaction avec les molécules d'adhésion cellulaires. La Dp116, quant à elle, pourrait avoir un rôle supplémentaire, d'ancrage membranaire par l'interaction avec le β -dystroglycane. Cette protéine a été aussi montrée dans les cellules de Schwann suggérant un rôle d'ancrage du complexe dystroglycane membranaire (Saito *et al.*, 1998).

En effet, les pituicytes sont les principaux éléments qui participent au phénomène de la plasticité du lobe nerveux. Dans les conditions basales, les pituicytes emprisonnent les terminaisons synaptiques. Dans l'espace perivasculaire, la surface de la lame basale est largement occupée ne laissant que très peu d'espace pour la membrane neuronale. Cet arrangement est modifié dans les conditions de stimulation. Les mécanismes moléculaires qui sont à la base de ces modifications et de leur réversibilité sont encore peu connus. Il semblerait qu'ils soient médiés par les molécules d'adhésion cellulaires, telles que la tenacine-C et la PS-CAM (Polysialated-Cellular-Adhesion-Molecule) (Théodosis *et al.*, 1998).

Par ailleurs, dans le système nerveux central (SNC), les protéines d'adhésion interagissent du côté interne de la membrane, à la fodrine (qui est l'isoforme de la spectrine dans le SNC). L' α -actinine, une protéine liant l'actine analogue à la dystrophine est impliquée dans les adhésions entre cellules dans le tissu musculaire (Ahn et kunkel, 1993).

D'autre part, Culligan et Ohlendieck (2002) ont essayé d'expliquer le rôle des dystrophines dans le cerveau. Ils ont proposé que les dystrophines au niveau des cellules gliales, attacheraient l'actine au complexe membranaire de dystroglycanes

qui lui même se lie au niveau de la matrice extracellulaire à l'agrine ou à la laminine quand ces cellules sont en apposition avec la lame basale d'un endothélium.

I.3.2- Dans les neurosécrétosomes

Ces structures sont issues des terminaisons nerveuses (TN) et des dilatations subterminales (DsT), pouvant contenir entre autres, les granules de sécrétions. Nous rappelons que nous avons signalé la présence des Dp427 et 116 au niveau de cette fraction. Ce résultat est en accord avec les travaux de Dorbani-Mamine et collaborateurs (1998).

Les membranes des TN et des DsT présentent des zones de contact avec celles des pituicytes, étant donné que les pituicytes sont impliqués dans la régulation de sécrétion, ceci indique qu'il existe une synchronisation de mouvement entre ces structures impliquant les protéines d'adhésion cellulaire (Théodosis *et al.*, 1998). Il est probable que la Dp 427 lie l'actine aux molécules d'adhésion cellulaire et contribue, dans la liaison fonctionnelle dynamique entre ces structures. En effet, dans d'autres types de neurones, il a été montré, par des techniques de fractionnement cellulaire que la dystrophine 427 est retrouvée dans les régions membranaires spécialisées, impliquées dans la plasticité synaptique (Ziff, 1997).

De plus, Dorbani-Mamine et collaborateurs (1998) suggèrent que la Dp427 serait associée à la membrane plasmique des TN et des DsT par l'intermédiaire du β -dystroglycane dont ils ont montré la présence dans cette fraction et la Dp 116 serait associée entre autres, à la membrane des granules en stock, par l'intermédiaire du β -dystroglycane qui est orienté du côté cytosolique de leur membrane. Cette particularité de distribution serait en faveur d'un rôle dans le stockage des granules et dans la relation dynamique qui existe entre les neurones et les cellules gliales.

I.3.3-Dans le surnageant (S)

Cette fraction peut renfermer plusieurs structures membranaires entre autres des granules neurosécrétoires et des mitochondries. Seul la Dp427 a été mise en évidence au niveau de cette fraction.

La présence de cette protéine avec les probables granules existants, nous laisse penser à un probable rôle d'ancrage avec les éléments du cytosquelette et/ou avec

la membrane plasmique synaptosomale. Des études sur les granules neurohypophysaires isolés sur gradient de densité continu, isoosmolaire ont mis en évidence les dystrophines de 140, 116 et 71kDa (Dorbani-Mamine *et al.*, 1998) en leur proposant un rôle d'ancrage des granules en stock avec les filaments d'actine. Il serait cependant possible que dans nos échantillons la faible concentration de ces protéines n'a pas permis leur détection.

Pour les autres structures membranaires, il a été montré à l'échelle subcellulaire d'autres neurones, que la dystrophine est détectée au niveau des microsomes, des vésicules synaptiques et des mitochondries (Jung *et al.*, 1993). A notre connaissance, les données bibliographiques indiquent que ces structures membranaires doivent être nécessairement attachées aux éléments du cytosquelette ou il semble que la dystrophine soit impliquée dans un rôle d'ancrage.

II- Distribution de la cavéoline-1 dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire

Les cavéolines ont fait l'objet de plusieurs études dans les différents systèmes cellulaires, comme les cellules musculaires, hépatiques, pulmonaires, adipeuses et endothéliales. Les résultats que nous avons obtenus par immunohistochimie et par western-blotting, montrent l'existence des cavéolines au niveau des corps cellulaires des NMC et dans leurs terminaisons ainsi que dans les pituicytes.

II.1- Au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires

Dans ces noyaux, l'immunomarquage par l'anti-Cav1 est retrouvé dans les corps cellulaires des NMC et au niveau perivasculaire.

Dans les corps cellulaires des NMC, le marquage présente un aspect granuleux et hétérogène. Ce marquage est similaire à celui retrouvé dans les cellules gliales en culture (Cameron *et al.*, 1997).

Nous avons observé dans le corps cellulaire, que ces granulations se répartissent entre la région perinucléaire et la région membranaire plasmique en se propageant dans le cytosol, ceci suggère que cette distribution serait en faveur d'un transport entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique notamment du matériel

de biosynthèse et/ou d'un processus de retour vésiculaire puisqu'il s'agit d'un système neurosécrétoire.

Cameron et collaborateurs (1997) ont essayé d'expliquer par des observations en microscopie électronique, que les granulations hétérogènes observées dans les astrocytes, ne seraient que des amas de vésicules ressemblant aux cavéolaes et qui seraient les transporteurs du matériel de biosynthèse, à travers le cytoplasme.

Dans les autres cellules, Smart et collaborateurs (1996) expliquent le même type de distribution par un rôle de la cavéoline dans le transport du cholestérol entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique par une voie n'impliquant pas l'appareil de Golgi.

Le marquage perivasculaire retrouvé dans le NSO et le NPV, pourrait être localisé aussi bien dans les pieds astrocytaires que dans les cellules endothéliales. La cavéoline-1 dans la cellule endothéliale pourrait être impliquée dans le transport de certaines substances à travers la barrière hématoencéphalique par phénomène de transcytose de la face membranaire luminale de la cellule endothéliale qui est au contact avec le sang, vers la membrane abluminale au contact avec le tissu nerveux. En effet, la cavéoline-1 a été identifiée dans les cellules endothéliales du cerveau (Ikezu *et al.*, 1998). Il est suggéré qu'elle interviendrait dans le contrôle de la pénétration de certaines molécules dans le tissu nerveux (Virgintino *et al.*, 2002). Dans les cellules endothéliales des capillaires des autres tissus tel que le foie, elle participerait selon Ghitescu et collaborateurs (1992) dans le transport transcellulaire des substances. Dans les pieds astrocytaires la cavéoline-1, pourrait intervenir dans la plasticité de ces cellules par l'intermédiaire des molécules d'adhésion que peut renfermer les cavéolaes.

II.2- Au niveau du lobe nerveux

Nous rappelons que l'immunoréactivité à l'anti-CAV1 a été observée par immunohistochimie dans les régions perivasculaires et dans des éléments cellulaires qui semblent être des pituicytes. De même que par western-blotting, nos résultats montrent l'existence d'une bande protéique de 22 kDa qui correspond à la cavéoline-1, dans la fraction enrichie en pituicytes et dans la fraction de surnageant **S**, contenant entre autres les granules sécrétoires.

Etant donné que la cavéoline est le marqueur des caveolae, et les caveolae renferment beaucoup de molécules protéiques entre autres des récepteurs couplés aux protéines G, il est suggéré que la cavéoline-1, retrouvée dans le lobe nerveux, pourrait intervenir dans la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires par son interaction avec le récepteur de l'endothéline type A (ET_A-R) identifié dans le SHN. En effet, des études immunohistochimiques sur le SHN ont montré l'expression de molécules protéiques appartenant à la classe des récepteurs de neuropeptides couplés aux protéines G. Parmi ces récepteurs, on retrouve le récepteur à l'ET_A-R (Yamada et Kurokawa, 1998).

D'autres études morphologiques similaires sur des cellules non neuronales, démontrent la localisation de l' ET_A-R dans les caveolae et son interaction avec la cavéoline-1 (Okamoto *et al.*, 2000). L'endothéline est un médiateur peptidique paracrine ; vasoconstricteur. Au niveau du SHN, il est colocalisé avec l'ocytocine dans les NMC à ocytocine (Burbach *et al.*, 2001). Il joue un rôle dans la stimulation de la libération des hormones neurohypophysaires (Mazaki, 1993). Ce mécanisme de stimulation est encore mal connu.

II.2.1- Dans les pituicytes :

Les résultats obtenus par western-blotting , dans la fraction neurohypophysaire enrichie en pituicytes, indiquent une immunoréactivité de deux protéines de PM différents dont le premier est de 22kDa et le second de 400 kDa.

La présence de la protéine de 22 kDa correspond à la cavéoline-1, ceci est en corrélation avec le résultat obtenu en immunohistochimie et avec ceux obtenus par d'autres travaux. En effet, dans le système nerveux, les cavéolines ont été identifiées, dans les cellules gliales en culture (Cameron *et al.*, 1997) et dans les cellules de schwann (Mikol *et al.*, 1999).

Comme il a été mentionné plus haut, les pituicytes sont dotées d'une grande plasticité. En fonction de l'état physiologique, le réarrangement de ces cellules fait intervenir les molécules d'adhésion cellulaire (Theodosis *et al.*, 1998). La cavéoline-1 retrouvée dans cette fraction, est un témoin de la présence de cavéolae. Plusieurs études ont montré que les cavéolae, isolées à partir de tissus non neuronaux, sont composés de lipides et de composants protéiques. Certains sont impliqués dans le

phénomène de la signalisation cellulaire (Lisanti *et al.*, 1994b) et d'autres font partie des classes de molécules d'adhésion cellulaires (Furley *et al.*, 1990; Pimenta *et al.*, 1995), telles que la NCAM-120 (Neural cell adhesion molecule-120) (Hemperly *et al.*, 1986) et la F3 (Gennarini *et al.*, 1989). Des caveolae obtenues à partir de fractions d'astrocytes montrent une composition similaire à celle obtenue à partir de tissus périphériques, notamment les molécules d'adhésion cellulaire (Cameron *et al.*, 1997). Étant donné que la F3 a été identifiée dans la neurohypophyse (Myata et Hatton, 2002), il est suggéré par analogie aux astrocytes, que les caveolae

pourraient participer dans la plasticité des pituicytes par l'intermédiaire des molécules d'adhésion qu'elles pourraient internaliser. Les cavéolae pourraient aussi correspondre aux zones de contact connus comme des contacts de type "synaptoïde" existant entre les pituicytes, les TN et les DsT (Hatton, 1997).

La présence d'une fraction plus de 400 kDa qui a réagi positivement avec l'anti-CAV1, nous laisse supposer qu'elle pourrait correspondre au complexe oligomérique des cavéolines qui ne s'est pas dissocié avec les conditions d'expérimentation. Ce complexe est connu dans la littérature pour avoir un PM de 350 à 400 kDa (Monier *et al.*, 1995).

II.2.2- Dans les neurosécrétosomes et le surnageant (S)

Les neurosécrétosomes sont issues des terminaisons nerveuses (TN) et des dilatations subterminales (DsT), isolés à partir du lobe nerveux hypophysaire.

L'absence d'une réaction positive de la cavéoline-1 au niveau de la fraction des neurosécrétosomes, ne peut exclure sa présence; ceci pourrait être dû à une très faible concentration de la protéine qui l'a rendu indétectable. On pense qu'étant donné que cette région du NMC n'est pas statique; il serait probable qu'à un moment donné elle soit fortement présente et à un autre, faiblement présente et ce en fonction de la dynamique de la membrane plasmique selon les processus exocytose/recapture. En effet, la cavéoline une fois attachée à la membrane crée des invaginations cavéolaires qui finissent par se détacher. Le fait que la cavéoline-1 soit présente dans les corps cellulaires des NMC ainsi qu'au niveau de la fraction du surnageant (S) qui contient entre autres des granules sécrétoires, on pense que la

cavéoline-1, interviendrait dans le processus du retour vésiculaire. Il serait complémentaire pour appuyer cette suggestion, d'étudier la réactivité de la cavéoline-1 en fonction de différents périodes de déshydratations et de réhydratations.

Il est connu que le processus de récupération membranaire dans le SHN est indépendant de la clathrine (Burbach *et al.*, 2001). L'exocytose au niveau des terminaisons axonales est suivie par l'endocytose compensatoire, permettant le maintien de la surface membranaire. Les granules recyclés retournent à la zone Trans du Golgi dans le corps cellulaire (Theodosios, 1982). Les cavéolae, en plus de se former après l'intégration des cavéolines aux « lipid rafts », sont impliquées dans le phénomène de transcytose des molécules dans les cellules endothéliales (Ghitescu *et al.*, 1992), dans l'endocytose de l'albumine dans ces mêmes cellules (Minshall *et al.*, 2003) et de certaines toxines dans plusieurs systèmes cellulaires (Razani *et al.*, 2002).

III-Relation des dystrophines/ cavéoline-1 au niveau du lobe nerveux

Dans le gel de 10% qui permet la migration de protéines de haut PM, la liaison des cavéolae avec des bandes protéiques de 427 et de 116kDa dans les trois fractions, coïncide avec des bandes protéiques de 427 et 116 kDa identifiées par le DYS2, dans ces mêmes fractions, comme étant la Dp 427 et la Dp116.

Dans le gel de 12%, permettant une meilleure migration des protéines de faible PM, la bande protéique de 22 kDa, observée dans la fraction des pituicytes, pourrait être la cavéoline-1, résultat qui a été obtenu précédemment ou pourrait être des cavéolines qui seraient attachées à une autre cavéoline.

Dans la fraction des pituicytes et dans celle du surnageant **S**, les cavéolines sont liées à une bande protéique de 43 kDa qui pourrait correspondre au β -dystroglycane. Par western-blotting, une protéine similaire révélée par l'anticorps anti- β -dystroglycane (JAF) a été mise en évidence dans la fraction neurohypophysaire enrichie en pituicytes et dans celle des granules en stock, par les travaux de Dorbani-Mamine et collaborateurs (1998).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les autres systèmes. Dans la cellule musculaire cardiaque, des techniques d'immunoprécipitation ont démontré la co-précipitation de la dystrophine avec la cavéoline-3 contenue dans les caveolae. En effet, les caveolae du myocyte cardiaque concentrent le β -dystroglycane dans leur membrane (Doyle *et al.*, 2000). Ces auteurs suggèrent qu'une subpopulation de dystrophines interagit avec les caveolae du myocyte cardiaque par l'intermédiaire du β -dystroglycane.

Une possible relation fonctionnelle entre la cavéoline et la dystrophine, a été décrite dans la cellule musculaire, dans le mécanisme de la contraction musculaire. La dystrophine est concentrée d'une part dans les jonctions neuromusculaires, avec les récepteurs d'acétylcholine (Sealock *et al.*, 1991) et d'autre part sur la face interne des tubules-T. Ces invaginations sont formées par la coalescence de caveolae (Schiaffino *et al.*, 1977) dont le fonctionnement dépend de la CAV-3 (Minetti *et al.*, 2002). La CAV-3 s'associe à la dystrophine par l'intermédiaire du β -dystroglycane (Sotgia *et al.*, 2000) qui la relie à la membrane plasmique (Doyle *et al.*, 2000).

Le système nerveux central (SNC) reste cependant, un tissu non contractile mais doté d'une très grande plasticité. Cette particularité qui intéresse aussi bien les neurones que les cellules gliales, fait intervenir les molécules protéiques d'adhésion cellulaires. Etant donné que les caveolae renferment les molécules d'adhésion cellulaires (Razani *et al.*, 2002) et que ces molécules sont en relation avec les molécules du cytosquelette subcortical comme l' α -actinine, une protéine liant l'actine analogue à la dystrophine (Ahn et kunkel, 1993), il serait probable que dans la neurohypophyse, les pituicytes et les terminaisons neurosécrétoires qui sont, en fonction des stimuli physiologiques, en perpétuel réarrangement (Boersma *et al.*, 1993), font impliquer des molécules d'adhésions regroupées dans les caveolae renfermant essentiellement la cavéoline-1 qui interagiraient avec les dystrophines. Par analogie à la cellule musculaire, Il serait probable que les dystrophines et la cavéoline-1, participent en complémentarité dans la transduction du signal et/ou la neurotransmission. En effet, la dystrophine dans la cellule musculaire, comme il a été mentionné plus haut, est concentrée dans les régions des récepteurs d'acétylcholine où elle pourrait jouer un rôle dans leur regroupement (Sealock *et al.*, 1991).

Par ailleurs, la présence des dystrophines dans les zones pré- et post-synaptiques dans la couche plexiforme externe de la rétine a suggéré à Bordais et collaborateurs (2004) qu'elle pourrait intervenir dans le dynamisme des canaux ioniques ainsi que des récepteurs glutamatergiques. D'un autre côté, les cavéolines concentrent plusieurs récepteurs entre autres ceux couplés aux protéines-G et que ces récepteurs se déplacent à l'intérieur ou à l'extérieur des cavéolae dans le but d'être activés ou désactivés (Razani *et al.*, 2002).

Ces mécanismes font impliquer nécessairement des éléments du cytosquelette subcortical; les dystrophines et les protéines qui leurs sont associées pourraient-elles y jouer un rôle clé ?

Un récapitulatif est présenté dans la figure 16.

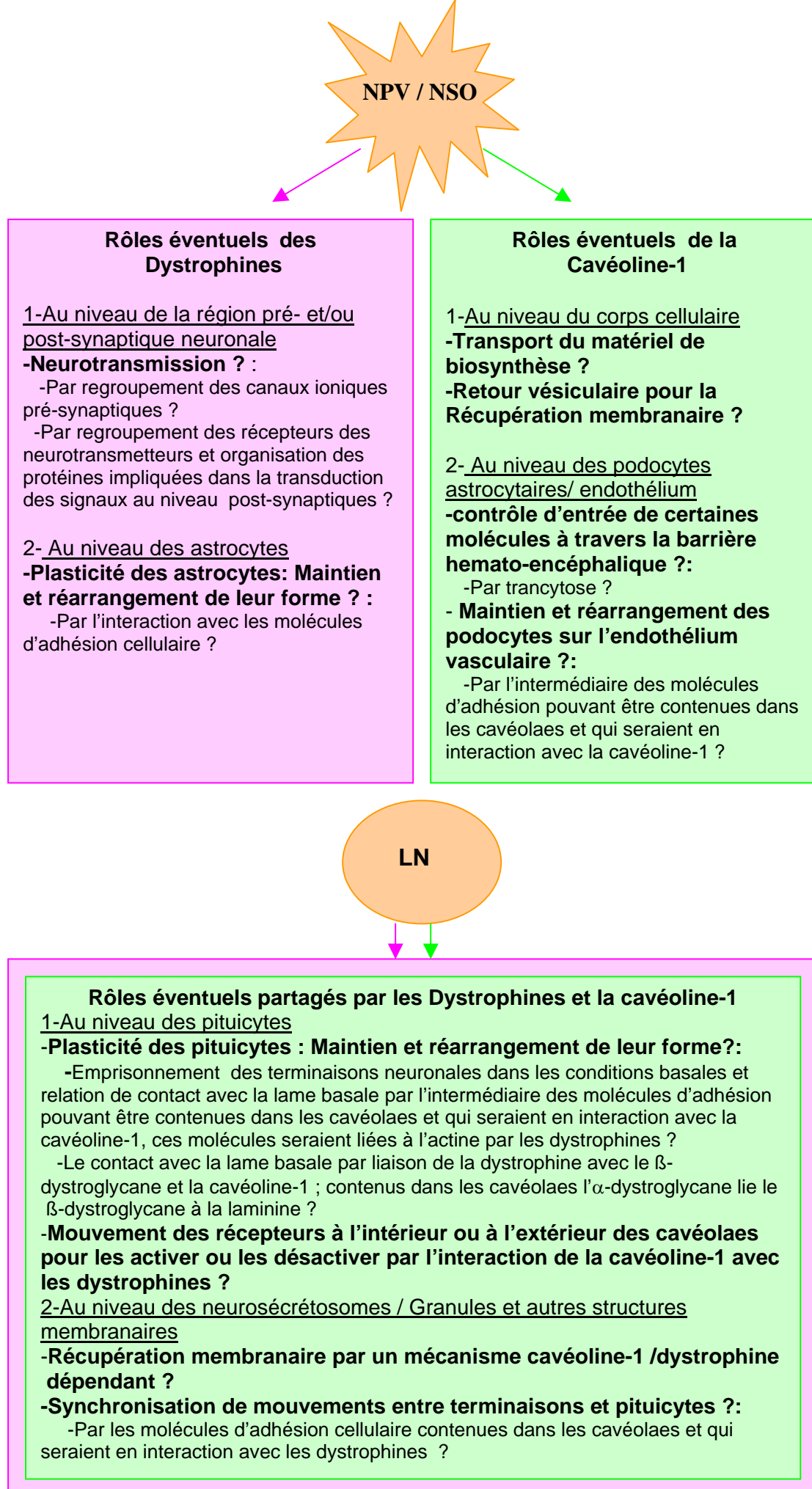


Figure16

Récapitulatif des rôles éventuels que pourraient avoir les dystrophines et la cavéoline-1 au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire

La sécrétion neurohypophysaire, ayant la plus grande tâche dans l'homéostasie hydrominérale, est en grande partie sous la dépendance de l'organisation structurale et la coordination fonctionnelle des éléments du cytosquelette.

Connaître l'ensemble de protéines interagissant avec la dystrophine, nous conduit à mieux comprendre sa fonction dans le système hypothalamo-neurohypophysaire (SHN).

La cavéoline est la protéine marqueur des caveolae ; ces dernières sont des invaginations cavitaires de microdomaines spécifiques et hautement organisés de la membrane plasmique appelé "radeaux lipidiques". La dystrophine quant à elle est une protéine sous-membranaire, constituant le cœur du complexe protéique qui lui est associé. Notre travail a consisté à mettre en évidence une possible co-localisation des dystrophines et des cavéolines dans le SHN. Nous avons choisi ce système d'un côté, pour sa propriété physiologique neurosécrétoire très active et d'un autre, pour son organisation anatomique qui permet un accès facile à ses composants.

En effet, par immunohistochimie et par ligand-blotting, nous avons trouvé une existence simultanée de ces deux protéines dans le corps cellulaire des neurones magnocellulaires ainsi qu'une probable relation entre elles dans la neurohypophyse aussi bien dans la composante gliale que nerveuse. Dans le corps cellulaire du NMC, la localisation de la dystrophine est sous-jacente à la membrane plasmique tandis que celle de la cavéoline est membranaire et cytoplasmique. Dans les fractions neurohypophysaires, ces deux protéines co-existent dans les pituicytes et dans la fraction contenant entre autres les granules de sécrétion. La cavéoline-1 aurait tendance à établir des liaisons structurales avec des protéines de faible et de haut poids moléculaires comme les dystrophines 427, 116 et 71 et d'autres probablement comme le β -dystroglycane et la cavéoline-1.

A la lumière des études qui ont été faites sur les dystrophines et les cavéolines dans le tissu nerveux et par analogie aux autres systèmes, il est suggéré que les deux protéines pourraient participer en coordination, dans le processus de la plasticité de ce système, dans le processus de récupération membranaire après la libération du produit de sécrétion neurohypophysaire ainsi que dans le processus de

transduction du signal entre les afférences des NMC et leurs corps cellulaires et dendrites.

Il nous semble intéressant de compléter et d'appuyer notre travail par :

Des études immunocytologiques pour la microscopie électronique, à savoir l'étude de la co-localisation de la dystrophine et de la cavéoline par des particules d'or colloïdal de différentes tailles.

Il serait encore intéressant d'étudier la relation de la dystrophine et de la cavéoline par la technique d'immunoprécipitation.

D'étudier la co-distribution des dystrophines, de la cavéoline avec le β -dystroglycane.

D'étudier la relation de la cavéoline et la dystrophine avec les molécules d'adhésion par ligand-blotting, par immunoprécipitation et par immunocytochimie dans le but de pouvoir démontrer l'implication de la cavéoline et la dystrophine dans le processus de la plasticité cellulaire du lobe nerveux. D'étudier aussi cette relation avec les récepteurs des neurotransmetteurs au niveau des corps cellulaires des NMC par immunohistochimie et immunocytochimie pour démontrer la contribution de la cavéoline et la dystrophine dans les processus de la neurotransmission et la transduction du signal.

Des études morphologiques et biochimiques de la co-localisation de ces protéines chez des animaux mutants et transgéniques, tels que les souris *mdx* (n'exprimant pas la dystrophine) et ceux dépourvus de cavéoline-1 (cavéoline-1-Deficient Mice) pourraient éclaircir mieux, le rôle commun de ces protéines dans le SHN.

A

Ahn A.H. and Kunkel I. The structural and functional diversity of dystrophin.
Nature Genet., 3: 283-291 1993.

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

Alonso G., Gabrion J., Travers E. and Assenmacher I. Ultrastructural organisation of actin filaments in neurosecretory axons of the rat.
Cell Tissue Res., 214: 323-341 1981

Ambrose H.J., Blake D.J., Nawritzki R.A. and Davies K.E. Genomic organisation of the mouse dystrobrevin gene : Comparative analysis with the dystrophin gene.
Genomics., 39: 359-369 1997.

Amiel J., Attié T., Denamur E., Edery P. Gilgenkrantz H., Grengenkantz S., Hanoune J., Kahn A., Labie D., Lyonnet S., Petit C. and Vaudry H. Deux promoteurs supplémentaires dans le gene de la dystrophine.
Medecine/Science 11: 1169-1170 1995.

Anderson R.G., Kamen B.A., Rothberg K.G., and Lacey S.W. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae.
Science (Wash DC) 255:410-411 1992.

Archer B.T., Ozcelik T., Jahn R., Francke U. and Sudhof T.C. Structures and chromosomal localisation of two human genes encoding synaptobrevin1 and 2
J. Biol. Chem 265: 12679-12685 1990.

Armstrong W.E., Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons.
Prog Neurobiol 47: 291-339 1995.

B

Bar S., Barnea E., Levy Z., Neuman S., Yaffe D. and Nudel U., A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution.
Biochem .272 : 557-560 1990.

Barberis C., Mouillac B. and Durroux T. Structural bases of vasopressin / oxytocin receptor function.
J. Endocrinol. 156: 223-229 1998.

Barer R. and Lederis K. Ultrastructure of the rabbit neurohypophysis with special reference to the release of the hormones. *Z. Zellforsch. Mikroskop.*
Anat. 75 :201-239 1966.

Beyers T.J., Husein-Chishti A., Dubreuil RR., Branton D. and Goldstein L.S.B. Sequence similarity of the amino-terminal domain of drosophila beta-spectrin to alpha-actinin and dystrophin.

J. Cell Biol. 109 : 1633-1641 1989.

Beyers T.M., Lidov H.G.W. and Kunkel L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve

Nat. Genet. 4: 77-81 1993.

Bicknell R.J., Boersma C.J.C., VAN Leeuwen F.W. and Mason W.T., Calcium signaling in neurosecretory terminals and pituicytes.

Ann. NY. Acad. Sci 689 : 177-182 1993.

Birch N.P., Hakes D.J., Dixon J.E. and Mezey E., Distribution and regulation of the candidate prohormone processing enzymes SPC2 and SPC3 in adult rat brain.

Neuropeptides 27: 307–322 1994.

Blake D. J., Weir A., Newey S. E., and Davies K. E. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle.

Physiol. Rev. 82: 291-329 2002.

Boersma C.J.C., Sonnemans M.A.F. and Van Leeuwen F.W . Immunoelectron microscopic demonstration of oxytocin and vasopressin in pituicytes and nerve terminals forming synaptoid contacts with pituicytes in the rat neural lobe.

Brain Res. 611: 117-129 1993.

Bonnet-Kerrache A., Fabrizio E. and Mornet D. N-terminal domain of dystrophin.

FEBS Lett. 355: 49-53 1994.

Bordais A., Varela C., Fort P., Sahel J.–A. and Rendon A. Pre– and post–synaptic localization at the outer plexiform layer of dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140 : functional implications.

Invest Ophthalmol Vis Sci ;45: E-Abstract 5358 2004.

Bradford M. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem 72 : 248-254 1976.

Brady S.T. Molecular motors in the nervous system.

Neuron 7 : 521-533 1991.

Breslow E. and Burman S. Molecular, thermodynamic, and biological aspects of recognition and function in neurophysin-hormone systems: a model system for the analysis of protein-peptide interactions.

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol Biol 63: 1–67 1990.

Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W. Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and a1-syntrophin mediated by PDZ domains.

Cell 84: 757-767 1996.

Bretscher M.S. and Whytock S. Membrane-associated vesicles in fibroblasts.

J. Ultrastruct. Res. 61: 215-217 1977.

Briley E.M., Lolait S.J., Axelrod J. and Felder C.C. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels.
Neuropeptides 27: 63–74 1994.

Bruni J.E. and Perumal P.M. Cytoarchitecture of the rat's supraoptic nucleus.
Anat. Embryol. 170: 129-138 1984.

Burbach J.P.H., Luckman S.M., Murphy D. and Gainer H. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysal system.
Physiol.Rev. 81:1197-1267 2001.

Buma P. and Nieuwenhuys R. Ultrastructural demonstration of oxytocin and vasopressin release sites in the neural lobe and median eminence of the rat by tannic acid and immunogold methods.
Neurosci. Lett. 74 : 151-157 1987.

C

Cameron PL., Rufin JW., Bolag R., Rasmussen H. and Cameron S. identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain.
J. neurosci 17 9520-9535 1997.

Castel M., Gainer H. and Dellmann H.D. Neuronal secretory systems.
Int Rev Cytol 88: 303–459 1984.

Chan Y.M., Bonneman C.G., Lidov H.G. and Kunkel L.M. Molecular organisation of sarcoglycane complex in mouse myotubes in culture.
J. Cell. Biol. 143 2033-2044 1998.

Chelley J., Hamard G., Koulakoff A., Kaplan J.C., Ahn A. and Bernard-Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells .
Nature 334 : 64-65 1990.

Chiba A., Matsumara K., Yamada H., Inazu T., Shimizu T., Kusunoki S., Kanazawa I., Kobata A. and Endo T. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve β -dystroglycan.
J.Biol.Chem. 272 (4):2156-2162 1997.

Claudepierre T., Mornet D., Pannike T., Forster V., Dalloz C., Bolanos F., Sahel J., Reichenbach A. and Rendon A. Expression of Dp71 in Müller glial cells: A comparison with utrophin and dystrophin-associated proteins.
Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., 41 (1) : 294-304 2000.

Claudepierre T., Rodius F., Frasson M., Fontaine V., Picaud S., Dreyfus H.,

Mornet D., and Rendon A. Differential distribution of dystrophins in rat retina.
Invest.Ophthalmol.Vis.Sci 40 : 1-10 1999.

Coleman TR., Fishkind D., Moosker M.S. and Morrow J.S. functional diversity among spectrin isoforms.

Cell Motil. Cytoskeleton 12: 225-247 1989.

Crosbie R.H., Yamada H., Venzke D.P., Lisanti M.P., and Campbell K.P. Caveolin-3 is not an essential component of the dystrophin glycoprotein complex. *FEBS Lett* 427:279–282 1998.

Cross R.A., Stewart M. and Kendrick-Jones J. Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Letters* 262 : 87-92 1990.

Culligan K.G., Mackey A.J., Finn D.M. Maguire P.B., Ohlendieck K. Role of dystrophine isoforms and associated proteins in muscular dystrophin. *Int J Mol Med.* 2: 639-648 1998.

Culligan K.G., Ohlendieck K. Diversity of dystrophin-glycoprotein complex. *J Biomed. Biotech* 2: (1) 31-36 2002.

D

Das K., Lewis R.Y., Scherer P.E. and Lisanti M.P. The membrane spanning domains of caveolins 1 and 2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J. Biol. Chem* 274:18721–18728 1999.

Day T.A. and Sibbald J.R. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. *Am.J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 257: R1020–R1026, 1989.

Day R., Schafer M.K., Watson S.J., Chretien M. and Seidah N.G. Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol. Endocrinol.* 6: 485–497 1992.

Dierickx K. and Vandesande F. Immunocytochemical localization of the vasopressinergic and the oxytocinergic neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res.*184: 15–27 1977.

Dietzen D.J., Hastings W.R. and Lublin D.M. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues: Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270: 6838–6842 1995.

Dorbanl-Mamine L., Stoeckel M.E., Jancsik V., Ayad G. and Alvaro Rendon A. Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats : Immunolocalization and biochemical characterization. *Neuroreport* 9 : 3583-3587. 1998.

Doyle D.D., Goings G., Upshaw-Earley J., Ambler SK., Mondul A., Palfrey H.C. and Page E. Dystrophin associates with caveolae of rat cardiac myocytes: relationship to dystroglycan. *Circ. Res.* 87:480–488 2000.

D'souza V.N., Thi Man N., Morris G.E., Karges W. and Pillers D.M. A novel dystrophine isoform is required for normal retinal electrophysiology.

Hum. Mol. Genet. 4: 837-842 1995.

Dupree P., Parton R.G., Raposo G., Kurzchalia T.V. and Simons K. Caveolae and sorting of the trans-Golgi network of epithelial cells.
EMBO J. 12 :1597–1605 1993.

Duong L.T., Fleming P.J. and Russell J.T. An identical cytochrome b561 is present in bovine adrenal chromaffin vesicles and posterior pituitary neurosecretory vesicles.
J. Biol. Chem 259: 4885–4889 1984.

Duvigneaud V. Hormones of the posterior pituitary gland : oxytocin and vasopressin.
Harvey Lecture, serie 50: 1-26 1956.

Dyball R.E.G. and Kemplay S.K. Dendritic trees of neurones in the rat supraoptic nucleus.
Neuroscience 7 : 223-230 1982.

E

Ervastie J.M. and Campell K.P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex.
Cell 66 : 1121-1131 1991.

F

Ferguson A.V. and Kating N.W., ngiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat .
Regul. Pept 23 : 343-352 1988.

Furley A., Morton J.S., Manalo B.D., Karagogios D., Dodd J. and Jessel T. The axonalglycoproteinTAG1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth promoting activity.
Cell 61: 157-170 1990

G

Gabella G. Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli.
Cell Tissue Res. 170:161–186. 1976.

Gainer H. Mechanisms of neuropeptides precursor processing. In avoli M, Reader TA, Dykes RWN, Gloor P. Eds . Neurotransmitters and cortical function: From molecules to mind.
New york: *Penum press:* 527-546. 1988.

Gainer H. Intracellular protein trafficking and proprotein processing: an overview. In: Mechanisms of Intracellular Trafficking and Processing of Proproteins.
edited by Loh YP. Boca Raton, FL: CRC, p. 1–17 1993.

- Gainer H. and Chin H.** Molecular diversity in neurosecretion: reflections on the hypothalamo-neurohypophysial system.
Cell Mol. Neurobiol. 18: 211–230 1998.
- Gainer H. and Wray S.** The cellular and molecular biology of oxytocin and vasopressin. In: *Physiology of Reproduction*.
edited by Knobil E and Neill JD. New York: Raven, p. 1099–1129 1994.
- Galbiati F., Razani B., and Lisanti M.P.** Emerging themes in lipid rafts and caveolae.
Cell 106:403–411. 2001b.
- Gee SH., Madhavan R., Levinson S.R., Caldwell JH., Sealock R. and Frohener SC.** Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins.
J. Neurosci. 18 : 128-137 1998.
- Gennarini., Cibelli G., Rougon G., Mattei M., Goridis C.** The mouse neuronal surface F3 : a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to the chick contactin.
J Cell Biol 109: 775-788 1989.
- Ghitescu L. and Bendayan M.** Transendothelial transport of serum albumin: A quantitative immunocytochemical study.
J Cell Biol 117:745–755 1992.
- Gil J.** Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung.
Fed. Proc. 42:2414–2418. 1983.
- Gorecki D. C., Abdulrazzak H., Lukasiuk K. and Barnard E.A.** Differential expression of syntrophines and analysis of alternatively spliced dystrophin in the mouse brain.
Eur. J. Neurosci., 9 (5) :965-976 1997.
- Gorecki D.C., Monaco A.P., Derry J.M.J., Walker A.P., Barnard E.A. and Barnard P.J.** Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters.
Hum. Mol. Genet 1: 505-510 1992.
- Grady R.M., Zhou H., Cunningham J.M., Henry M.D., Campbell K.P. and Sanes J.R .** Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: Genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex.
Neuron 25: 279-293 2000.
- Green J.D.** Some aspects of the anatomy and function of the pituitary gland , with a special reference to the neurohypophysis.
Alexander Blain Hosp. Bull 6: 128-142 1947.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik and Benfenati F.** Synaptique vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function
Science 259: 780-785 1993.

Grino M., Guillaume V., Boudouresque F., Conte-Devolx B., Maltese J.Y. and Oliver C. Glucocorticoids regulate peptidyl-glycine alphaamidating monooxygenase gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus.

Mol. Endocrinol. 4: 1613–1619 1990.

H

Hack A.A., Groh M.E. and McNally E.M. Sarcoglycans in muscular dystrophy.

Microsc Res Tech 48: 167-180 2000.

Hammonds R.G. Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of α -actinin.

Cell 51: 158 1987.

Hashida-Okumura A., Okumura N., Iwamatsu A., Buijs R.M., Romijn H.J. and Nagai K. Interaction of neuronal nitric-oxide syntase with α -1-syntrophin in rat brain.

J. Biol. Chem 274 (17): 11736-11741 1999.

Hatton G.I., Hutton U.E., Hoblitzell E.R. and Armstrong W.E. Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the rat paraventricular nucleus.

Brain Res. 108 : 187-193, 1976.

Hatton G.I. Emerging concepts of structure function dynamics in adult brain: The hypothalamo-neurohypophysal system.

Pog. Neurobiol 34: 437-504 1990.

Haymaker W., Anderson E. and Nauta W.J.H. the hypothalamus 1969, ed: Thomas.

Hays R.M., Franki N. and Gao Y. Vesicle fusion proteins in rat inner medullary collecting duct and amphibian bladder (Abstract).

J. AM. Soc. Nephrol 5: 272 1994.

Heimer L. The human brain and the spinal cord: functional neuroanatomy and dissection. New York: SARINCER 1983.

Hemperly J.J., Edelman G.M. and Cunningham B.A. Sequence of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via phosphatidylinositol intermediate.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 / 9822-9826 1986.

Henley J.R., Krueger E.W., Oswald B.J. and McNiven M.A. Dynamin-mediated internalization of caveolae.

J. Cell. Biol 141:85–99. 1998.

Hirokawa N. The molecular mechanism of organelle transport along microtubules:

the identification and characterization of KIFs (kinesin superfamily proteins).
Cell Struct. Funct. 21: 357–367 1996.

Hou-yu A., Lamme A.T., Zimmerman E.A. and Silverman A.J. Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain using a double-label procedure.
Neuroendocrinology 44: 235–246 1986.

Imamura M., Araishi K., Noguchi S. and Ozawa E. A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp 116 and utrophin in the peripheral nervous system.
Hum.Mol.Genet 9 (20) : 3091-3100 2000.

Ikezu T., Ueda H., Trapp B.D., Nishiyama K., Sha J.F., Volonte D., Galbiati F., Byrd A.L., Bassell G., Serizawa H., Lane W.S., Lisanti M.P. and Okamoto T. Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, -3 in brain endothelial and astroglial cell types.
Brain Res. 804: 177-192 1998.

J

Jancsik V et Hajos F. Differential distribution of dystrophine in postsynaptic densities of spine synapses
Neuroreport, 9:2249-2251 1998.

Jung D., Pons F., Léger J., Aunis D. and Rendon A. Dystrophin in central nervous system : a developmental, regional distribution and subcellular localization study.,
Elsevier neurosci. Lett. 124 : 87-91 1991.

Jurgutis P., Shuang R., Fletcher A. and Stuenkel E.L. Characterization and distribution of SNARE proteins at neuroendocrine nerve endings.
Neuroendocrinol. 64 : 379-392 1996.

K

Kannan H., Kasai M., Osaka T. and Yamashita H. Neurons in the paraventricular nucleus projecting to the median eminence : A study of their afferent connections from peripheral baroreceptors, and from the A1-catecholaminergic area in the ventrolateral medulla .
Brain Res. 409 : 358-363 1987.

Kelly J. and Swanson L.W. Additional forebrain regions projecting to the posterior pituitary: preoptic region, bed nucleus of the stria terminalis, and zona incerta.
Brain Res. 197: 1–9 1980.

Khurana T.S., Hoffman E.P. and Kunkel L.M. Identification of chromosom 6-encoded dystrophin-related protein.
J. Biol.Chem. 265 : 16717-16720 1990.

Khurana T.S., Watkins S.C. and Kunkel L.M. Identification of chromosom 6-encoded dystrophin-related protein in the brain.
J. Cell Biol 119 : 357-366 1992.

Koeing M. and Kunkel L.M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility.
J. Biol Chem. 265 : 4560-4566 1990.

Koenig M., Monaco A. Kunkel L.M. The complete sequence of dystrophine predict a rod-shaped cytoskeletal protein .
Cell 53 : 219-226 1988.

L

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4.
Nature 227 : 680-688 1970.

Larsen P.J., Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat.
J. Comp. Neurol 316: 287-313. 1992.

Lederfein D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G.E., Fuchs O., Yaffe D., and Nudel U. A 71-kilodalton protein a major product of Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other non muscle tissues.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89: 5346-5350 1992.

Lederis K. and Livingston A. Subcellular localization of acetylcholine in the posterior pituitary of the rabbit.
J. Physiol., London 196: 34-36 1968.

Levine B.A., Moir J.G., Patchell V.B., and Perry S.V. Binding sites involved in the interaction of actin with the N-terminal region of dystrophin.
FEBS Lett 298: 44-48 1992.

Lidov H.G.W., Byers T.J., Kunkel L.M. The distribution of dystrophin in the murin central nervous system: An immunocytochemical study.
Neuroscience 54 (1): 167-187 1993

Lidov H.G.W., Selig S. and Kunkel L.M. Dp140 : A novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus.
Hum.Mol.Genet; 4 : 329-335 1995.

Lisanti M.P., Sherer P.E., Viduiriene J., Tang Z-L., Hemanoski-Vosalkaa., Tu Y-H. Cook Rf and Sargiacomo M, characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from endothelial-rich source: implications for human disease.
J; Cell Biol; 126: 11-126 1994b.

Lolait S.J., O'Carroll A.M., Mcbride O.W., Konig M., Morel A. and Brownstein MJ. cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus.
Nature 357: 336-339, 1992.

Love D.R., Morris G.E., Ellis J.M., Fairbrother U., Marsden R.F., Bloomfield J.F., Edwards Y.H., Slater C.P., Pany D.J. and Davies K.E. Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the *mdx* and *dy* mouse.
Proc.Natl .Acad. Sci. USA 1991.

Lucas R.L. and Salm A.K. Astroglia proliferation response to oxytocin and vasopressin.

Brain Res. 681 : 218-222 1995.

Luise M., Presotto C., Senter L., Betto R., Ceoldo S., Furlan S., Salvatori S., Sabbadini R.A. and Salviati G. Dystrophin is phosphorylated by endogenous protein kinases.

Biochem. J. 293 : 243-247 1993.

Lynch D.R., Braas K.M., Hutton J.C., and Snyder S.H. Carboxypeptidase E (CPE): immunocytochemical localization in the rat central nervous system and pituitary gland.

J. Neurosci. 10: 1592–1599 1990.

M

Mason W.T., Ho Y. and Hatton G.I. Mapping of cholinergic neurons associated with rat supraoptic nucleus: Combined immunocytochemical and histochemical identification.

Brain Res. Bull 11: 617-626. 1983.

Matsudaira P. Molecular organisation of actin crosslinking proteins.

Trends in *Biol. Sci.* 16 : 87-92. 1991.

Mazaki T. Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems.

Endocr Rev 14: 256-268 1993.

Meister B. Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons.

Mol. Neurobiol. 7: 87–110 1993.

Mezey E., Leranath C., Eskay R., Horvath S., and Paikovits M. The origin of somatostatin-containing nerve fibers innervating the hypothalamic supraoptic nucleus.

Brain Res. 554: 293-298. 1991.

Mikol D.D., Hong H.L., Cheng H.L. and Feldman E.L. Caveolin expression in Schwann cells glia.

Glia. 27: 39-52 1999.

Minetti C., Bado M., Broda P., Sotgia F., Bruno C., Galbiati F., Volonte D., Lucania G., Pavan A., Bonilla E. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency.

Am J Pathol 160:265–270 2002.

Minshall R. D., Sessa W. C., Stan R. V., Anderson R. G. W.,⁵ and Malik A .B. Caveolin regulation of endothelial function.

Cell Mol Physiol 285: 1179-1183 2003.

Miselis R.R. The efferent projections of the subfornical organ of the

rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.* 230: 1–23, 1981.

Miyata S and Hatton G.I. Activity-related, Dynamic Neuron-glia Interaction in the Hypothalamo-Neurohypophysial system. *Microsc Res Tech* 56: 143-157 2002.

Mobley B.A., and Eisenberg E.R. Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.* 66 : 31-45 1975.

Monier S., Dietzen D.J., Hastings W.R., Lublin D.M., and Kurzchalia T. Oligomerisation of VIP21-caveolin in vitro is stabilised by long chain fatty acylation of cholesterol. *FEBS Lett* .388 : 143-149.1996.

Monier S., Patron R.G., Vogel F., Behlke J., Henske A., and Kurzchalia T. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6 : 911-927. 1995.

Montesano R., Roth J., Robert A. and Orci L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature (Lond)* 296:651–653. 1982.

Mora R., Bonilha V.L., Marmorstein A., Scherer P.E., Brown D., Lisanti M.P. and Rodriguez-Boulan E. Caveolin-2 localizes to the Golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae and rafts when coexpressed with caveolin-1. *J. Biol.Chem.* 27 : 25708-25717. 1999.

Morris J., Chapman D.D. and Sokol H.W. Anatomy and function of the classic vasopressin-secreting hypothalamus-neurohypophysial system. In “ Vasopressin: principles properties” (D.M. Gash and G. J. Boer, Eds), pp. 1-66 Plenum Press, New York, 1987.

Morris J.F. and Pow D.V. Capturing and quantifying the exocytotic event. *J. Exp. Biol.* 139: 81–103, 1988.

Morris G.E., Simmons C. and Nguyen T.M. Apo-dystrophins (DP140 and DP71) and dystrophin splicing isoforms in developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 215 (1) : 361-367.1995.

Murata M., Peranen J., Schreiner R., Weiland F., Kurzchalia T. and Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10339–10343. 1995.

Murugaiyan P. and Salm A.K. Dehydration-induced proliferation of identified pituicytes in fully adult rats. *Glia* 15 : 65-76. 1995.

N

Nelson W.J., Shore E.M., Wang A.Z. and Hammerton R.W. Identification of a membran-cytoskeletal complex containing the cell adhesion molecules uvomorulin (E-cadherin) , ankyrin and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells.

J. Cell Biol. 110: 349-357 1990.

Nordmann J.J. and Dynball R.E.G. Effect of veratridine on Ca fluxes and the release of oxytocin and vasopressin in isolated neurohypophysis .

J. General Physiol. 72 : 297-304 1978.

Nordmann J.J. and labouesse J. Neurosecretory granules : Evidence for an aging within the neurohypophysis .

Science 211 :595-597 1981.

Nordmann J.J. Evidence for an ageing process within neurosecretory granules .

In: Neuroendocrinology of vasopressin, corticotropin and opiomelanocortins, Eds., A.J. Baertschi and J.J. Dreifuss, Academic press, London : 11-20 1982.

Nordmann J.J. Stimulus-secretion coupling. In The neurohypophysis: Structure, function and control.

Eds, B A Cross and G Leng, Elsevier Amsterdam 281-304 1983.

O

Oh P., McIntosh D.P. and Schnitzer J.E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium.

J. Cell Biol. 141:101–114. 1998.

Okamoto Y., Ninomiya H., Miwa S., and Masaki T. Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells.

J Biol Chem 275:6439–6446 2000.

Ostrowski N.L., Young W.S., Knepper M.A. and Lolait S.J. Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats.

Endocrinology 133 : 1849–1859 1993.

Orloff J. and Handler J. The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone.

Am .J Med. 42: 757–768, 1967.

Okamura H., Abitbol M., Julien J.F., Dumas S., Berod A., Geftardm, Kitahama K., Bobillier P., Mallet J. and Wiklund I. Neurons containing messenger RNA encoding glutamic decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by *in situ* hybridisation, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area and dorsomedial hypothalamic nucleus.

Neuroscience 39 : 675-699 1990.

Oyler G.A., Higgins G.A., Hart R.A., Battenberg E., Billigsley M., Bloom F.E. and Wilson MC.

J.Cell Biol. 109: 3039-3052 1989.

P

Palade G.E. Fine structure of blood capillaries.
J. Appl. Physiol 24 :1424-1436 1953.

Parton R.G., Way M., Zorzi N., and Stang E. Caveolin associates with developing T-tubules during muscle differentiation.
J Cell Biol 136: 137-154 1997.

Paxinos. Atlas stéréotaxique du rat. 1986.

Peters K-R., Carley W.W., Palade Ge. Endothelial plasmalemmal vesicles have a *J. Cell Biol.* 101: 2233-2238 1985.

Peters M.F., O'Brien K.F., Sadoulet-Puccio H.M., Kunkel L.M., Adams M.E. and Froehner S.C. β -Dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning and protein association.
J. Biol. Chem. 272 : 31561-31569 1997.

Petrof B.J., Sharger J.B., Stedman H.H., Kelly A.M. and Sweeney H.L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 3710-3714 1993.

Pimenta A.F., Zhukareva V., Barbe M.F., Reinoso B.S., Grimley C., Hensel W., Fischer I. and Levitt P. The limbic-system associated protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting
Neuron 15: 287-297 1995

Pons F., Augier N., Léger J., Robert A., Tomé F.M.S., Fardeau M., Voit T., Nicholson L.V.B., Mornet D. and Léger J.J. A homologue of dystrophin is expressed at the neuromuscular junctions of normal individuals, DMD patients and of normal and mdx mice.
FEBS Lett 282 : 161-165 1991.

Puca A.A., Nigro V., Piluso G., Belsito A., Sampaolo S., Quaderi N., Rossi., Diioro G., Ballabio A. and Franco B. Identification and characterization of a novel member of the dystrophin gene family.
FEBS Lett 425 : 7-13 1998.

R

Raby W.N. and Renaud L.P. Dorsomedial medulla stimulation activates rat supraoptic oxytocin and vasopressin neurones through different pathways.
J. Physiol. (Lond) 417: 279–294, 1989.

Randle J.C.R., Bourque C.W. and Renaud L.P. Serial reconstruction of yellow-labeled supraoptic neurons in perfused rat hypothalamic explants.
Neuroscience 17 :453-467. 1986.

Rando T. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signalling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies.

Muscle Nerve 24 : 1575-1594. 2001.

Rappaport D., Lederfein D. and Den Dunnen J.T. Characterisation and cell type distribution of a novel major transcript of the Duchenne dystrophy gene is associated with the cell membrane.

Differentia 49: 187-193 1993.

Razani B., Scotte W. and Lisanti P. Caveolae: from cell biology to animal physiology.

Pharmacol. Rev. 54:431-467 2002.

Rodius F., Claudepierre T., Rosas-Vargas H., Cisneros B., Montanez C., Dreyfus H., Mornet D. and Rondon A. Dystrophine in developing retina/dp260 expression correlates with synaptique maturation.

Neuroreport 8 : 2383-2387 1997.

Roland B.L. and Sawchenko P.E.,Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 332 : 123-143. 1993.

Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenney J.R., and Anderson R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.

Cell 68:673–682. 1992.

Rothberg K.G., Ying Y.S., Kolhouse J.F., Kamen B.A. and Anderson R.G. The glycosphospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway.

J. Cell Biol. 110:637–649. 1990.

Roy S., Luetterforst R., Harding A., Apolloni A., Etheridge M., Stang E., Rolls B., Hancock J.F. and Parton R.G. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.

Nat. Cell Biol. 1:98–105. 1999.

Rozen F., Russo C., Banville D. and Zingg H.H. Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 200–204 1995.

Ruppert S.D., Scherer G. and Schutz G. Recent gene conversion involving bovine vasopressin and oxytocin precursor genes suggested by nucleotide sequence.

Nature 308: 554-557 1984.

Russell J.A. and Leng G. Sex, parturition and motherhood without oxytocin.

J. Endocrinol. 157: 343–359 1998.

Russell J.T. Delta pH, H⁺ diffusion potentials, and Mg⁺⁺ ATPase in neurosecretory vesicles isolated from bovine neurohypophyses.

J. Biol Chem. 259 : 9496–9507 1984.

Rybakova L.N., Amann K.J. and Ervasti J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin.
J. Cell Biol. 135 : 661-672 1996.

S

Saito F., Mazaki T., Kamakura K., Anderson L.V.B., Fujita S., Fukuta-Ohî H., Sunada Y., Shimizu T. and Matsumara K. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann
J.Biol.Chem. 274 (12) : 8240-8246 1998

Sargiacomo M., Scherer P.E., Tang Z.L., Kubler E., Song K. S., Sanders M. C. and Lisanti M. P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 : 9407–9411 1995.

Scharrer E. and Scharrer B. Secretory cells within the hypothalamus In: *The Hypothalamus and Central Levels of Autonomic Function*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 170–194 1940.

Scherer P.E., Lewis R.Y., Volonte D., Engelman J.A., Galbiati F., Couet J., Kohtz D.S., van Donselaar E., Peters P. and Lisanti M.P. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex *in vivo*.
J. Biol Chem. 272:29337–29346. 1997.

Scherer P.E., Lisanti M.P., Baldinig , Sargiacomo M., Corly-mastick C. and Lodish H.F. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles.
J. Cell Biol. 127:1233-1243 1994.

Scherer P.E., Tang Z-L., Chun M.C., Sargiacomo M., Lodish H.F. and Lisanti M.P. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe.
J. Biol Chem. 270:16395–16401. 1995.

Scherman D., Nordmann J. and Henry JP. Existence of an adenosine 59-triphosphate dependent proton translocase in bovine neurosecretory granule membrane.
Biochemistry 21: 687–694 1982.

Schlegel A. and Lisanti M.P. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad .
J. Cell Physiol. 186: 329-337 2000

Schnitzer J.E., Liu J. and Oh P. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins and GTPases.

I-Immuno-histochimie

1.Fixation

Solution de formaldéhyde à 8% à partir du paraformaldéhyde :

Mettre 8 g de paraformaldéhyde en suspension dans 100 ml d'eau.
Sous hotte chauffer la suspension sur un agitateur magnétique chauffant .
Lorsque la suspension frémit aux alentours de 80°C, ajouter quelques gouttes de la solution alcaline de NaOH (1N).
Refroidir rapidement dans la glace.
Utilisation rapide ou conservation à +4°C.

Solution tamponnée de formaldéhyde à 4% :

Mélanger :

1 volume Formaldéhyde à 8%
1 volume Tampon Phosphate 0.2 M

Composition des solutions tampons (Tp)

Tp PBS (10X)	Tp P (0.2 M), pH 7.4
18g NaCl 9.4 g Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O 0.692 g NaH ₂ PO ₄ , 1 H ₂ O q.s.p 200 ml H ₂ O distillée	14.5 g Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O 1.32 g NaH ₂ PO ₄ , 1 H ₂ O q.s.p 250 ml H ₂ O distillée

P : Phosphate

PBS: Phosphate buffered saline

2. Préparation des lames gélatinées

Composition du mélange gélatine /alun de chrome

1.25 g Gélatine
0.125 g Alun de chrome

q.s.p 250 ml H₂O distillée

le mélange est chauffé à une température inférieure à 45°C

filtrer le mélange

le laisser refroidir

tremper des lames dans la solution

mettre à sécher à température ambiante

3.Immunoenzymologie

1.principe voir (figure 14)

2.Protocole

Lavage des coupes avec le PBS sous agitation 3 fois 10 minutes
Perméabilisation avec le Triton* X- 100 ,0.5% pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C sous agitation
Lavage avec le PBS sous agitation 3 fois 10 minutes
Démasquage enzymatique si nécessaire avec une protéinase
Incubation avec le sérum (5% dans le PBS V/V) pour blocage des sites non spécifiques pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C
Lavage 3 fois 10 minutes avec le PBS sous agitation
Incubation avec l'hydrogène peroxyde (H₂O₂) à 0.3% pour blocage de la peroxydase endogène pendant 30 minutes à une température de 20 à 25°C
Lavage 3 fois 10 minutes avec le PBS sous agitation
Incubation avec l'anticorps primaire une nuit (ou 15 heures) sous agitation à une température de 20 à 25°C
Lavage 3 fois 10 minutes avec le PBS sous agitation
Incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C
Lavage avec le PBS sous agitation 3 fois 10 minutes
Incubation à l'obscurité avec le complexe streptavidine-peroxydase pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C
Lavage avec le PBS sous agitation 3 fois 10 minutes
Incubation à l'obscurité avec le DAB** (voir composition ci- dessous) pendant 10-30 minutes
Lavage avec l'eau distillée sous agitation 3 à 4 fois 10 minutes
Une réaction positive se révèle par une coloration marron

*Iso-octyl phénoxy polyéthoxy éthanol

**Diamino-benzidine-tetrachloride

•Solution de DAB :

préparer une solution de 1% de DAB
une fraction de 1ml de la solution est reconstituée pour être utilisée avec
9 ml de tris 0.05 M, pH 7.6
les autres fractions sont aliquotées et conservées à -20°C.

II – Technique «Western-blotting »

1. Principe

Le western blot est une **technique qualitative** permettant de détecter des antigènes dans des **milieux complexes**.

Cette technique associe 3 grandes étapes :

1.Séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS et de β - mercaptoéthanol .

2.Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose ou de nylon PVDF (polyvinylidene difluoride).

3.Révélation immunologique par des Ac marqués par une enzyme (voir principe d'immunoenzymologie).

2. Préparation des fractions

Milieu pour récupération des tissus (Tp MOPS)

20 mM MOPS*
0.1mM EDTA**, pH6.8 ajusté avec le KOH 1N
150mM NaCl

* Acide morpholino-4 propanesulfonique ($C_7H_{15}NO_4S$), M : 209.26 g.mol⁻¹

** Acide éthylènediaminetétraacétique ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), M :292.25 g.mol⁻¹

Préparation du Tp MOPS/ inhibiteur de protéase (IP)

Solution IP

Composition :Phenylmethyl-sulfonyl (1mM), inhibiteur soybean trypsin (10 nM), Trasylol (aprotinine; inhibiteur 160 kallikreine U/ml), pepstatine (1.5 μ M), chloroquine (0.1 mM).

Faire fondre une pastille dans 500 μ l d'eau distillée.

Solution MOPS/IP

Mélanger 5 μ l de la solution d'IP dans 500 μ l de Tp MOPS

Composition du tampon Laemmli (1x)

Composants	[] finale
Tris*-HCl	62.5 mM, PH 6.8
SDS**	2%
Glycérol	25%
Bleu de bromophenol	0.01%

*Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane ($C_4H_{11}NO_3$), M : 121.14 g.mol⁻¹

**Sodium Dodécyle sulfate ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), M: 288.38 g.mol⁻¹

3. Dosage des protéines

3.1.Principe

D'après la technique de Bradford (1976)

Les protéines en présence du réactif de Bradford forment un complexe coloré qui a la propriété d'absorber la lumière à une longueur d'onde de 595nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des protéines.

3.2.Composition du réactif de Bradford

50 mg Bleu de Coomassie G250
25 ml Ethanol 95%
50 ml Acide orthophosphorique 85%

q.s.p 500 ml (à compléter avec H₂O distillée)

Remarque

bien agiter le mélange , filtrer, conserver à l'obscurité à +4°C.

A ajouter juste avant lecture au spectrophotomètre, après 10 minutes d' incubation.

3.3. Préparation de la gamme étalon

Préparation d'une gamme de solutions protéiques de concentration connues à partir d'une solution de BSA (Bovine Sérum Albumine) à raison de 0.1 %.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA(μl)	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80
PBS(μl)	100	95	90	80	70	60	50	40	30	20
BSA(μg)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
Rf. de Bradford	3ml									

V BSA+V PBS= 100 μl

3.4.Préparation des échantillons pour le dosage

Echantillons	P1		P2		S	
(μl)	5	10	5	10	5	10
PBS(μl)	95	90	95	90	95	90
Rf. de Bradford	3 ml					

V échantillon+V PBS= 100 μl

P1 : fraction enrichie en pituicytes

P2 : fraction enrichie en neurosécrétosomes

S : fraction contenant entre autres des granules de sécrétion

.5.Courbe standard $A = f(C) \Rightarrow A = \epsilon l C \Rightarrow \epsilon l = A/C$

A : Densité optique (DO) unité de DO (UDO)

ϵ : coefficient d'extinction moléculaire

l : trajet optique (cm)

C : Concentration ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)

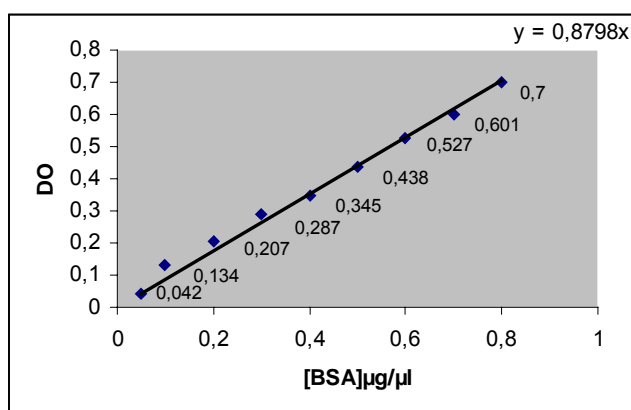
D'après la courbe : $\epsilon l = 0.879$

$[P_1] = A(P_1) / 0.879 \Rightarrow [P_1] = 0.506 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

$[P_2] = A(P_2) / 0.879 \Rightarrow [P_2] = 0.230 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

$[S] = A(S) / 0.879 \Rightarrow [S] = 0.398 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Les trois fractions sont multipliées par l'inverse de la dilution (x 10) pour avoir la concentration des échantillons bruts.



3.Migration des protéines

Composition et quantités pour minigels de SDS-poplyacrylamide

Gel de séparation			
Composants	Volume pour différents % d'acrylamide		
	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12%</u>
Tampon.1 (4X)	2.5 ml	2.5ml	2.5ml
Eau distillée	5.4 ml	4.9ml	4.4 ml
Solution d'acrylamide,40%	2.0 ml	2.5ml	3.0 ml
Glycérol	1 ml	1 ml	1 ml
APS*,10%	50.0µl	50.0µl	50.0µl
TEMED**	5.0 µl	5.0 µl	5.0 µl

Gel de concentration	
Composants	Volume
Tampon.2 (4X)	2.5 ml
Eau distillée	6.6 ml
Solution d'acrylamide,40%	0.8 ml
APS*,10%	100 µl
TEMED**	10 µl

Composition des solutions	
Solution d'acrylamide,40%	38.9g acrylamide, 1.1g bisacrylamide dans100ml eau distillé
Tampon-1(4X)	1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS
Tampon-2 (4X)	0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS
Tampon de migration (10X)	25mM Tris base, 192mM glycine, 0.1% SDS, PH ajusté à 8.3

* ammonium persulfate

** N,N,N,' N'-tetramethylethylénediamine

Milieux pour coloration et décoloration de gels

	Coloration	Décoloration
Composants	Méthanol, 50% (v / v) Acide acétique, 10% (v / v) Bleu de Coomassie R-250, 0.25% (p / v)	Méthanol, 10% (v / v) Acide acétique, 5% (v / v)
Température	50°C	50°C
Durée	30 min	Jusqu'à décoloration du fond

Remarque :

.Pour la coloration, le bleu de Coomassie est mélangé en premier lieu avec le méthanol pendant 5 min, en second lieu l'eau et l'acide acétique sont ajoutés graduellement à la solution sous agitation .

.La décoloration du fond fait apparaître les bandes protéiques colorées au bleu de Coomassie

Milieu pour séchage de gels

25% Méthanol
10% Isopropanol
2% Glycérol

Protocole

Le gel est incubé pendant une nuit dans le milieu de séchage sous agitation
Rincer le gel rapidement avec de l'eau distillée
Placer une plaque de verre siliconisée
Étendre une feuille de cellophane humectée avec de l'eau distillée bien à plat sur la plaque de verre
Éliminer les bulles d'air entre la plaque et le gel
Déposer sur le gel une feuille de cellophane plus grande que la plaque de verre
Étirer et replier la feuille de cellulose sous la plaque de verre et attacher en place avec des pinces métalliques
La feuille de cellulose doit être le plus tendu possible et on doit éviter la présence de bulles d'air
Laisser sécher une nuit sous la hotte aspirante.

4. Transfert des protéines

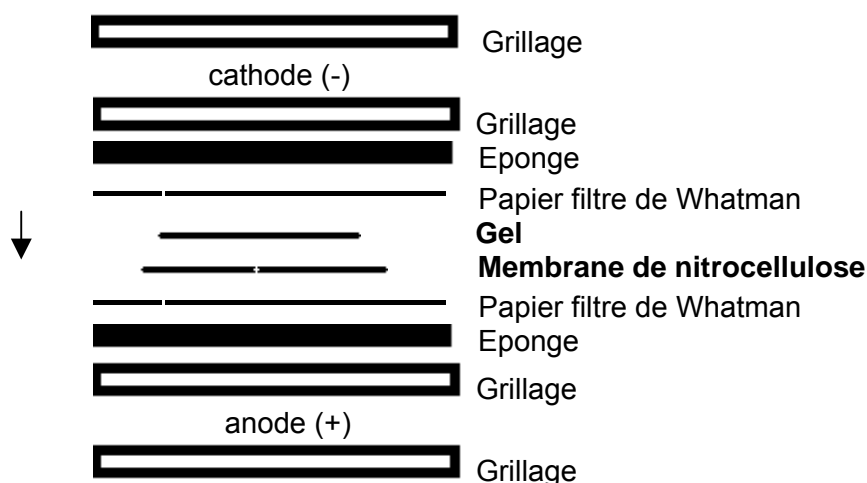


schéma du montage (sandwich) du gel avec la membrane de nitrocellulose dans l'appareil de transfert

Remarque

Les protéines sur le gel, ayant toutes une charge négative se dirigeront vers l'anode(+) et se trouveront par conséquent, sur la membrane de nitrocellulose grâce à son effet buvard. La flèche indique le sens du transfert.

Tampon (10X) pour transfert de protéines

25mM Tris base*, pH 8.3
 192mM glycine
 0.1% SDS
 20% Méthanol (v / v)

*N-[Tris(hydroxyméthyl)méthyl] glycine (tricine) ($C_6H_{13}NO_5$), M : 176.17 g.mol⁻¹

Milieus pour coloration et décoloration des membranes de nitrocellulose

Coloration		Décoloration : Tp PBS-T	
0.5%	Rouge ponceau	10	mM phosphate de sodium
20%	Méthanol (v / v)	154	mM NaCl
1%	Acide acétique (v / v)	0.1%	Tween*-20

*Polyethylene-sorbitan monolaurate

Remarque

- La mise en évidence des protéines est obtenue après coloration de la membrane pendant 15 min puis sa décoloration avec de l'eau distillée. S'il y'a eu le transfert les protéines s'observe colorées en rouge.
- les bandes protéiques sont par la suite décolorées par des lavages avec le tampon PBS-T.

III – Technique « Ligand- blotting »

1.Principe

C'est une technique qui permet la mise en évidence d'interactions pouvant exister entre deux protéines. L'une des protéines est fixée sur un support solide (membrane de nitrocellulose) et l'autre constitue le ligand, l'interaction peut être mise en évidence par immunodétection avec des anticorps dirigés contre les ligands.

2.Protocole

Echantillon suspendu dans du tampon laemmli
Electrophorèse SDS-PAGE
Transfert sur membrane de nitrocellulose
Incubation dans du lait / BSA (3% /1%) dans le PBS-T pendant 15 heures (ou une nuit) à +4°C.
Lavage 1fois par le PBS-T
Incubation de la membrane pendant 10 min dans le tampon overlay (voir composition ci- dessous)
Mettre le ligand dilué dans le tampon Overlay à une concentration finale de 40 µg/ml pendant 15 heures à +4°C
Lavage 3 fois 10 min par le PBS-T
Sécher la membrane de nitrocellulose avec du papier filtre Whatman (cette étape sert pour stabiliser la liaison du ligand)
Réhydratation de la membrane par le PBS-T 1% BSA
Incubation avec l'anticorps dirigé contre le ligand
Lavage 3 fois 10 min par le PBS-T
Incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé 1 heure à température ambiante
Incubation avec le complexe streptavidine-peroxydase 1 heure à température ambiante

Révélation au DAB

Composition du tampon Overlay

Composants	M	[] finale
HEPES* pH 7.0	238.30 g.mol ⁻¹	25 mM
EDTA	292.25 g.mol ⁻¹	0.5 mM
EGTA**	380 g.mol ⁻¹	5 mM
Glycerol	92.10 g.mol ⁻¹	0.9 M
Tween-20		0.1 %
NaN ₃ ***	65.01 g.mol ⁻¹	1 mM
BSA		3 %
MgSO ₄ ,7H ₂ O	246.47 g.mol ⁻¹	4 mM

*Acide 2-[4(2-Hydroxyetyl)-1-Pipérazinyl] Ethanesulfonique

**Ethylénglycol-bis-(beta-aminoéthylester)N,N'-tétraacétique

***Sodium Azide

Liste des produits utilisés

- Acide acétique
- Acide orthophosphorique
- Agar-agar
- Acide chloridrique (HCl)
- Acide morpholino-4 propanesulfonique (MOPS)
- Acrylamide
- 3-Amine 9- éthyle carbazole (AEC)
- Ammonium persulfate (APS)
- Alun de chrome
- Bisacrylamide
- Bovine serum albumine (BSA)
- Bleu de bromophenol
- Bleu de Coomassie G250
- Bleu de Coomassie R250
- β -mércaptoethanol
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)
- EDTA (Acide éthylènediaminetétraacétique)
- EGTA (Ethyléneglycol-bis-[beta-aminoéthylester]N,N'-tétraacétique)
- Ethanol
- Gélatine
- Glycérol
- Glycine
- Hepes (Acide 2-[4(2-Hydroxyetyl)-1-Pipérazinyl] Ethanesulfonique)
- Hydrogène peroxyde (H_2O_2)
- Isopropanol
- Lait écrémé
- Magnésium sulfate ($MgSO_4$)
- méthanol
- Paraformaldehyde
- Phosphate disodique 12 fois hydratée (Na_2HPO_4 , 12 H_2O)
- Phosphate monosodique 1 fois hydratée (NaH_2PO_4 , 1 H_2O)
- Rouge Ponceau
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- Sodium Azide (NaN_3)
- Sodium hydroxyde (NaOH)
- Super-glue
- Temed (N,N,N,'N'-tetramethylethylènediamine)
- Thimérosal
- Triton X – 100 (Iso-octyl phénoxy polyéthoxy ethanol)
- Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane (Tris)
- Tris-base (N-[Tris (hydroxyméthyl) méthyl] glycine)
- Tween (Polyethylene-sorbitan monolaurate)
- Uréthane
- Xylol