

50376
1974
154

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I
U.E.R. DE BIOLOGIE

50376
1974
154

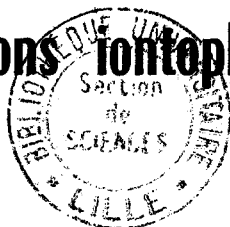
THESE
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE 3^{me} CYCLE
Mention Physiologie animale

présentée par

Bernard CARETTE

Activités unitaires et réponses antidromiques de neurones de l'hypothalamus médian chez le cobaye

Modifications iontophorétiques



soutenue le 10 Juillet 1974 devant la Commission d'Examen

MM. P. GUILBAULT, Président
J. BARRY, Rapporteur
J.P. ROUSSEAU, Examineur
J.C. ROY, Examineur



0300138291

Travail réalisé dans le Laboratoire d'Histologie
de la Faculté de Médecine de Lille
Directeur : M. J. BARRY

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	1
TECHNIQUES	5
- Préparation de l'animal	6
1) Poids	6
2) Anesthésie	6
3) Mise en place	6
- Techniques stéréotaxiques	7
1) Principe	7
2) But	7
3) L'appareil stéréotaxique	8
4) Le système tri-dimensionnel de coordonnées	8
5) Protocole expérimental pour les coordonnées antéro-postérieure et latérale	9
6) Protocole expérimental pour la profondeur	11
- Techniques électrophysiologiques	11
A - Techniques d'enregistrement	12
1) Principe	12
2) Appareils utilisés	12
3) Préparation des microélectrodes	14
- étirage	14
- remplissage	14
- mesure de la résistance des microélectrodes	15
B - Techniques de stimulation de l'éminence médiane	15
1) Position de l'électrode de stimulation	15
2) Constitution de l'électrode de stimulation	15
3) Paramètres de stimulation	17
C - La microélectrophorèse	17
1) Définition	17
2) Principe	17
3) Appareils utilisés	17
4) Fabrication des microélectrodes triples	19
5) Préparation des substances	20

6) Remplissage des microélectrodes multiples	20
- remplissage par ébullition	20
- remplissage par centrifugation	20
7) Stockage des microélectrodes	21
8) Mesure de la résistance des microélectrodes	21
- Techniques histologiques de micromarquage	21
1) But	21
2) Mode opératoire	21
α) Fixation	22
β) Obtention des coupes	22
γ) Coloration	22
δ) Etude quantitative de la préparation histologique	22
- Méthodes d'analyse de l'activité unitaire spontanée	23
RÉSULTATS	25
A - Problèmes posés par la technique d'enregistrement	26
1) Variations de potentiel observées au cours de la descente de la microélectrode	26
2) Stabilité de l'activité unitaire obtenue avec la technique employée	26
3) Forme et polarité des potentiels d'action	28
4) Relation entre la profondeur de l'électrode et l'amplitude des potentiels d'action	29
5) Relation entre la profondeur de l'électrode et la fréquence des potentiels d'action	30
6) Relation entre la profondeur de l'électrode et la distribution des intervalles de temps entre les impulsions	31
B - Critères d'enregistrement	38
1) Critères pour l'enregistrement d'une activité unitaire isolée	38
2) Précautions prises	39
C - Caractéristiques de l'activité unitaire spontanée des neurones du noyau arqué	40
1) Processus stationnaires	40
2) Fréquences moyennes	43
3) Structure temporelle de l'activité unitaire des neurones du noyau arqué	46
4) Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions	46
5) Discussion	51

D - Réponses à la stimulation de l'éminence médiane	55
1) Localisation des neurones	55
2) Critères d'identification du caractère antidromique d'un potentiel d'action	55
- forme du potentiel d'action antidromique	55
- fixité de la latence des potentiels d'action antidromiques	55
- réponses à des stimuli répétitifs	59
- réponses à une paire de stimuli	59
- collision d'un potentiel d'action antidromique avec des impulsions survenant spontanément	59
3) Réponses atypiques	60
4) Discussion	60
E - Résultats en microélectrophorèse	64
1) Effet du courant	64
2) Effets du L-glutamate sur les neurones de l'hypothalamus médio-basal	65
- nombre et localisation des neurones testés	65
- caractéristiques des effets du glutamate	65
3) Discussion	68
DISCUSSION GÉNÉRALE	72
A - Problèmes de l'échantillon cellulaire	73
B - Neurones tubéro-infundibulaires dopaminergiques et neurones activés antidromiquement	74
CONCLUSION	76
BIBLIOGRAPHIE	78

- 1 -

INTRODUCTION

Dès le 18ème siècle, il est reconnu, avant toute investigation systématique, que le système nerveux central est impliqué dans le contrôle des gonades. Par la suite (début du 20ème siècle), des rapports cliniques établissent clairement une corrélation entre l'atrophie génitale et la lésion hypothalamique. Cependant, la signification de cette corrélation reste dans l'ombre, dominée par l'idée que l'hypophyse antérieure est l'organe qui exerce un contrôle immédiat sur les gonades et par la découverte de relations réciproques entre les sécrétions des hormones hypophysaires et celles de leurs glandes cibles. POPA et FIELDING (1930) font la première description d'un lien anatomique entre l'hypothalamus et l'adénohypophyse, appelé système porte hypothalamo-hypophysaire. Bien que HOHLWEG et JUNKMAN (1932) aient proposé que les effets des stéroïdes sexuels sur la sécrétion gonadotrope se fassent par l'intermédiaire d'un centre sexuel dans l'hypothalamus, ces idées prophétiques n'ont pas retenu l'attention immédiatement.

Des preuves expérimentales plus convaincantes de l'implication de l'hypothalamus dans le maintien de la fonction gonadique normale sont apparues vers les années 40, ont abouti au concept selon lequel l'hypophyse antérieure, considérée jusque-là comme la principale glande est réellement contrôlée par l'hypothalamus, et à l'hypothèse de GREEN et HARRIS (1947). C'est la théorie neuro-vasculaire : le lien essentiel entre l'hypothalamus et l'adénohypophyse est vasculaire et non nerveux, et les fonctions variées de l'hypophyse antérieure sont contrôlées par différentes substances soit excitatrices, soit inhibitrices, libérées dans les capillaires de l'éminence médiane. Les substances transportées par les vaisseaux portes stimulent ou inhibent la production d'hormones et leur libération à partir des cellules de l'hypophyse antérieure.

Cette théorie dépend de neurones hypothalamiques qui se projettent dans l'éminence médiane et constituent la voie finale commune par laquelle le cerveau contrôle l'hypophyse antérieure. Aussi le noyau arqué ou noyau infundibulaire, en raison de sa position dans l'hypothalamus par rapport à l'hypophyse, a-t-il fait l'objet de nombreuses études pour déterminer son rôle dans l'axe cerveau-hypophyse-glandes cibles.

Il a été montré, par des études histologiques que des neurones de la région arquée contribuent à la constitution du tractus hypothalamo-infundibulaire (LEFRANC, 1965 ; BARRY, 1967a), en se projetant sur la couche externe de l'éminence médiane. Des expériences de

lésions du noyau arqué ont soit bloqué l'ovulation réflexe (SAWYER et ROBINSON, 1956 ; SAWYER, 1956 ; SAWYER, 1959) soit entraîné une atrophie gonadique (DEY, 1942 ; FLERKO et BARDOS, 1959 ; BOGDANOVE, 1954). Des expériences d'implantation de cristaux de 17β œstradiol dans les noyaux infundibulaires de rats mâles et femelles ont eu pour résultat une atrophie gonadique et une réduction du diamètre des noyaux dans les neurones (LISK et NEWLON, 1963). IFFT (1962) a fait la même observation chez des rattes en diœstrus induit par diverses méthodes expérimentales. Des études autoradiographiques ont montré que l'œstradiol marqué C14 est concentré par les neurones du noyau arqué et trouvé seulement dans quelques autres régions de l'hypothalamus (STUMPF, 1968 ; ATTRAMADAL, 1970). Une étude en microscopie électronique fait apparaître que le noyau infundibulaire est constitué d'un ensemble de cellules de même type. Quant aux afférences de ce noyau, elles seraient d'origine multiple, (MAZZUCA, 1968).

Toutes ces études considèrent cette région hypothalamique comme une unité homogène. Or, plusieurs arguments sont en faveur d'une population cellulaire hétérogène dans le noyau arqué.

FUXE, (1964), utilisant la technique de fluorescence pour la mise en évidence des monoamines a montré la présence de catécholamines dans les cellules du noyau infundibulaire chez le cobaye et le rat. Par la suite, FUXE et HOKFELT (1966) ont précisé que 10 à 20 % des neurones de ce noyau sont de type dopaminergique. BRAWER (1971) a observé, en microscopie électronique, au niveau de cette région arquée, chez le rat mâle après castration, des neurones contenant un «whorled body», sorte de concentration du réticulum endoplasmique granuleux et des cellules montrant de grandes accumulations de vésicules denses. Ceci indique un changement dans l'activité des cellules affectées. Mais seulement un petit nombre de neurones du noyau arqué montre de tels changements ; aussi est-il vraisemblable que ce noyau contient une population cellulaire hétérogène. Selon BRAWER, il y aurait différents types cellulaires dans le noyau infundibulaire qui contrôlent les différentes fonctions de l'hypophyse antérieure, le «feed-back» des stéroïdes gonadiques affectant seulement ces cellules impliquées dans le contrôle de la fonction gonadotrope. Il est également possible que les neurones non affectés par la castration n'aient pas de fonction neuro-endocrinienne directe. Cette hétérogénéité cellulaire apparaît également en utilisant une technique électrophysiologique d'enregistrement de l'activité multi-unitaire des neurones du noyau arqué. Selon GALLO et coll. (1971), il y aurait deux pôles opposés de neurones dans cette aire hypothalamique. Certaines cellules répondraient à la stimulation pré-optique par augmentation d'activité et en association avec une activation hypophysaire (pôle excitateur). D'autres augmentent leur taux d'activité après stimulation de l'hippocampe quand le mécanisme de sécrétion de LH est abaissé (pôle inhibiteur). Ce

concept de deux pôles opposés dans les limites d'un noyau n'est pas nouveau. Il a été démontré en ce qui concerne le noyau ventro-médian (MURPHY et RENAUD, 1969). La stimulation de l'amygdale révèle un groupe de neurones sur le bord latéral du ventro-médian capable d'altérer l'activité de neurones situés à l'intérieur de ce même noyau.

Cette diversité de comportement de neurones hypothalamiques adjacents limite elle-même la valeur des techniques d'activité de masse telles que l'enregistrement d'une activité électrique multi-unitaire représentant l'activité simultanée d'un certain nombre de cellules. Par contre, l'enregistrement unitaire peut être une méthode de choix pour l'étude des neurones hypothalamiques. Dans ce cas, le phénomène électrique enregistré avec cette technique représente les potentiels d'action ayant pour origine le neurone localisé près de la pointe de microélectrode d'enregistrement.

La première partie de ce travail porte sur l'activité unitaire des cellules du noyau arqué, enregistrée au moyen de microélectrodes de verre, implantées stéréotaxiquement.

La stimulation du lobe nerveux de l'hypophyse ou de l'éminence médiane a permis d'établir une relation directe entre les noyaux supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus et le site de stimulation (ISHIKAWA et coll. 1966 ; YAGI et coll. 1966 ; DYBALL et KOIZUMI, 1969 ; KELLY et DREYFUSS, 1970). Cette technique a été appliquée aux neurones de la région médiane du tuber dans le but d'identifier les cellules nerveuses dont les axones se rendent à l'éminence médiane.

La dernière partie concerne l'étude microélectrophorétique. La complexité des connections entre neurones du système nerveux central et la présence de barrières hémato-cérébrale, fluide cérébro-spinal-cerveau, et synaptique (CURTIS et ECCLES, 1958) rendent difficile l'obtention de preuves convaincantes du site central de l'action de substances chimiques injectées de façon intraveineuse, intra-artérielle ou appliquées de façon locale à une région du cerveau. La microélectrophorèse, mise au point dans notre laboratoire par POULAIN (POULAIN et BARRY, 1971 ; POULAIN, 1972) est une technique d'administration de substances chimiques qui permet d'éviter ces barrières et d'exclure des effets indirects des solutions testées. Les quantités libérées au moyen d'une microélectrode à canaux multiples sont infimes et par conséquent, la concentration dans le tissu négligeable sauf dans le voisinage immédiat des neurones sous observation.

Les résultats obtenus avec ces différentes techniques sont discutés en relation avec le problème de l'échantillon cellulaire de l'aire hypothalamique étudiée et celui des neurones tubéro-infundibulaires.

PRÉPARATION DE L'ANIMAL

1) Poids

Un matériel totalement homogène (animaux de même âge, race, poids, proportions du crâne etc....) est nécessaire pour la réussite des placements stéréotaxiques.

Notre étude a été effectuée sur des cobayes tricolores adultes de sexe masculin dont le poids était de 400 grammes plus ou moins 20 grammes.

2) Anesthésie

L'anesthésie de l'animal est réalisée à l'aide d'un mélange nembu-tal-uréthane dont la composition est la suivante :

- 0,15 cc de nembutal
- 0,85 cc d'uréthane 20 %

soit 1 ml d'anesthésique pour des animaux de 400 grammes.

L'injection de ce mélange est intra-péritonéale.

3) Mise en place

Après canulation de la trachée, les cobayes sont placés dans un appareil de contention solidaire du dispositif d'implantation stéréotaxique. L'ensemble est situé dans une cage de Faraday.

Dans un premier temps, la peau du crâne est découpée, les os mis à nu, nettoyés. Une microélectrode est ensuite montée sur son support et les lieux de trépanation sont indiqués sur la surface du crâne en se référant au point zéro de l'appareil

stéréotaxique. La trépanation est alors réalisée à l'aide d'une fraise de dentiste. Le trou ainsi pratiqué permettra le passage de la microélectrode.

La dure-mère est incisée afin de mettre à nue la surface du cerveau tout en évitant autant que possible de léser le sinus longitudinal médian. Au besoin, le trou pourra être rempli de gélose afin de faciliter la formation d'un caillot de sang et d'éviter la perte de liquide cérébro-spinal. Par ailleurs, les pulsations du cerveau se trouveront réduites.

Dans un dernier temps, l'animal est curarisé (Flaxédil) et mis sous respiration artificielle à l'aide d'une pompe (BRAUN MELGUNSEN) de débit réglé à environ 600 ml/minute. La curarisation permet d'éviter les artéfacts d'origine musculaire. Au cours de l'expérience, le Flaxédil est renouvelé à la demande.

L'expérimentation peut alors commencer ; les premiers enregistrements d'activité unitaire sont habituellement effectués une heure trente à deux heures après anesthésie de l'animal.

TECHNIQUES STÉRÉOTAXIQUES

1) Principe

Une électrode (métallique ou de verre) ou une canule est introduite d'une manière mécanique, sans contrôle visuel direct, dans une certaine structure nerveuse dont la position est donnée par référence à un système tri-dimensionnel de coordonnées.

2) But

Dans notre étude, une microélectrode de verre est placée stéréotaxiquement, dans le dessein d'enregistrer l'activité unitaire de neurones hypothalamiques du siège donné.

3) L'appareil stéréotaxique (distribué par BALTIMORE INSTRUMENTS COMPANY)

Il consiste en deux parties fondamentales :

- une partie fixe la tête de l'animal dans une position définie de façon précise,
- un système permet la mesure des mouvements du support de l'électrode dans les coordonnées stéréotaxiques.

Le montage de la tête s'effectue sur l'appareil stéréotaxique au moyen de pointes d'oreilles. Le plan frontal ou antéro-postérieur de référence est ainsi donné par la ligne joignant les conduits auditifs. L'orientation du crâne est réalisée par des griffes d'orbites spéciales plaçant l'axe longitudinal du cerveau dans un plan horizontal. Enfin une barre horizontale est placée sous les incisives supérieures de l'animal. La tête du cobaye est ainsi parfaitement immobilisée.

Le système permettant le déplacement du support de l'électrode dans les coordonnées antéro-postérieures et latérales est gradué au 1/10 mm. Pour la coordonnée de la profondeur, le même support est relié à un micromanipulateur hydraulique (type WELLS) qui permet de réaliser à distance, la descente, micron par micron, de la microélectrode.

4) Le système tri-dimensionnel de coordonnées

Le système utilisé comporte trois plans perpendiculaires l'un à l'autre.

- Le plan antéro-postérieur a comme plan de référence la ligne inter-auriculaire,
- le plan latéral est estimé à partir de la suture sagittale du crâne,
- la profondeur est calculée à partir de la surface du cerveau.

L'atlas stéréotaxique fournissant ces coordonnées a été réalisé au laboratoire par POULAIN (1971) pour des cobayes femelles de 400 gr. Il concerne les structures hypothalamiques de cet animal.

5) Protocole expérimental pour les coordonnées antéro-postérieure et latérale

La mise en place d'une microélectrode sur son support nécessite de faire, à chaque fois la mise au point du «zéro de référence». Les erreurs d'appréciation étant inévitables lors de cette mise au point, il s'avère donc que les descentes effectuées avec différentes microélectrodes dans l'hypothalamus ne correspondent pas toujours aux coordonnées lues sur l'appareil stéréotaxique. Par conséquent, l'interprétation des traces de microélectrodes sur les coupes de cerveau ne peut pas faire l'objet d'une certitude absolue si plusieurs descentes avec différentes électrodes sont effectuées chez un même animal. Aussi convient-il de se limiter à la mise en place d'une seule microélectrode pour chaque cobaye.

Le noyau arqué a une position basale et médiane. Il s'étend antéro-postérieurement suivant les coordonnées :

A.P. : 11,2 mm

A.P. : 9,4 mm

et du point de vue latéralité de 0 à 1 mm à droite comme à gauche du plan médian. La coordonnée antéro-postérieure choisie de façon à atteindre le plus sûrement le noyau infundibulaire est 10,3 mm à mi-chemin entre 9,4 et 11,2, les sources d'erreurs possibles permettant par ailleurs d'explorer les différentes zones de ce noyau.

Pour parer à la difficulté d'atteindre ce noyau en ce qui concerne la latéralité, il peut être procédé de la façon suivante :

- la première descente est effectuée à la latéralité 0,3 gauche.
- la seconde descente, dans le même plan antéro-postérieur, est réalisée à 0,6 mm à droite par rapport à la précédente.

Supposons la première descente trop à gauche : par exemple, à 1,2 mm de la ligne sagittale (en considérant que c'est l'erreur maximum qui puisse être faite). Lors de la seconde descente, la coordonnée latérale sera 0,6 gauche ; dans ce cas, le noyau arqué est atteint (fig. 1).

Autre possibilité : l'électrode est en position médiane lors de la première descente, elle traverse donc le 3ème ventricule. La coordonnée latérale pour la seconde descente sera donc 0,6 mm droite, (fig. 1).

Deux ou plusieurs descentes sont ainsi effectuées en direction du noyau arqué, à l'aide de la même microélectrode, sur chaque animal.

Figure 1 :

Schéma montrant les différentes possibilités de trajet de la microélectrode d'enregistrement, sur une coupe frontale de l'hypothalamus de cobaye (position antéro-postérieure : 10,4). Le lettrage correspond à celui utilisé dans l'atlas stéréotaxique de POULAIN (1971).

Les coordonnées latérales et verticales sont exprimées en millimètres.

to : tractus optique

CI : capsule interne

pva : noyau paraventriculaire accessoire

fx : fornix

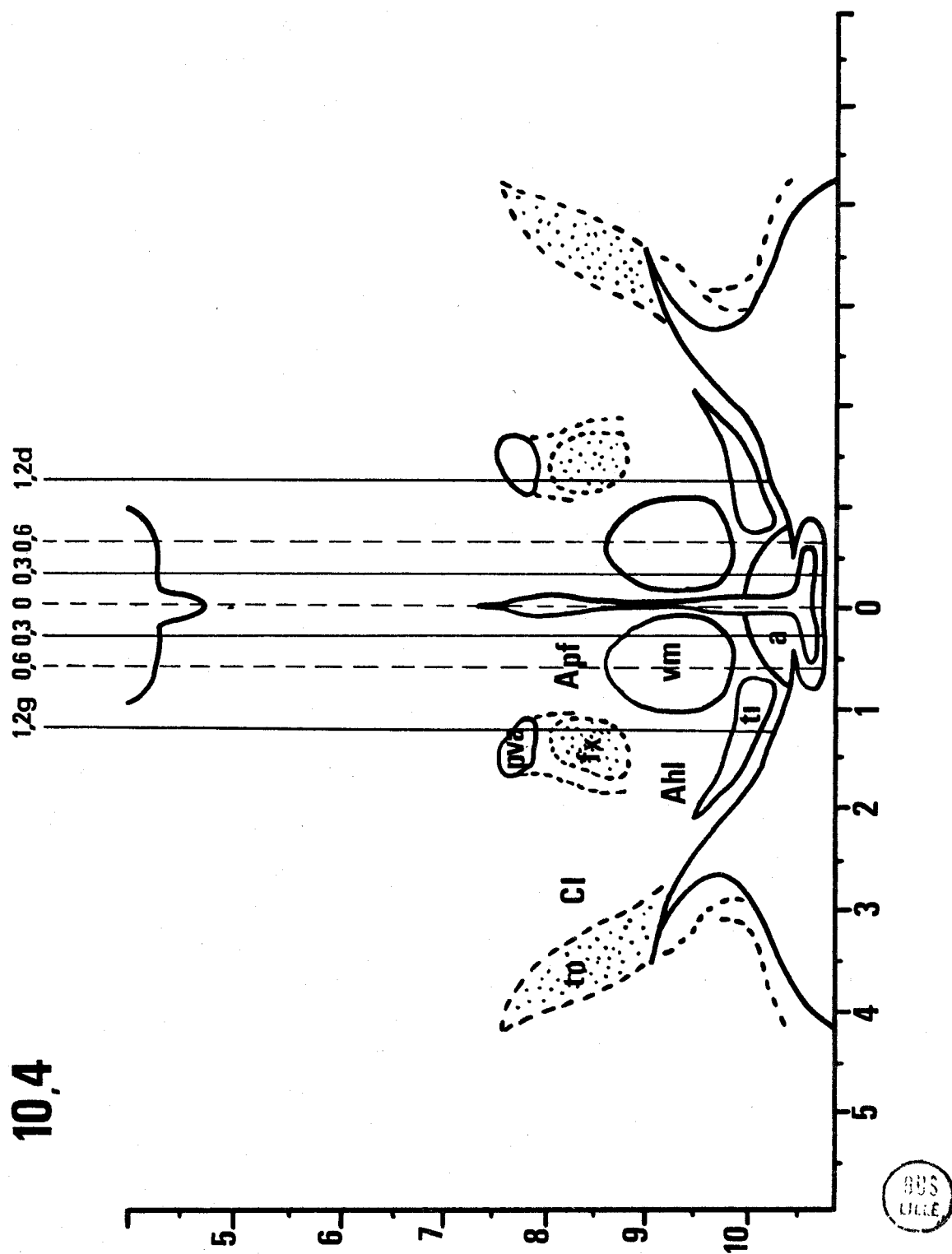
Apf : aire inter paraventricularo-fornicale

Ahl : aire latérale

tl : noyau du tuber latéral

vm : noyau ventro-médian

a : noyau arqué



6) Protocole expérimental pour la profondeur

En raison du fait que la profondeur est calculée à partir de la surface du cerveau, il convient de déterminer à quel moment la pointe de la microélectrode d'enregistrement atteint cette surface. Un contrôle visuel est possible à l'aide d'une loupe binoculaire mais il s'avère difficile et peu précis. Par contre, le moment où la pointe de microélectrode touche la surface du cerveau peut être suivi électriquement. Tant que l'électrode est en-dehors de ce tissu, l'entrée du changeur d'impédance étant mise en marche, on peut observer sur l'écran de l'oscilloscope un bruit de fond peu important. Dès que l'électrode entre en contact avec le cerveau, il y a une soudaine augmentation du bruit de fond observable aussi bien sur l'écran de l'oscilloscope que grâce à l'amplification sonore.

Il convient d'autre part de déterminer le moment où la pointe de microélectrode touche la base du cerveau afin d'éviter qu'elle ne s'y brise. Il est en effet, important de garder intacte cette microélectrode pour les raisons suivantes :

- d'une part parce que les spots servant au repérage des cellules sont réalisés lors de la remontée de la microélectrode,
- d'autre part parce que la même microélectrode sert à deux ou plusieurs descentes pour des raisons précédemment exposées.

Cette détermination se fait également de manière électrique. Le bruit de fond continuellement observé lorsque la microélectrode a pénétré dans le cerveau diminue au moment où la base du cerveau est atteinte. Dès cet instant, si la descente est poursuivie, un bruit de fond nettement plus important est observé indiquant que la pointe de l'électrode se brise.

TECHNIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

But : enregistrer extra-cellulairement - l'activité électrique spontanée des neurones hypothalamiques

- ses modifications entraînées par application de substances diverses au moyen de la microélectrophorèse

A - TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT

1) Principe

Les cellules nerveuses individuelles représentent des dipôles électriques variables. Le champ électrique qui s'étend autour d'elles dans le milieu externe peut être examiné avec une électrode. Puisque l'on estime qu'1 mm³ de tissu nerveux contient environ 10^4 neurones, il peut souvent arriver que la pointe de l'électrode soit affectée par le champ électrique de plusieurs unités. De là, un bon enregistrement réclame un bon isolement de l'activité d'une cellule dont le potentiel d'action doit être considérablement plus élevé que les décharges des autres éléments.

Ceci est réalisé à l'aide d'une microélectrode de verre dont le diamètre à la pointe est d'environ 1 micron. En déplaçant convenablement une telle microélectrode, une position peut être trouvée où le potentiel d'action d'une unité est maximal tandis que l'amplitude d'autres potentiels unitaires est minimale. Une électrode indifférente située en dehors du champ électrique de la cellule est placée sur une surface du corps de l'animal où vraisemblablement l'activité électrique du tissu sous-jacent est faible. Elle fournit un point de référence de potentiel relativement constant. Cette technique d'enregistrement est dite monopolaire (fig. 2).

2) Appareils utilisés

L'activité nerveuse enregistrée au moyen d'une microélectrode est conduite à un pré-amplificateur AC TEKTRONIX type RM 122 par l'intermédiaire d'une sonde et d'un changeur d'impédance GRASS modèle P 16 pour être observée sur l'écran d'un oscilloscope TEKTRONIX 502 A et à l'aide d'un «audio-monitor» GRASS AM 8. L'activité unitaire pourra être photographiée à partir de l'oscilloscope à l'aide d'une caméra kymograph GRASS pour processus d'analyse ultérieure.

Un système NEUROLOG permet l'enregistrement continu du taux de décharge des cellules. Ce système, sous forme de modules, est constitué d'un discriminateur de l'amplitude des potentiels d'action. (Trigger spike NL 200). Les impulsions ainsi sélectionnées alimentent un compteur automatique (Pulse integrator NL 600) recyclé chaque seconde (Pulse generator NL 300) et qui possède une sortie analogique activant le stylet chauffant d'un enregistreur sur papier thermo-sensible DEVICES M 2 (fig. 2).

Figure 2 :

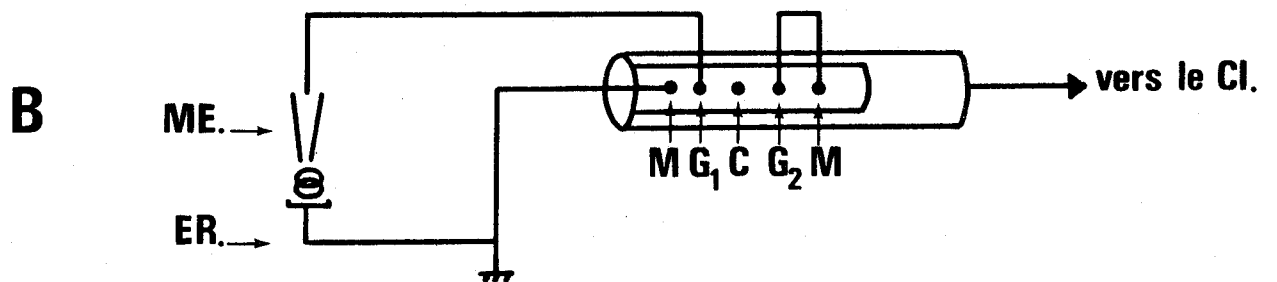
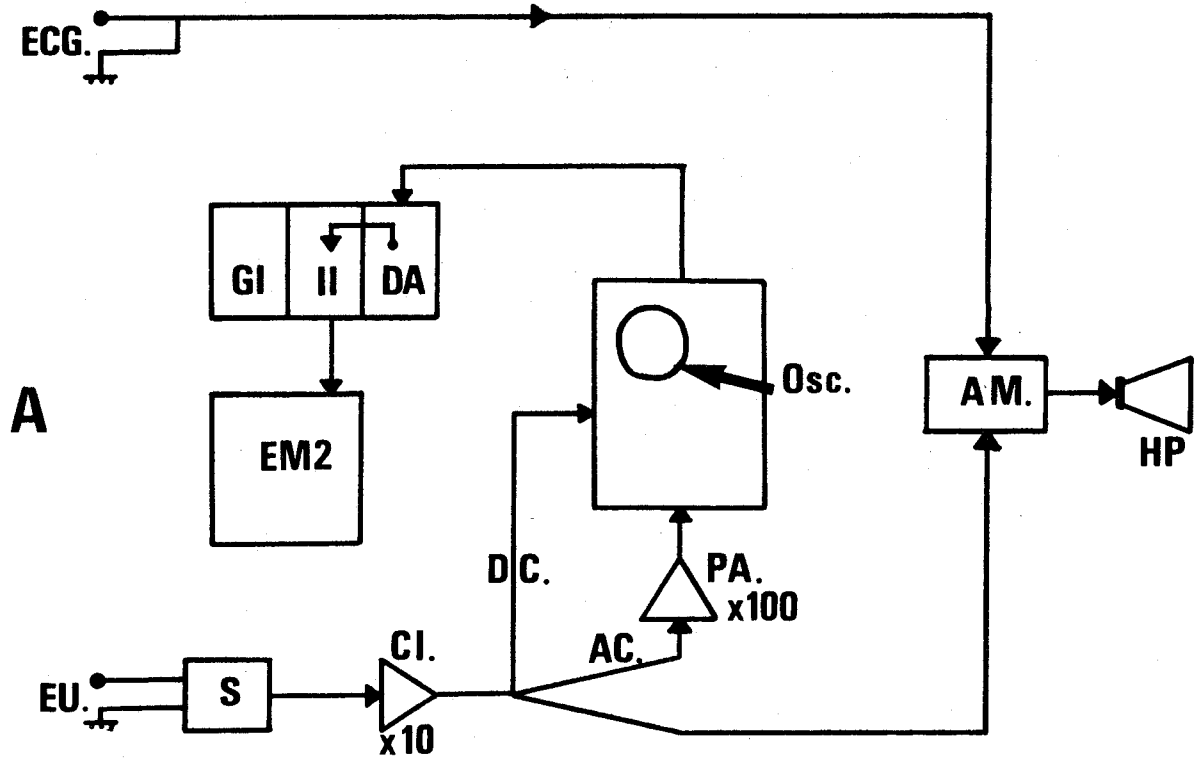
A - Schéma du circuit d'enregistrement

ECG	:	électrocardiogramme
EU	:	enregistrement unitaire
GI	:	générateur d'impulsions (pulse generator NL 300)
II	:	intégrateur d'impulsions (pulse integrator NL 600)
DA	:	discriminateur d'amplitude des potentiels d'action (spike trigger NL 200)
EM2	:	enregistreur sur papier DEVICES M2
S	:	sonde
CI	:	Changeur d'impédance
DC	:	enregistrement DC
AC	:	enregistrement AC
Osc	:	oscilloscope
PA	:	pré-amplificateur
AM	:	audio-monitor
HP	:	haut-parleur

B - Schéma de la sonde : enregistrement de type monopolaire

ME	:	microélectrode d'enregistrement
ER	:	électrode de référence
M	:	masse
C	:	calibration

Le pôle G2 de la sonde est relié à la masse pour l'enregistrement de type monopolaire.



Par ailleurs, en raison du mode de respiration choisi, un système d'électro-cardiogramme permet de contrôler en permanence, de façon sonore, l'état physiologique de l'animal.

3) Préparation des microélectrodes

- étirage

Fabriquées à partir de tubes de verre de diamètre interne 1 mm et de longueur égale à 7,5 mm, les microélectrodes simples sont obtenues à l'aide d'un appareil à étirement vertical (micro-étireuse NARISHIGE). Leur diamètre à la pointe varie entre 0,5 et 1,5 micron.

- remplissage

La microélectrode contiendra :

- d'une part : un colorant, le fast green FCF saturé, ceci en vue de réaliser un dépôt de colorant au niveau de la cellule étudiée,
- d'autre part : un électrolyte NaCl 2 M qui aura deux fonctions 1) permettre l'enregistrement de l'activité unitaire,
2) permettre le passage de colorant non ionisable par la technique de microélectrophorèse (THOMAS et WILSON, 1965 - LE ROC'H - POULAIN, 1972).

Etant donné la forme des microélectrodes utilisées (fig. 3), un remplissage direct par capillarité est possible.

La solution (colorant + électrolyte) est d'abord injectée dans la microélectrode à l'aide d'une seringue possédant une aiguille relativement fine. Ensuite le liquide est amené à la pointe de l'électrode à l'aide de vibrisses de lérot.

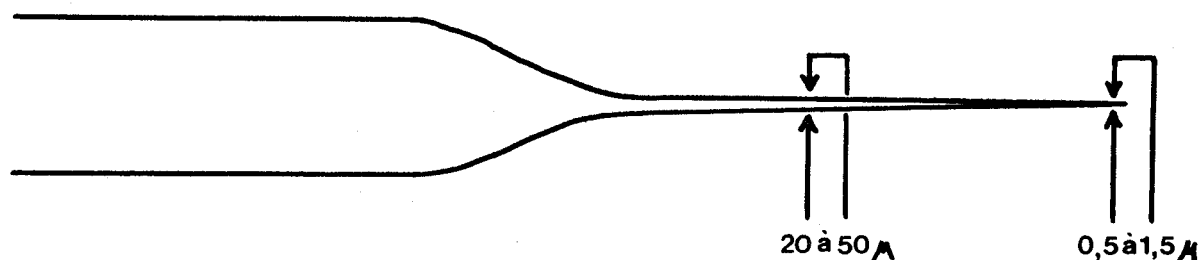


Fig. 3 : forme de la microélectrode obtenue avec l'étireuse NARISHIGE.

- mesure de la résistance des microélectrodes

Cette mesure est réalisée grâce au calibreur du changeur d'impédance GRASS modèle P 16. Seules sont conservées les microélectrodes qui présentent une résistance comprise entre 3 et 10 Mégohms, ce qui correspond à un diamètre à la pointe de 1,5 à 0,5 micron.

B - TECHNIQUES DE STIMULATION DE L'ÉMINENCE MÉDIANE.

1) Position de l'électrode de stimulation

L'électrode de stimulation est orientée stéréotaxiquement, de façon oblique, de sorte que son extrémité atteint la région de l'éminence médiane. Cette implantation se fait par approche dorsale, de l'arrière vers l'avant, en l'absence d'un contrôle visuel direct. Le repérage de la position de l'électrode de stimulation est effectué auparavant sur une «maquette» constituée par la tête d'un cobaye de 400 g dont le cerveau a été enlevé de façon à laisser apparaître la jonction hypothalamo-hypophysaire. (fig. 4)

2) Constitution de l'électrode de stimulation

Il s'agit d'une électrode de stimulation concentrique bipolaire. Le pôle externe consiste en un tube d'acier de diamètre interne 0,30 mm et de diamètre externe 0,40 mm. Dans ce tube est placé un fil métallique de diamètre 0,15 mm, constituant le pôle interne. Ces deux parties de l'électrode de stimulation sont isolées l'une de l'autre grâce à du vernis ISONEL 31 sauf au niveau de la pointe du fil métallique sur

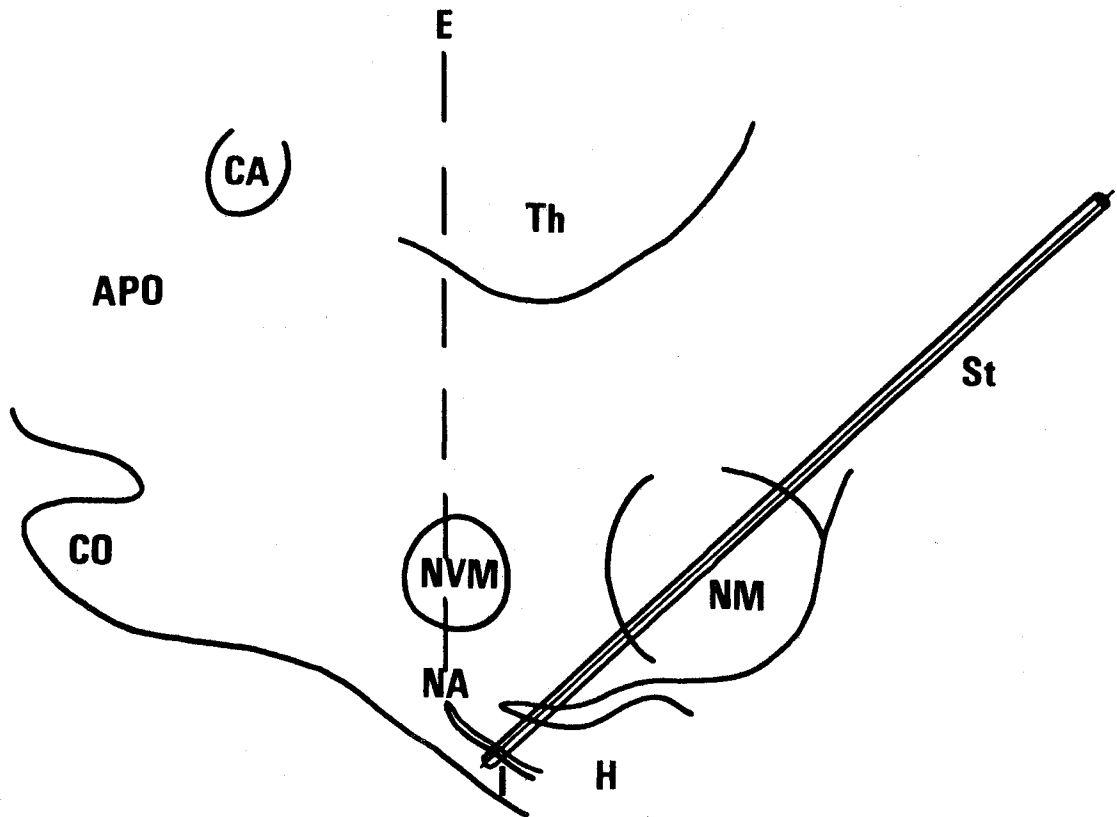


Figure 4 :

Schéma d'une coupe sagittale de l'hypothalamus de cobaye montrant la position des électrodes de stimulation (St) et d'enregistrement (E).

- CA : commissure blanche antérieure
- APO : aire pré-optique
- CO : chiasma optique
- Th : thalamus
- NM : noyau mamillaire
- NA : noyau arqué
- I : infundibulum
- NVM : noyau ventro-médian
- H : hypophyse

une longueur de 0,5 mm et sauf au niveau de la section du tube d'acier. Ces deux surfaces de l'électrode ainsi exposées constituent les deux pôles (anode et cathode) de la stimulation, (fig. 5 A).

3) Paramètres de stimulation

Des chocs de stimulations monophasiques sont appliqués à l'électrode à partir d'unités de stimulation isolées DEVICES type 2533, déclenchées par un générateur porte type 2521 qui est programmé à partir d'un DEVICES Digitimer type 3290. Ces chocs de stimulation, délivrés toutes les 750 msec., ont une durée variable de 0,1 à 1 msec. L'intensité de stimulation est mesurée à l'aide d'une unité de courant constant GRASS modèle CCU 1. Cette intensité est comprise entre 0,15 et 1,5 mA, (fig. 5 B).

C - LA MICROÉLECTROPHORESE

1) Définition

C'est une technique qui permet, grâce à un courant électrique, de contrôler l'éjection de substances chimiques à partir d'une microélectrode.

2) Principe

Les substances éjectées seront sous forme ionique et une différence de potentiel de direction convenable sera développée à l'intérieur de la solution.

- si la microélectrode est à un potentiel positif par rapport au milieu externe, un courant sortira de l'orifice et éjectera les cations de la microélectrode, (fig. 6 a)
- si au contraire, la microélectrode est à un potentiel négatif par rapport au milieu externe, ce sont les anions qui seront éjectés. (fig. 6 b)

3) Appareils utilisés

Dans chaque canal utilisé pour l'iontophorèse plonge une électrode de type non polarisable Ag-AgCl. Cette électrode est connectée par l'intermédiaire d'un câble flexible blindé à des circuits appliquant un potentiel approprié réglable : de 0 à 90 volts à l'aide de potentiomètres à travers des résistances de 100 M Ω . Ces circuits constituent ainsi des sources de courant constant, en dépit des fluctuations de la résistance

Figure 5 :

A - Schéma de l'électrode de stimulation concentrique bipolaire

B - Schéma du circuit de stimulation de l'éminence médiane

Osc : oscilloscope

Dig : digitimer

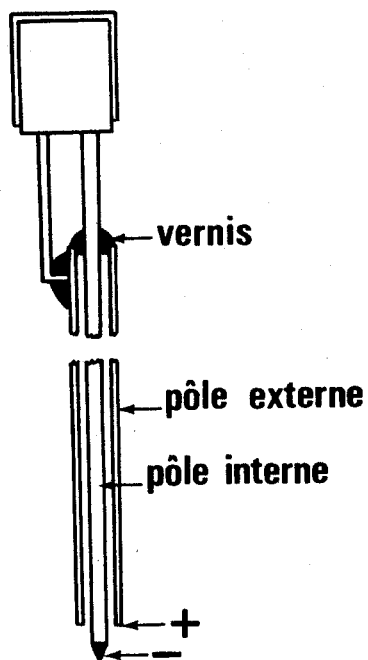
GP : générateur porte

US : unité de stimulation

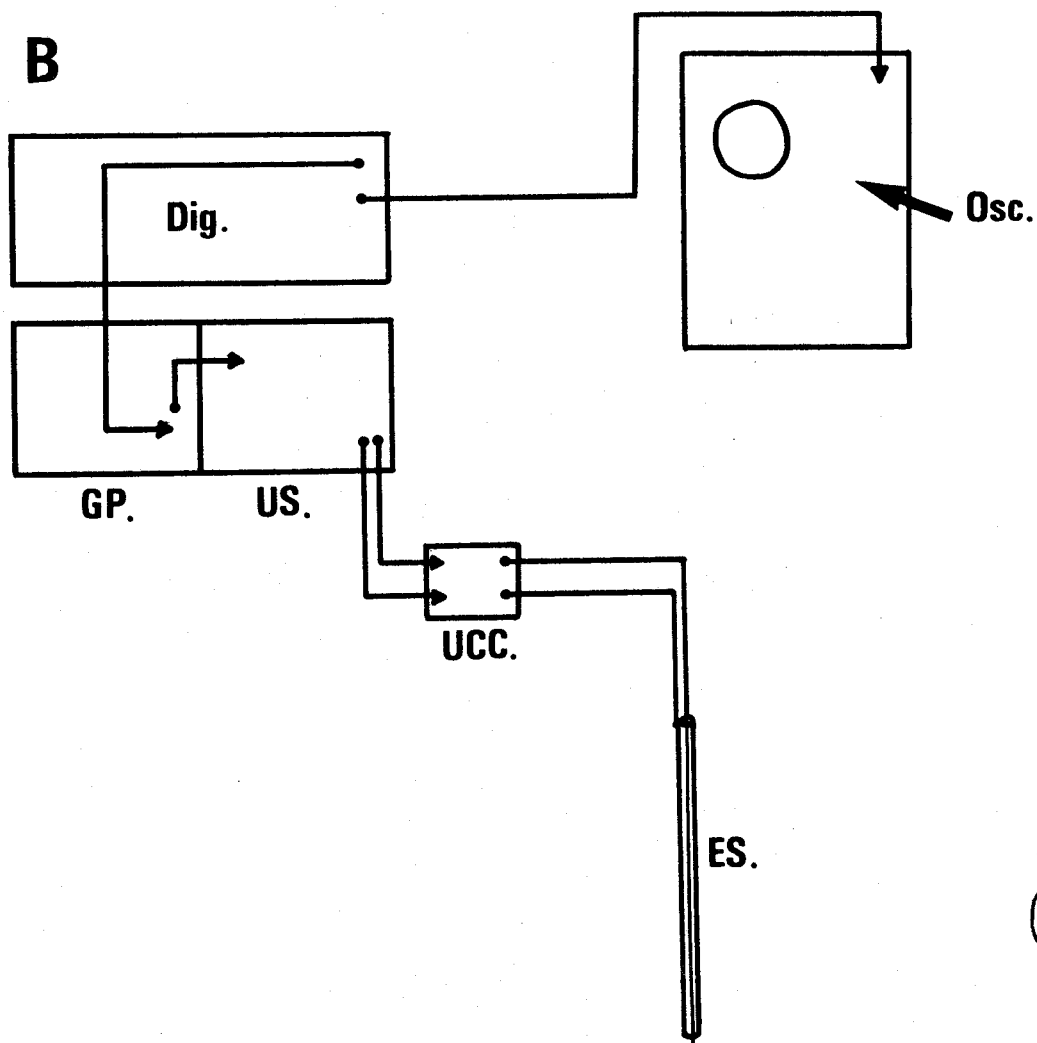
UCC : unité de courant constant

ES : électrode de stimulation

A



B



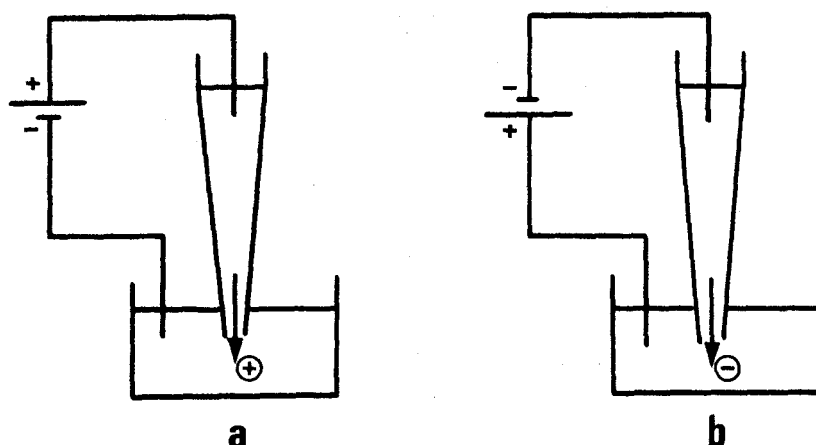


Fig. 6 : Schémas montrant le principe de l'éjection électrophorétique d'un ion.

du canal. Les courants de polarisation exprimés en nanoampères ($1 \text{ nA} = 10^{-9} \text{ A}$) peuvent être inversés et leur intensité contrôlée continuellement sur un galvanomètre avec une précision de $\pm 1 \text{ nA}$. Un dispositif est également prévu pour l'application constante d'un courant de rétention empêchant la diffusion de substances à partir de la pointe de la microélectrode (CASTILLIO J. DEL et KATZ B., 1955).

4) Fabrication des microélectrodes triples

Trois tubes Pyrex (diamètre : 3,5 - 2,5 mm) sont collés côte à côte et de façon décalée, à l'aide d'un mélange talc-silicate de soude. Ce mélange passé à la flamme d'un chalumeau durcit et assure une parfaite soudure des trois tubes. Ceux-ci ainsi assemblés, sont fusionnés à la flamme puis partiellement étirés à la main. Ils sont ensuite réétirés à l'aide d'un appareil à étirement vertical (microétireuse NARISHIGE) pour donner une partie conique relativement longue (entre 15 et 20 mm) se terminant par une pointe fine dont le diamètre est de l'ordre du micron.

Afin d'éviter une résistance électrique trop élevée des différents canaux d'une telle électrode, cette pointe, sous microscope, est doucement cognée à l'aide d'une baguette de verre jusqu'à ce que le diamètre de l'ensemble de la pointe atteigne de 3 à 8μ . En outre, les trois orifices sont ainsi au même niveau. Si un canal n'est pas fusionné avec les canaux voisins, il tend à se briser à un niveau différent. Dans ce cas, l'électrode est rejetée.

5) Préparation des substances

Lors de la préparation des solutions à tester, il est nécessaire de tenir compte du fait qu'il est préférable que l'agent actif dissout soit sous forme cationique ou anionique de façon prédominante. Aussi toutes les fois que cela sera possible, le pH de la solution sera ajusté de façon à produire une ionisation maximale de la «drogue» (CURTIS et WATKINS, 1960). C'est ainsi que la solution de glutamate monosodique (SIGMA) 1 M aura un pH compris entre 8 et 9 (ajustement du pH effectué à l'aide de quelques gouttes de NaOH 1N). Des courants + serviront à l'éjection du glutamate sous forme cationique.

6) Remplissage des microélectrodes multiples

- remplissage par ébullition

Les microélectrodes sont remplies d'eau distillée par ébullition à la pression atmosphérique pendant trente minutes ou par ébullition sous une pression réduite à 70°C pendant environ vingt minutes. Cette eau est ensuite aspirée au moyen d'un fin tube de polyéthylène attaché à une seringue et remplacée par les solutions appropriées dans les différents canaux. La diffusion de ces substances dans la portion conique du canal et dans la pointe se fait en douze à vingt quatre heures (temps dépendant de la forme de la portion terminale de l'électrode) et est parallèle à une diminution progressive de la résistance de chaque canal. Cette diffusion peut être accélérée en soumettant les microélectrodes ainsi remplies à une centrifugation de courte durée (5 à 10 minutes) à 1000-1500 tours/minute.

- remplissage par centrifugation

Cette méthode présente deux intérêts. Tout d'abord, elle est souhaitable pour des solutions qui doivent être utilisées avec un minimum de délai entre la préparation de la solution et l'expérimentation. En outre, elle permet de n'utiliser que de petites quantités de solution, de l'ordre du dixième de ml.

Pour une telle méthode, il est essentiel que toute particule importante soit ôtée des solutions par centrifugation et filtration préalables de ces solutions. Une goutte de la solution est placée dans la partie conique du canal de l'électrode au moyen d'un fin tube de polyéthylène. Cette électrode est ensuite soumise à une centrifugation de 2000 à 3000 tours/minute pendant 15 à 20 minutes.

Quelque soit le mode de remplissage, un canal de la microélectrode multiple contiendra du Fast Green dans NaCl 2 M ; un autre canal sera rempli avec la substance à tester.

Du chlorure de sodium 2 M remplira le canal restant où sera maintenu un potentiel égal, de polarité opposée à celle du potentiel mis en place pour l'éjection de la substance étudiée. Ainsi sera évitée une excitation ou une inhibition électrotonique non spécifique des neurones.

7) Stockage des microélectrodes

Les électrodes sont stockées dans l'obscurité à 4°C, en position verticale, les pointes étant immergées dans l'eau distillée. Sous ces conditions, le mélange des solutions des différents canaux apparaît être minimal.

8) Mesure de la résistance des microélectrodes

Cette mesure se fait pour chaque canal de la microélectrode multiple de la même façon que celle indiquée précédemment pour une électrode simple. Les électrodes utilisées ont des résistances dont la valeur varie entre 7 et 30 MΩ.

TECHNIQUES HISTOLOGIQUES DE MICROMARQUAGE

1) But

Étant donné l'imprécision apportée par les techniques stéréotaxiques, il est nécessaire de repérer les cellules de la structure nerveuse dont l'activité a été enregistrée. Il convient donc pour cela d'utiliser une technique de marquage des cellules.

L'enregistrement de l'activité unitaire se faisant à l'aide de microélectrodes de verre, la technique choisie a été celle des colorants, appliqués au moyen de la microélectrophorèse dont le principe a été exposé précédemment.

2) Mode opératoire

Chaque dépôt de colorant Fast Green est réalisé au niveau de certains des neurones étudiés, lors de la remontée de l'électrode, grâce au passage dans cette électrode d'un courant de 5 à 6 μ A pendant 5 à 10 minutes. (THOMAS et WILSON, 1965 - LE ROC'H - POULAIN, 1972). Lorsque l'expérimentation est terminée, l'animal

est sacrifié, le cerveau prélevé et fixé pour repérage histologique. Au cours du prélèvement du cerveau, ce dernier est sectionné soit à droite soit à gauche du plan médian afin que, lors de l'examen au microscope, la partie droite ou gauche de l'hypothalamus soit identifiable.

α) Fixation

La fixation se fait dans le formol 10 % pendant au moins 48 heures. La modification de volume au moment même de la fixation est généralement un léger gonflement. L'arrêt de la fixation se fait de la façon suivante : le formol étant soluble dans l'eau, un lavage à l'eau courante permet d'éliminer le fixateur.

β) Obtention des coupes

Les coupes sont obtenues par la technique de congélation à l'aide d'un microtome à glissières horizontales muni d'un porte-objet permettant de congeler la pièce. Nous avons utilisé un grand microtome à glissières LEITZ équipé, pour la réfrigération du prélèvement, d'un dispositif de type PELCOOL (MSE). Une vis micrométrique assure la remontée de la platine porte-objet avant chaque passage sous le rasoir, donnant ainsi des coupes d'une épaisseur de 100 microns. Le cerveau est fixé sur le plateau de façon telle que le plan frontal soit parallèle au plan de coupe. Ces coupes sont recueillies dans une solution contenant de la gélatine et de l'alcool à 80° (composition : 5 g de gélatine dans un litre d'eau distillée, un litre d'alcool à 80°). Les coupes sont ensuite placées sur des lames, collées grâce à cette solution, et séchées dans une étuve à 37°.

γ) Coloration

Les coupes sont colorées par la technique à la thionine pour coupes à la congélation. Cette technique montre les corps de NISSL et la chromatine des noyaux en bleu intense sur un fond pratiquement incolore. En outre, elle n'altère pas les dépôts de colorant effectués au préalable. (planche I)

δ) Étude quantitative de la préparation histologique

Des mesures de longueur au sein de la préparation sont effectuées dans le plan de la platine, grâce à un oculaire micrométrique de façon à déterminer la position des spots par rapport à la base du cerveau ou au bord du 3ème ventricule. Par ailleurs, la position de l'électrode de stimulation est confirmée sur les coupes histologiques par les traces laissées à travers le tissu nerveux.

Planche I

Fig. a : montrant la région médio-basale de l'hypothalamus du cobaye, avec les noyaux ventro-médians (V M) et le noyau arqué (N A) enserrant la portion ventrale du 3ème ventricule.

Les flèches indiquent la position d'un spot dans le noyau arqué.

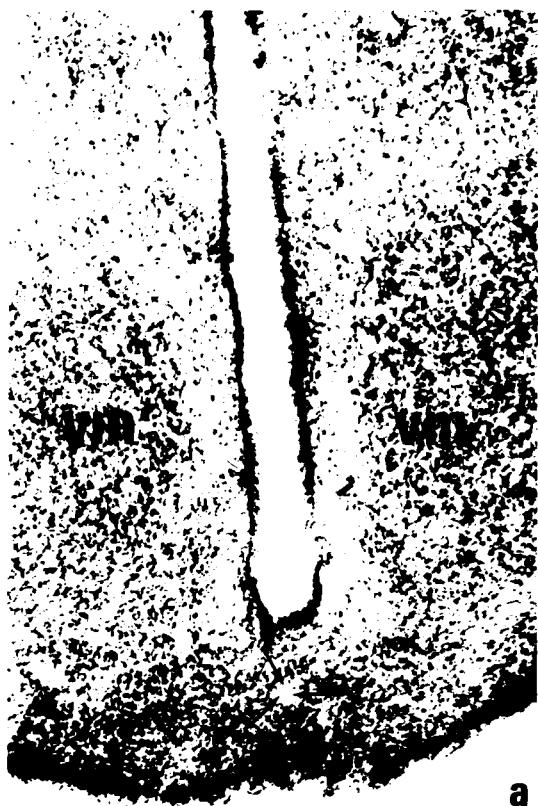
Coordonnée antéro-postérieure : 10,6

Fig. b et c :

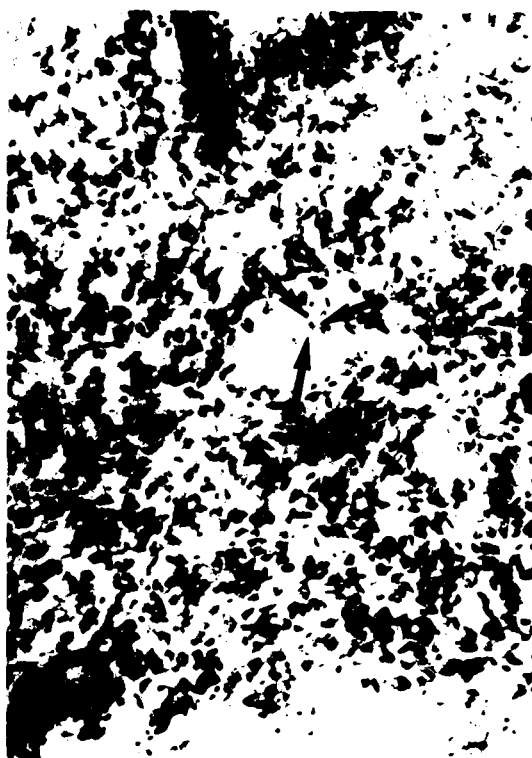
montrant le même spot à des grossissements plus élevés, situé près d'une cellule dont l'activité unitaire a été enregistrée.

Fig. d : autre spot dans le noyau arqué dont les limites sont indiquées par trois flèches.





a



b



c



100
X
M

MÉTHODES D'ANALYSE DE L'ACTIVITÉ UNITAIRE

SPONTANÉE

MOORE et coll. (1966), PERKEL et coll. (1967b) ont utilisé des techniques statistiques pour décrire les propriétés de trains d'impulsions et les ont appliquées aux problèmes neurophysiologiques.

L'information fournie par l'enregistrement de l'activité unitaire a d'abord été analysée sous forme de moyennes :

- fréquence moyenne des impulsions qui représente le nombre de potentiels d'action présents dans des intervalles de temps de durée constante.
- intervalle moyen entre les impulsions.

La mesure statistique que représente la fréquence moyenne des impulsions a été établie de la façon suivante : le nombre total des spikes N, présents dans une séquence d'enregistrement est compté ainsi que le temps T, en secondes, entre les première et dernière spikes de la séquence enregistrée (GRIFFITH 1966). La fréquence moyenne de décharge correspond au rapport :

$$\lambda = \frac{N - 1}{T}$$

Fréquence moyenne, intervalle moyen représentent une forme extrême de condensation des données expérimentales, fournissant un seul nombre caractérisant une décharge unitaire. Pour une analyse plus complète des résultats, des histogrammes ont été établis permettant ainsi de caractériser une activité unitaire spontanée par une distribution de fréquence au lieu d'un simple nombre.

Les histogrammes d'activité en fonction du temps montrent l'évolution du taux de décharge d'une cellule. Ils sont susceptibles de mettre en évidence des changements d'activité unitaire qui peuvent intervenir à la suite d'une modification de l'homéostasie endocrinienne.

Le taux moyen de décharge d'une unité est une mesure qui peut cacher une information précieuse telle que des changements dans la structure temporelle de l'activité électrique. Il est tout à fait possible que des modifications dans le «pattern» de décharge, sans changement dans la fréquence moyenne, puissent résulter de l'action d'une hormone circulante, d'un facteur physique ou signaler la libération d'un transmetteur neuro-hormonal. C'est ainsi qu'un neurone hypothalamique soumis à une pression statique par l'intermédiaire de la carotide ne présente pas d'augmentation de la fréquence de décharge.

Mais, quand l'analyse intervalle entre les impulsions est appliquée à la décharge de ce neurone, il est évident que cette stimulation a pour résultat un groupement de l'activité sous forme de «bursts», suggérant une influence excitatrice ; il y a augmentation du nombre de courts intervalles comparé à l'état de repos (SPYER, 1972).

Des histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions, qui constituent une mesure statistique importante de la structure temporelle d'un train d'impulsions ont donc été établis. Dans ces histogrammes, les abscisses représentent la durée de l'intervalle de temps entre les impulsions successives. Les ordonnées représentent le nombre d'intervalles dans le train d'impulsions dont la durée tombe entre x et $x + \Delta x$. Δx est appelé l'intervalle de classe de l'analyse. Le choix de la valeur de cette intervalle de classe est important. En effet, si nous choisissons un grand intervalle de classe, tout le profil de l'histogramme est relativement plat, mais le détail structural peut être perdu. Par contre, si la durée de l'intervalle est faible, le détail est préservé mais les valeurs des ordonnées montrent de plus grandes fluctuations. L'intervalle de classe sera choisi en fonction de la fréquence moyenne de la cellule étudiée de façon à fournir une image complète de la distribution des intervalles de temps entre les impulsions.

Outre l'intervalle moyen entre les impulsions, la déviation standard et le coefficient de variation ont été calculés. Le coefficient de variation CV correspond au rapport de la déviation standard sur l'intervalle moyen.

$$CV = \frac{\text{déviation standard}}{\text{intervalle moyen}}$$

Cette dernière statistique peut être utilisée pour classer les histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions. Selon la convention proposée par OOMURA et coll. (1969), la distribution exponentielle est caractérisée par CV compris entre 0,8 et 1,5 et la distribution gamma 2 par CV entre 0,6 et 0,8.

A - PROBLEMES POSÉS PAR LA TECHNIQUE D'ENREGISTREMENT

1) Variations de potentiel observées au cours de la descente de la microélectrode

Quand l'électrode d'enregistrement a pénétré à travers le cerveau, des variations de potentiel négatif jusque 90 mV sont rencontrées (SEGUNDO et coll., 1967). Elles apparaissent de façon soudaine ou lente ou très lente, de durée variable et prennent fin éventuellement par un retour du spot de l'oscilloscope au niveau initial ou presque. Ces variations de potentiel observées peuvent, semble-t-il, posséder trois origines :

- elles ne sont pas associées à des potentiels d'action et correspondent sans doute à des potentiels de repos de cellules gliales, d'ailleurs plus importants que ceux des neurones. Les membranes de ces éléments névrogliques ne sont pas excitables électriquement, leur résistance étant presque indépendante du potentiel de membrane.

- Les changements de potentiel observés ne sont pas en relation avec une activité nerveuse typique. Ils auraient pour origine un ensemble de neurones non réactifs, tout au moins au moment de leur approche par la microélectrode.

- Les variations de potentiel sont associées à des potentiels d'action. Elles sont donc interprétées comme neuroniques. Ce sont ces éléments-là que nous étudions.

2) Stabilité de l'activité unitaire obtenue avec la technique employée.

L'activité unitaire spontanée des cellules du noyau arqué peut être enregistrée durant une période plus ou moins longue.

. 1er cas : enregistrement de très courte durée (histogramme A
.....
Fig. 7).

Il s'agit là sans doute de cellules du noyau arqué inactives spontanément. La pointe de la microélectrode d'enregistrement peut déclencher d'une manière mécanique la stimulation du neurone, en exerçant une pression plus ou moins forte au niveau de la surface membranaire. Cela se traduit par une activité de très courte durée (entre 10 et 20 secondes), par une augmentation soudaine de la fréquence (20 à 30 impulsions par seconde), suivie d'un développement de l'amplitude de potentiels d'action puis d'un déclin progressif et de la disparition des spikes en quelques secondes. La cellule est donc rapidement lésée, empalée, ce qui nous est indiqué par une fluctuation de potentiel DC qui doit correspondre au potentiel de repos de la cellule.

Figure 7 :

Histogrammes d'activité en fonction du temps de
trois cellules du noyau arqué.

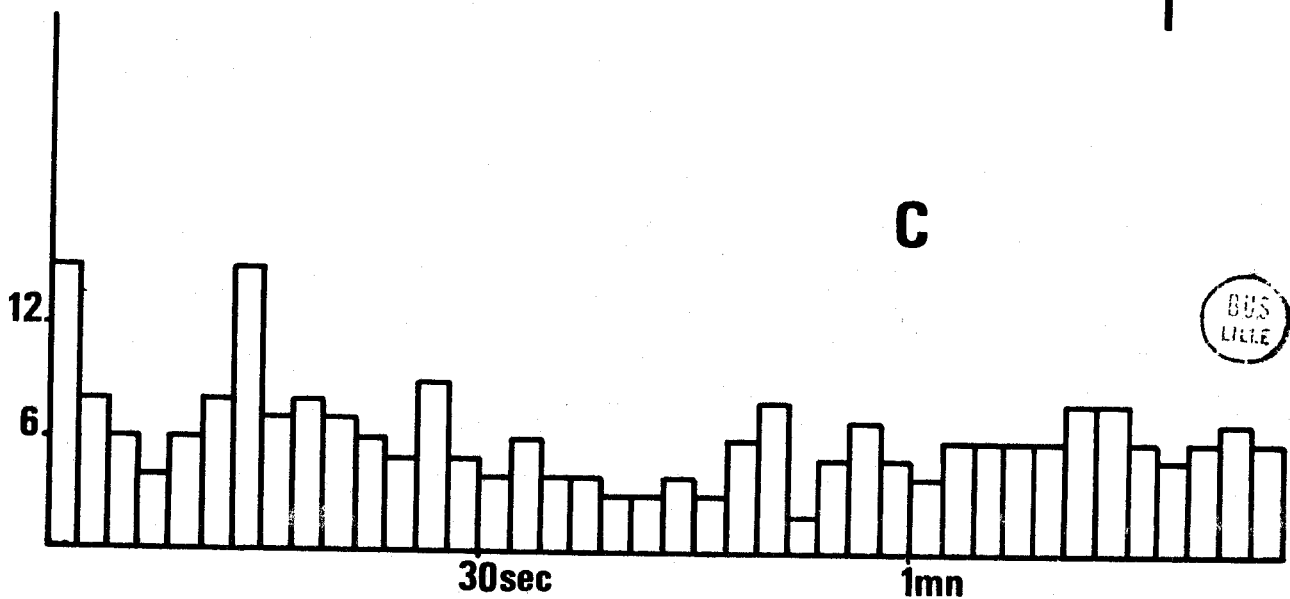
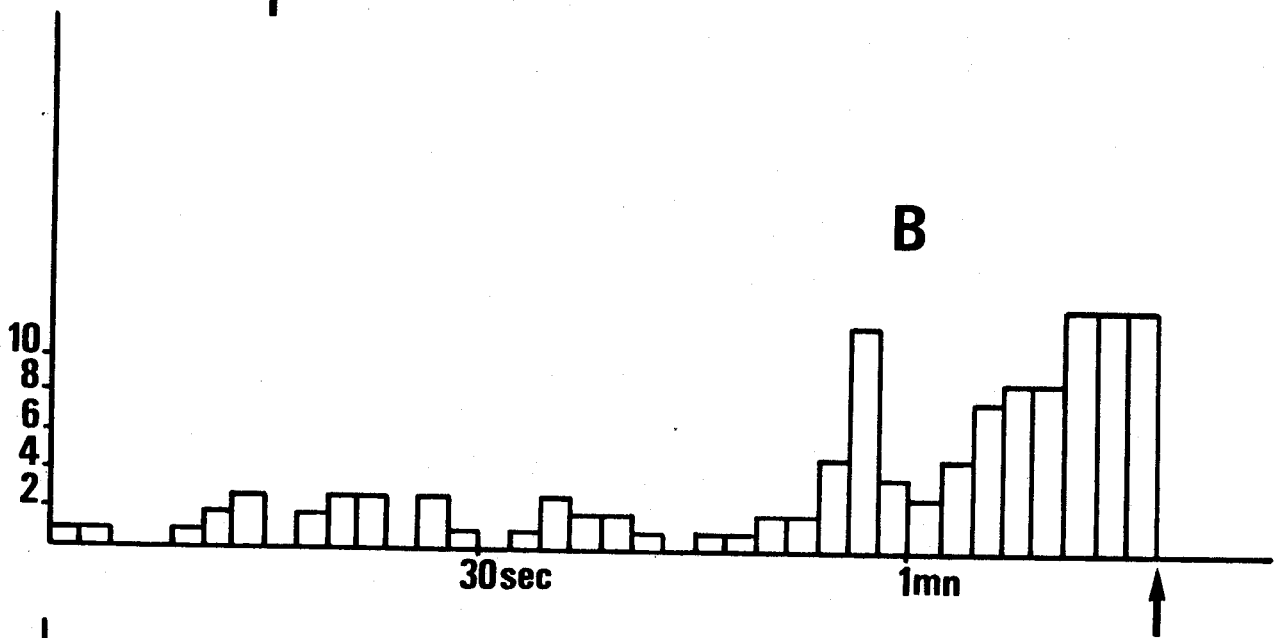
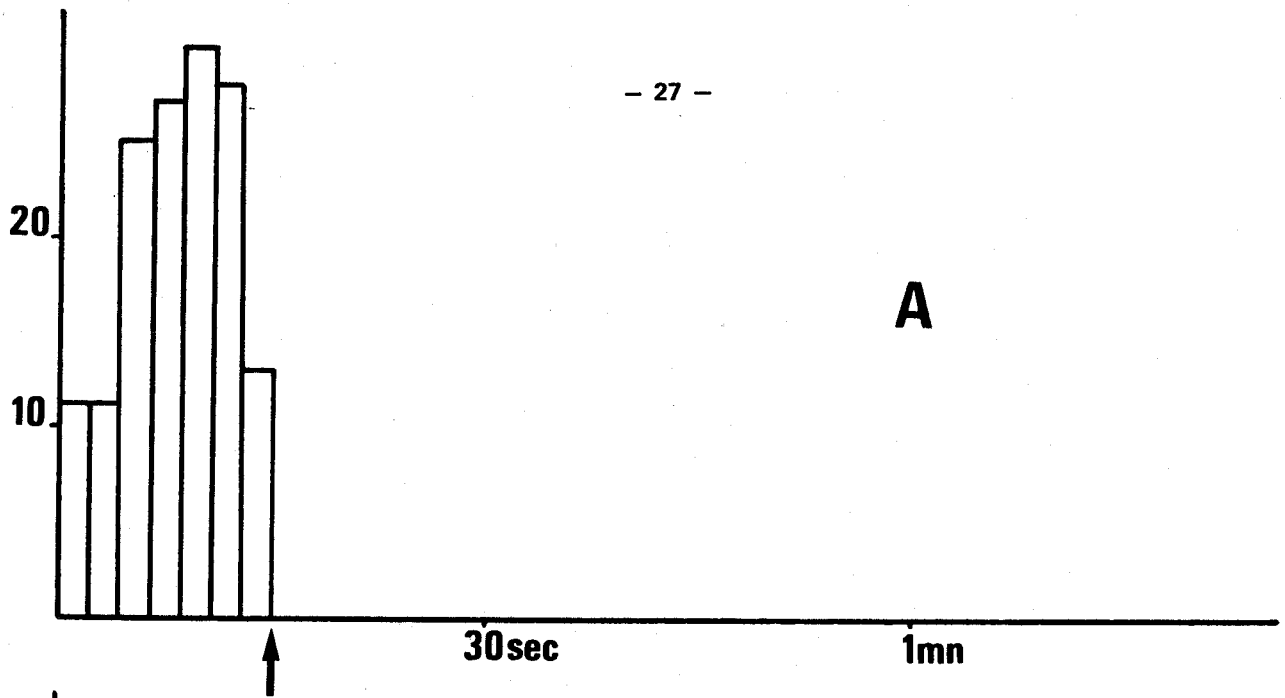
A : Durée de l'enregistrement : 15 secondes

B : Durée de l'enregistrement : 1 mn 17.

Les flèches indiquent l'arrêt de l'activité.

Axe des ordonnées : le nombre de spikes par unité de temps.

Axe des abscisses : le temps.



BUS
LILLE

. 2ème cas : Histogramme B, Fig. 7
.....

Les cellules sont actives spontanément ; cependant elles sont lésées par la suite, par la pointe de l'électrode de la même façon que précédemment. Variations de potentiel, fréquence plus élevée et assez régulière constituent les indices de cette lésion.

. 3ème cas : Histogramme C, Fig. 7
.....

L'enregistrement de l'activité unitaire spontanée des cellules ne comporte pas les indices d'une lésion, ce qui nous permet de supposer que la pointe de l'électrode n'a pas atteint la membrane nerveuse et que l'activité observée est celle d'une cellule placée dans des conditions normales.

Il est possible d'expliquer ces différentes stabilités d'enregistrement de la façon suivante : les cellules du noyau arqué sont des neurones du système parvo-cellulaire de l'hypothalamus dont le corps cellulaire est de faible taille (environ 15 μ). Or, les potentiels d'action extracellulaires sont enregistrés à partir d'une certaine distance du corps cellulaire qui dépend de façon importante, de la taille du soma et du champ dendritique. Il est donc nécessaire, pour obtenir des potentiels d'action d'amplitude convenable des cellules du noyau arqué, de s'approcher très près du corps cellulaire à l'aide de l'électrode d'enregistrement. D'où risque de lésion d'autant plus important qu'à cela, s'ajoute le fait que les pulsations du cerveau dues à la respiration de l'animal ont une amplitude qui demeure trop importante, ceci en dépit de la mise en place de gélose sur la surface exposée du cerveau. Étant donné la faible distance qui sépare la pointe de l'électrode de la surface du neurone, il arrive qu'à la longue, à la suite de ces pulsations, la pointe atteigne la surface membranaire, lésant, endommageant ainsi la cellule et ne permettant pas un enregistrement convenable de l'activité unitaire.

3) Forme et polarité des potentiels d'action

La plupart des impulsions enregistrées ont une polarité initiale positive (fig. 8). Parfois, il est possible d'observer des potentiels d'action présentant une polarité initiale négative. Lorsque la microélectrode est très près de la membrane du neurone, l'onde initiale positive augmente plus rapidement d'amplitude et peut devenir la partie la plus prononcée de l'enregistrement.

Des différences dans la configuration des potentiels d'action peuvent donc être observées. Elles ont principalement pour origine des variations de pression que l'on applique à la surface du neurone avec l'électrode d'enregistrement, c'est-à-dire les variations de distance pointe de microélectrode - surface membranaire (ROSENTHAL, 1971).

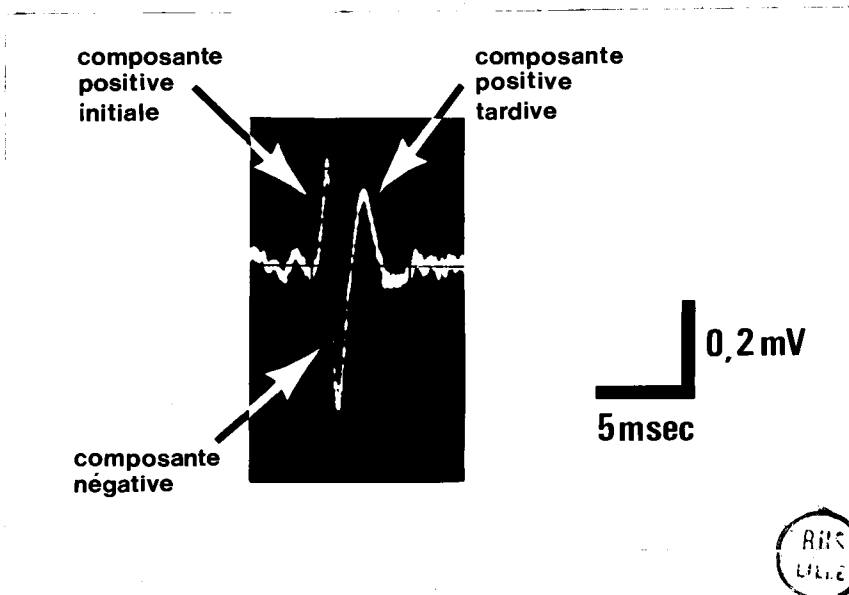


Fig. 8 : Forme la plus courante des potentiels d'action hypothalamiques.

4) Relation entre la profondeur de l'électrode et l'amplitude des potentiels d'action

Lorsqu'une microélectrode d'enregistrement est retirée du voisinage immédiat du soma d'une cellule active, l'amplitude des impulsions observées diminue rapidement avec l'augmentation de la distance. Au-delà d'une certaine distance, aucun signal n'est détecté.

Lorsqu'une microélectrode est approchée du corps cellulaire d'un neurone actif, deux possibilités sont à envisager :

- . 1er cas : la microélectrode a une position telle qu'elle
.....
n'atteint pas le corps cellulaire du neurone lors de son déplacement.

L'électrode est néanmoins affectée par les variations du champ électrique produit par cette cellule. Au fur et à mesure que l'électrode est déplacée, les potentiels d'action enregistrés deviennent plus importants jusqu'à atteindre une amplitude maximum. Une poursuite de la pénétration de la microélectrode a pour résultat une diminution progressive de l'amplitude des impulsions. Puis il y a arrêt total de l'activité unitaire sans qu'il y ait observation de variations de potentiel DC.

La microélectrode parcourt une distance importante entre le moment où elle est atteinte par le champ électrique de la cellule et le moment où elle quitte celui-ci. Cette distance peut être de l'ordre de 90 microns (DAFNY et GILMAN, 1973).

- . 2ème cas : la microélectrode passe à travers le corps cellulaire du neurone au cours de la descente.

L'électrode étant approchée de la surface membranaire, l'amplitude des potentiels d'action observés augmente jusqu'à un maximum qui correspond au moment où la pointe de l'électrode est introduite dans le soma. Cet instant peut être visualisé par une soudaine variation de potentiel DC représentant le potentiel de repos de la cellule.

Le tableau ci-dessous illustre les variations de l'amplitude des impulsions en fonction de la profondeur de l'électrode ; dans chaque exemple, l'amplitude des potentiels d'action apparaît constante tout au long de l'enregistrement, pour l'une ou l'autre position de l'électrode.

Tableau 1

Position de l'électrode	Amplitudes des potentiels d'action	% d'augmentation
la plus éloignée de la cellule rapprochement de 25 μ	450 μ V 600 μ V	33 %
la plus éloignée de la cellule rapprochement de 27 μ	100 μ V 150 μ V	50 %
la plus éloignée de la cellule rapprochement de 38 μ	225 μ V 390 μ V	73 %

5) Relation entre la profondeur de l'électrode et la fréquence des potentiels d'action

- . 1er cas : la microélectrode a une position telle qu'elle n'atteint pas le corps cellulaire du neurone lors de son déplacement

Au cours du mouvement de l'électrode, de l'ordre de plusieurs dizaines de microns, il n'y a pas de changement notable dans la fréquence des potentiels d'action. Seule l'amplitude des impulsions varie.

- . 2ème cas : la pointe de l'électrode pénètre dans le soma du neurone.

Si le déplacement de la microélectrode est peu important, quelques microns dans un sens

ou dans l'autre, aucune variation dans la fréquence des potentiels d'action n'est observée. Si le déplacement est plus important, (de 25 à 50 microns), la fréquence des impulsions subit des variations dues sans doute à la pression exercée par la microélectrode sur la surface membranaire du neurone. Parfois, l'activité unitaire spontanée stable d'une même cellule, après un déplacement relativement important de l'électrode par rapport à la membrane nerveuse, a pu être enregistrée (fig. 9 et 10). Le tableau 2 donne les valeurs des fréquences moyennes de cellules du noyau arqué en fonction des différentes positions de l'électrode, et montre que cette fréquence augmente de façon notable lorsque la microélectrode d'enregistrement est plus proche de la surface du neurone.

Tableau 2

Position de l'électrode.	Nombre d'impulsions dans l'échantillon	Durée totale de l'échantillon	Fréquence moyenne λ
la plus éloignée de la cellule rapprochement de 25 μ	135	483 sec.	0,28/sec.
	172	126 sec.	1,39/sec.
la plus éloignée de la cellule rapprochement de 38 μ	29	370 sec.	0,08/sec.
	135	139 sec.	0,96/sec.

6) Relation entre la profondeur de l'électrode et la distribution des intervalles de temps entre les impulsions

N'est envisagé ici que le cas où la pointe de l'électrode pénètre dans le soma du neurone lors du déplacement de celle-ci.

Les cellules du noyau arqué prises en considération dans les paragraphes précédents servent à nouveau d'exemples.

Figure 9 :

Histogrammes d'activité en fonction du temps.

**A : Histogramme pour une position éloignée de l'électrode
par rapport à la cellule. (Fréquence moyenne : 0,28/sec.)**

**B : Histogramme pour une position plus rapprochée de
l'électrode (25 microns) par rapport à la même
cellule. (Fréquence moyenne : 1,39/sec.)**

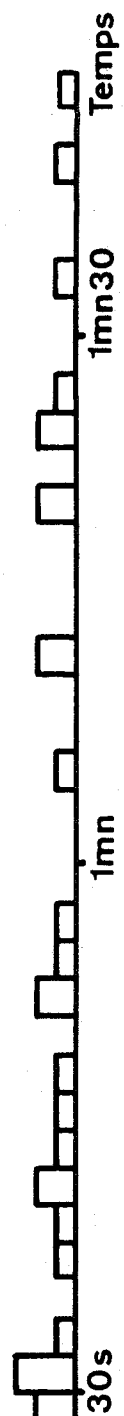
Axe des ordonnées : le nombre de spikes par unité de temps

Axe des abscisses : le temps.

Sp/sec

8
6
4
2

A



Sp/sec

8
6
4
2

B

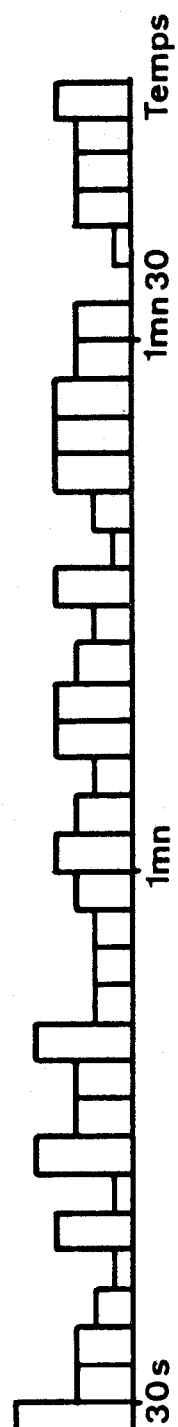


Figure 10 :

Histogrammes d'activité en fonction du temps.

**A : Histogramme pour une position éloignée de l'électrode
par rapport à la cellule. (Fréquence moyenne : 0,08/sec.)**

**B : Histogramme pour une position plus rapprochée de
l'électrode (38 microns) par rapport à la même
cellule. (Fréquence moyenne : 0,96/sec.)**

Axe des ordonnées : le nombre de spikes par unité de temps,

Axe des abscisses : le temps.

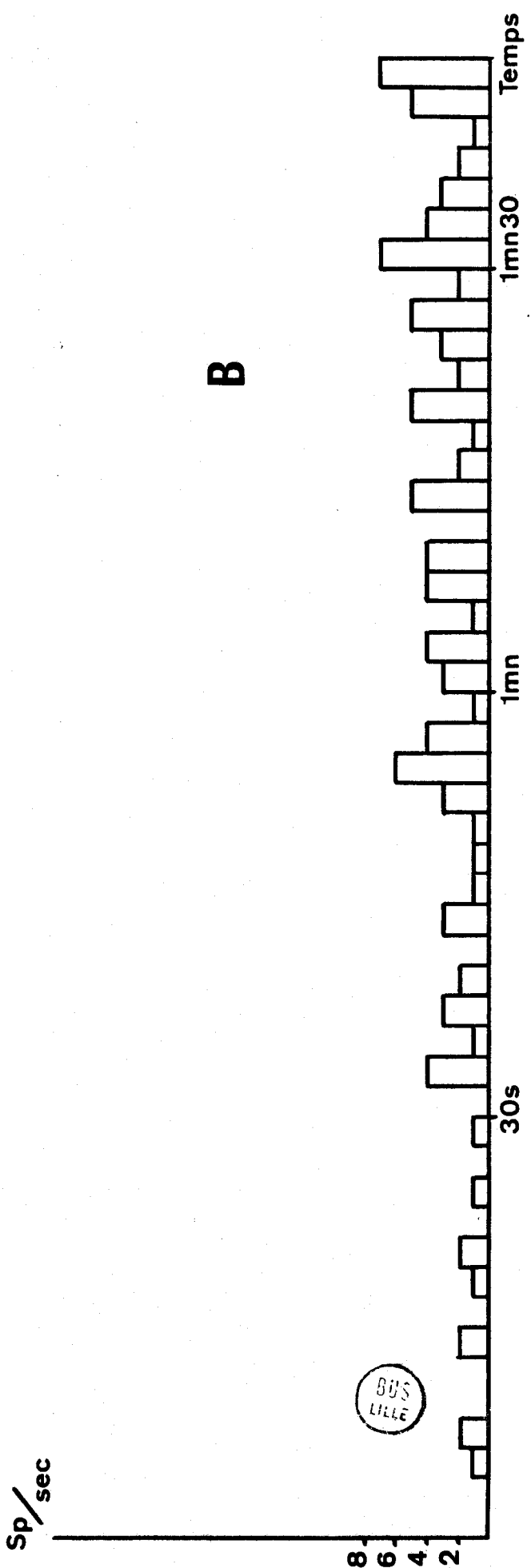
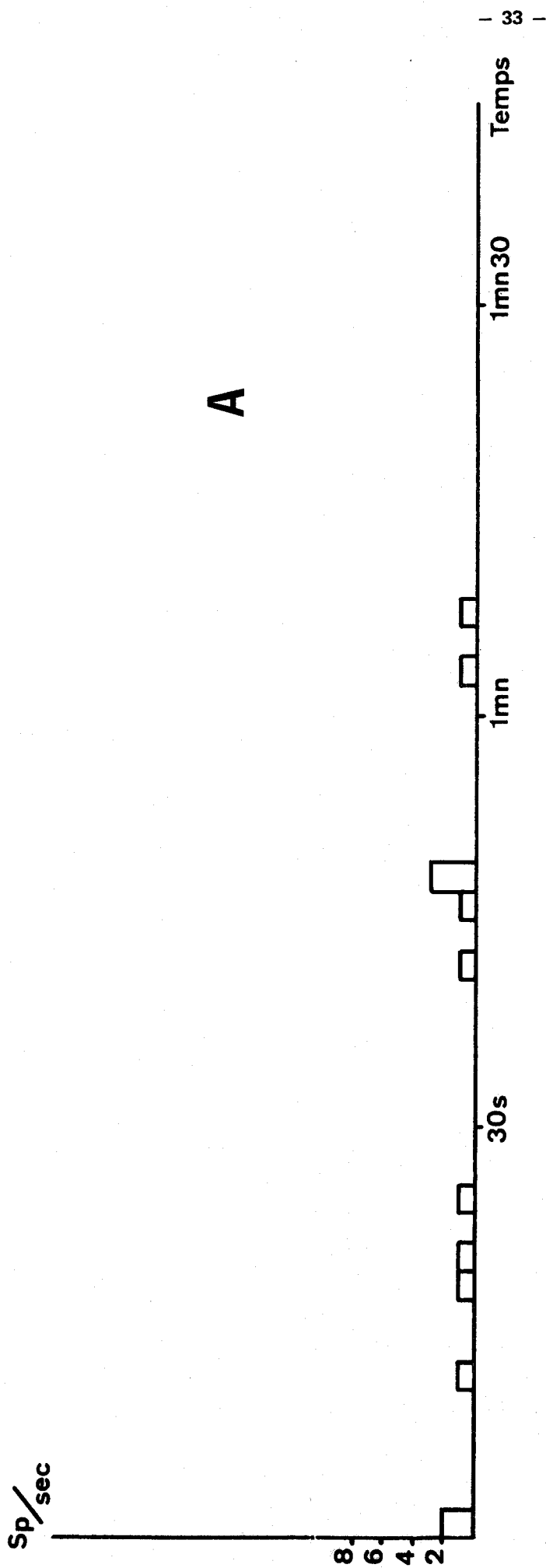


Tableau 3 : indiquant les variations de l'intervalle moyen en fonction de la position de l'électrode.

Position de l'électrode	Nombre d'intervalles dans l'échantillon	Durée totale de l'échantillon	Intervalle moyen
la plus éloignée de la cellule	66	300 sec.	4,4 sec.
rapprochement de 25 μ	80	60 sec.	0,724 sec.
la plus éloignée de la cellule	23	300 sec.	12,1 sec.
rapprochement de 38 μ	30	60 sec.	1,75 sec.

1er exemple : (fig. 11) dans le cas de la position de l'électrode la plus éloignée, l'histogramme de répartition des intervalles de temps entre les impulsions est le reflet d'un pattern de décharge irrégulier : il n'y a pas prédominance nette de certaines valeurs d'intervalles (hist. A). Le même type d'histogramme correspondant à un déplacement de 25 μ de l'électrode a été établi avec un intervalle de classe de 200 msec. Il met en évidence un regroupement des valeurs d'intervalles comprises entre 200 et 400 msec. (Histogramme B).

2ème exemple : (fig. 12) l'histogramme A fait apparaître des valeurs d'intervalles de temps entre les impulsions très dispersées sans prédominance de l'une d'entre elles. Si l'histogramme, établi pour un rapprochement de l'électrode de 38 μ a le même intervalle de classe que celui de l'histogramme pour la position initiale de la microélectrode, les deux distributions de fréquence des intervalles de temps entre les impulsions apparaissent bien différentes. L'histogramme B montre un regroupement des valeurs des intervalles, leur fréquence relative étant différente. Par contre, si l'histogramme est établi avec un intervalle de classe 10 fois inférieur (histogramme C) il présente les mêmes caractéristiques que celles de l'histogramme A : aucune valeur d'intervalles n'apparaît prédominante, les valeurs des fréquences relatives des intervalles sont similaires.

Une conclusion nette apparaît ici difficile à formuler. Il semble que la structure temporelle de décharge des neurones soit moins dépendante de la profondeur de l'électrode qu'une mesure comme le taux de décharge moyen. Ces résultats sont à

Figure 11 :

Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions.

A : Histogramme pour une position éloignée de l'électrode par rapport à la cellule. Intervalle de classe : 500 msec.
Fréquence moyenne : 0,28/sec.

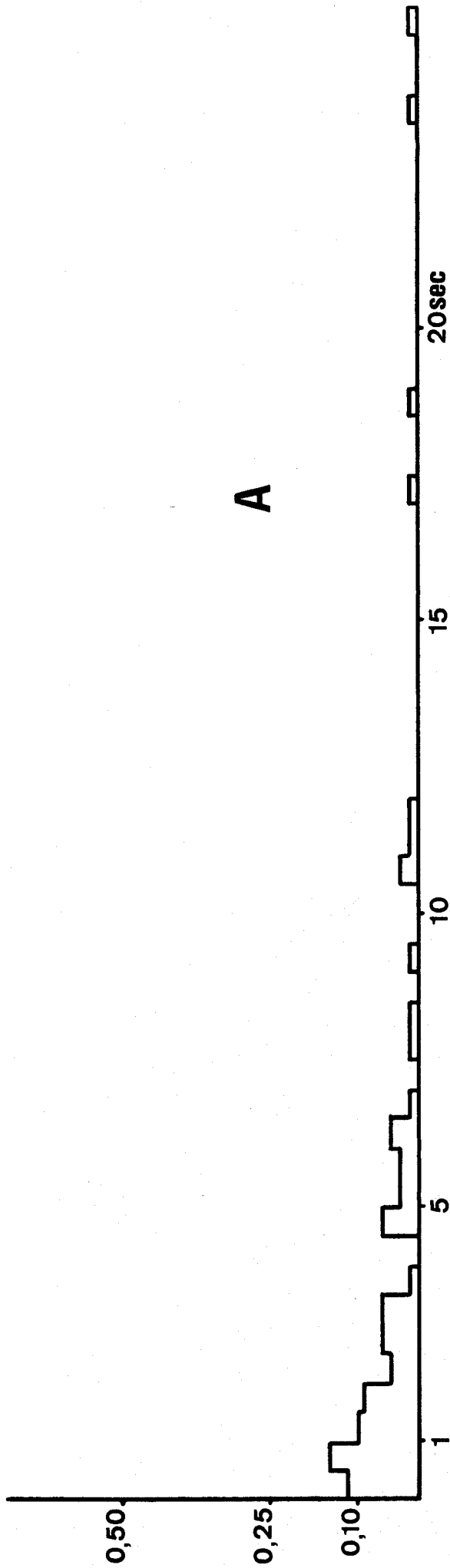
B : Histogramme pour une position plus rapprochée de l'électrode (25 microns) par rapport à la même cellule. Intervalle de classe : 200 msec.
Fréquence moyenne : 1,39/sec.

Axe des ordonnées : fréquences relatives des différents intervalles.

Axe des abscisses : durée des intervalles.

Dans chaque histogramme, les intervalles au-delà de la 50ème classe, c'est-à-dire supérieurs à 25 secondes ou à 10 secondes selon l'intervalle choisi, sont combinés en une seule classe.

A



B

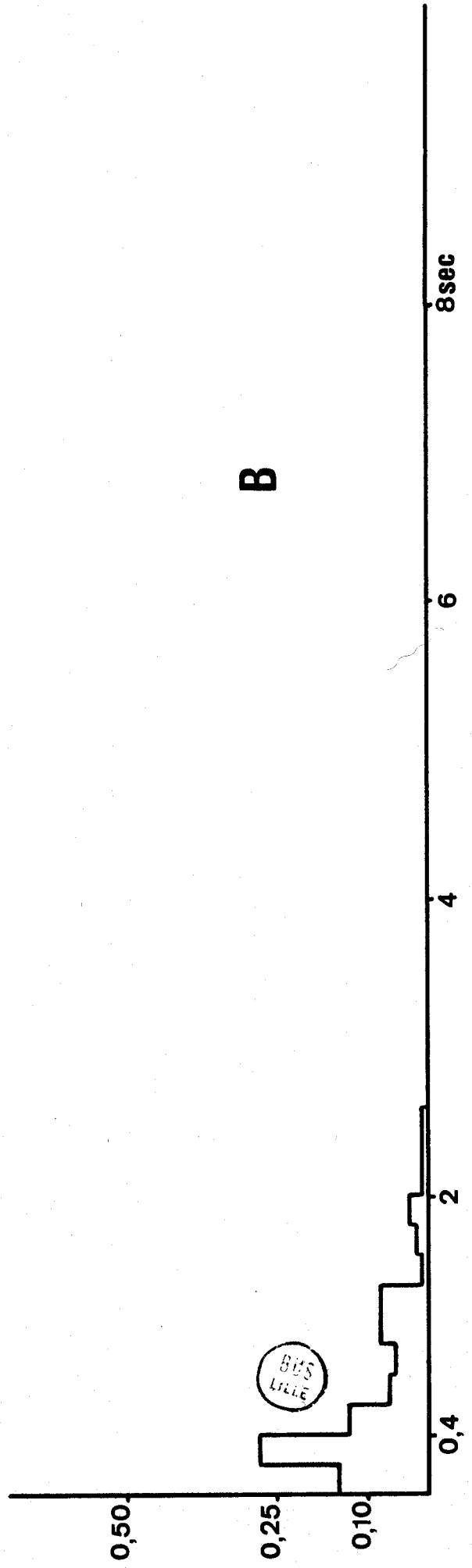


Figure 12 :

Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions.

A : Histogramme pour une position éloignée de l'électrode par rapport à la cellule. Intervalle de classe : 500 msec.
Fréquence moyenne : 0,08/sec.

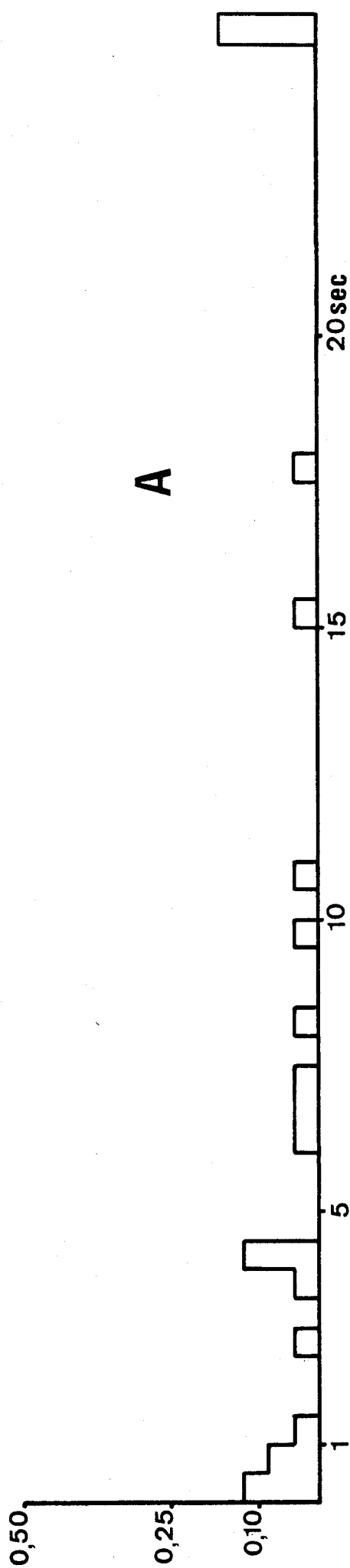
B : Histogramme pour une position plus rapprochée de l'électrode (38 microns) par rapport à la même cellule.
Intervalle de classe : 500 msec.
Fréquence moyenne : 0,96/sec.

C : Seule différence avec B : l'intervalle de classe choisi est égal à 50 msec.

Axe des ordonnées : fréquences relatives des différents intervalles

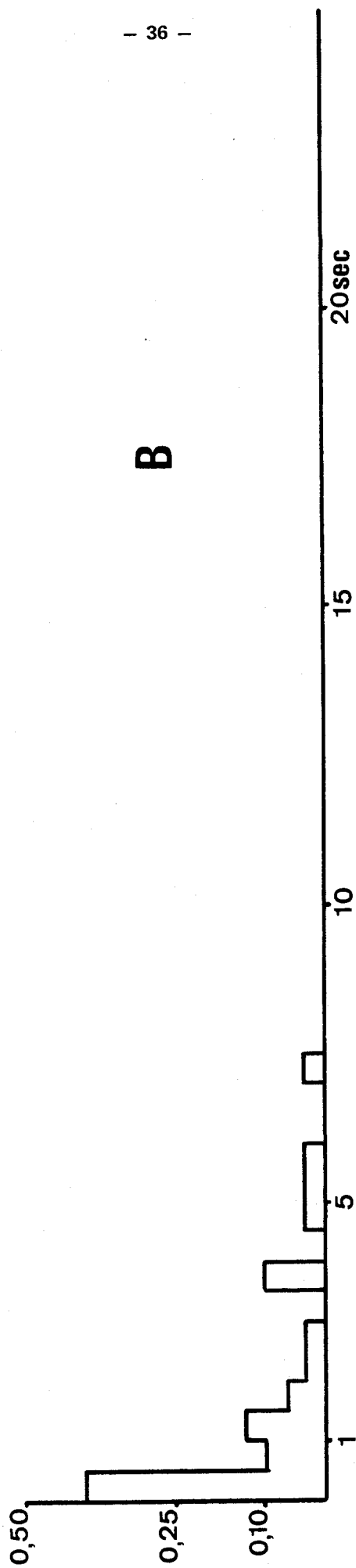
Axe des abscisses : la durée des intervalles.

A

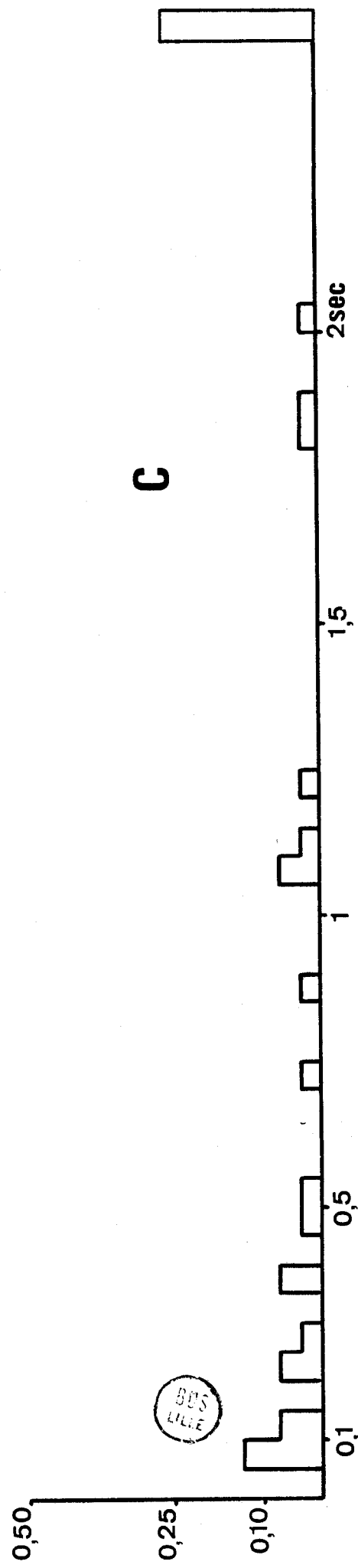


- 36 -

B



C



rapprocher de ceux de ALEKSANYAN et coll. (1972). Ces auteurs ont soumis des neurones du noyau ventro-médian de l'hypothalamus de rat mâle à l'effet de courants polarisants et ont ainsi, le plus souvent, augmenté la fréquence de décharge de ces cellules. Ils ont montré que les histogrammes d'intervalles de temps entre les impulsions établis à partir d'un même neurone soumis à d'importantes variations de leur taux de décharge ont presque la même forme. Dans le cas présent, ces mêmes variations sont occasionnées par une stimulation mécanique provoquée par la pointe de microélectrode. Elles peuvent être importantes, 5 à 10 fois supérieures à la valeur initiale. En dépit de cela, les histogrammes d'intervalles de temps entre les potentiels d'action présentent un aspect assez similaire.

B - CRITERES D'ENREGISTREMENT

1) Critères pour l'enregistrement d'une activité unitaire isolée

Il est important pour l'étude d'une activité unitaire spontanée, de déterminer si l'activité enregistrée correspond à celle d'un seul neurone et non de plusieurs éléments. Or, il a été établi par de nombreux auteurs (BISHOP, 1962 ; ROSENTHAL, 1971) qu'une électrode ne doit pas avoir un diamètre à la pointe supérieure à un micron pour enregistrer l'activité de cellules isolées. Les microélectrodes utilisées dans cette étude, remplissent cette condition puisqu'elles ont un diamètre à la pointe d'environ 0,5 micron et une résistance située entre 3 et 30 Mégohms. Cependant DAFNY et GILMAN (1973) ont montré que des électrodes d'un diamètre de 60 microns sont capables d'enregistrer l'activité de neurones individuels en se basant sur les critères suivants :

- l'amplitude constante des potentiels d'action.

La stabilité de l'amplitude des impulsions enregistrées a été souvent utilisée comme critère indiquant qu'une activité unitaire isolée a été captée (ADAMS, 1968). Il peut en effet, être supposé que si l'enregistrement observé représente l'activité de multiples éléments, un ou plusieurs de ces éléments ne déchargeront pas de façon synchrone avec les autres et en conséquence, l'instabilité et la variation d'amplitude des potentiels d'action seront observées.

- Une relation définie entre l'amplitude des impulsions et la profondeur de l'électrode (STRUMWASSER, 1958).

Cette relation dépend de la supposition que l'amplitude des potentiels d'action augmentera lorsque la microélectrode est rapprochée de la cellule et diminuera lorsqu'elle est éloignée. La probabilité est faible qu'une électrode maintienne la même relation de distance entre plusieurs cellules lorsqu'on la déplace. Si des impulsions enregistrées représentent la décharge d'unités multiples, la descente progressive de l'électrode aurait pour résultat l'apparition de potentiels d'action multiples de différentes amplitudes. Au contraire, si seulement la décharge d'un élément nerveux isolé est enregistrée, il y aura une relation nette entre l'amplitude des impulsions et la position de la microélectrode. Cette relation a été démontrée dans un paragraphe précédent.

2) Précautions prises

Ne seront pris en considération que les enregistrements où les potentiels d'action présentent une phase négative nette et sont dépourvus de signes de lésion. Les cellules manifestement affectées par une lésion (fréquence élevée et régulière) seront éliminées.

Comme nous l'avons vu auparavant, les fluctuations dans les valeurs de fréquences moyennes de potentiels d'action peuvent être dues à un artéfact tel que la stimulation mécanique du neurone par la pointe de l'électrode d'enregistrement. Il sera tenu compte de ce facteur en mesurant l'amplitude des impulsions à différents intervalles pendant la période d'enregistrement de l'activité puisque des variations d'amplitude des potentiels d'action accompagnent les mouvements de l'électrode. Afin que, par ailleurs, les résultats soient le moins possible influencés par l'irritation du neurone provoquée par la microélectrode, il sera procédé ainsi. Lorsque l'activité d'une cellule sera captée, l'électrode d'enregistrement sera parfois avancée ou reculée de quelques microns afin d'observer que ce processus n'altère pas notablement le taux de décharge de la cellule. En outre, l'activité unitaire spontanée ne sera enregistrée que pour une position, la plus éloignée possible, de la microélectrode par rapport à la membrane nerveuse. Il suffira seulement que la microélectrode d'enregistrement ait une position telle que les signaux biologiques soient facilement détectables par rapport au bruit de fond. Une fois ceci obtenu, il n'est pas souhaitable d'essayer d'enregistrer des potentiels d'action de plus grande amplitude en rapprochant l'électrode de la cellule, d'autant plus que pour une évaluation des réactions des neurones hypothalamiques, l'amplitude et la forme des potentiels d'action sont naturellement moins importantes que leur fréquence.

C - CARACTÉRISTIQUES DE L'ACTIVITÉ UNITAIRE SPONTANÉE DES NEURONES DU NOYAU ARQUÉ

1) Processus stationnaires

Avant que n'importe quel traitement statistique puisse être appliqué, il est nécessaire d'identifier les séquences stationnaires d'un enregistrement d'activité unitaire spontanée. Il y a processus stationnaire quand les propriétés statistiques sont invariables avec le temps (BISHOP et coll. 1964). L'une des caractéristiques du processus stationnaire est que le taux moyen de décharge soit constant. Les enregistrements d'activité unitaire pourront donc être utilisés pour définir l'intervalle de temps au cours duquel un train d'impulsions donné est potentiellement stationnaire et pour détecter éventuellement les portions d'enregistrement manifestement non stationnaires.

Un autre test pratiqué démontrant l'état stationnaire d'une activité unitaire est le développement uniforme de l'histogramme de répartition des intervalles de temps entre les impulsions au cours du temps. Ce point est bien montré en superposant les histogrammes obtenus à différents temps d'enregistrement.

Les deux premiers exemples donnés concernent l'analyse des portions adjacentes et de même durée (une minute) d'un enregistrement d'activité unitaire de cellules du noyau arqué.

Tableau 4	Fréquences moyennes établies sur la		
	1ère minute d'enreg.	2ème minute d'enreg.	3ème minute d'enreg.
Premier exemple	3,88/sec.	3,36/sec.	4,4/sec.
Deuxième exemple	2,88/sec.	2,5/sec.	

Dans le cas de ces deux cellules, la fréquence moyenne de décharge est relativement constante, les fluctuations maximales n'atteignant qu'un taux de 15 %.(tabl. 4) Quant aux histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions, ils montrent un développement uniforme en fonction du temps (fig. 13 et 14).

Figure 13 :

Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions pour deux portions adjacentes de même durée (1 minute) d'une séquence d'enregistrement d'activité unitaire d'une cellule du noyau arqué.

* 1 minute d'enregistrement : 178 intervalles mesurés

* 2 minutes d'enregistrement: 329 intervalles mesurés

Axe des ordonnées : Fréquences absolues des différents intervalles

Axe des abscisses : Durée des intervalles exprimée en secondes.

Intervalle de classe : 50 msec.

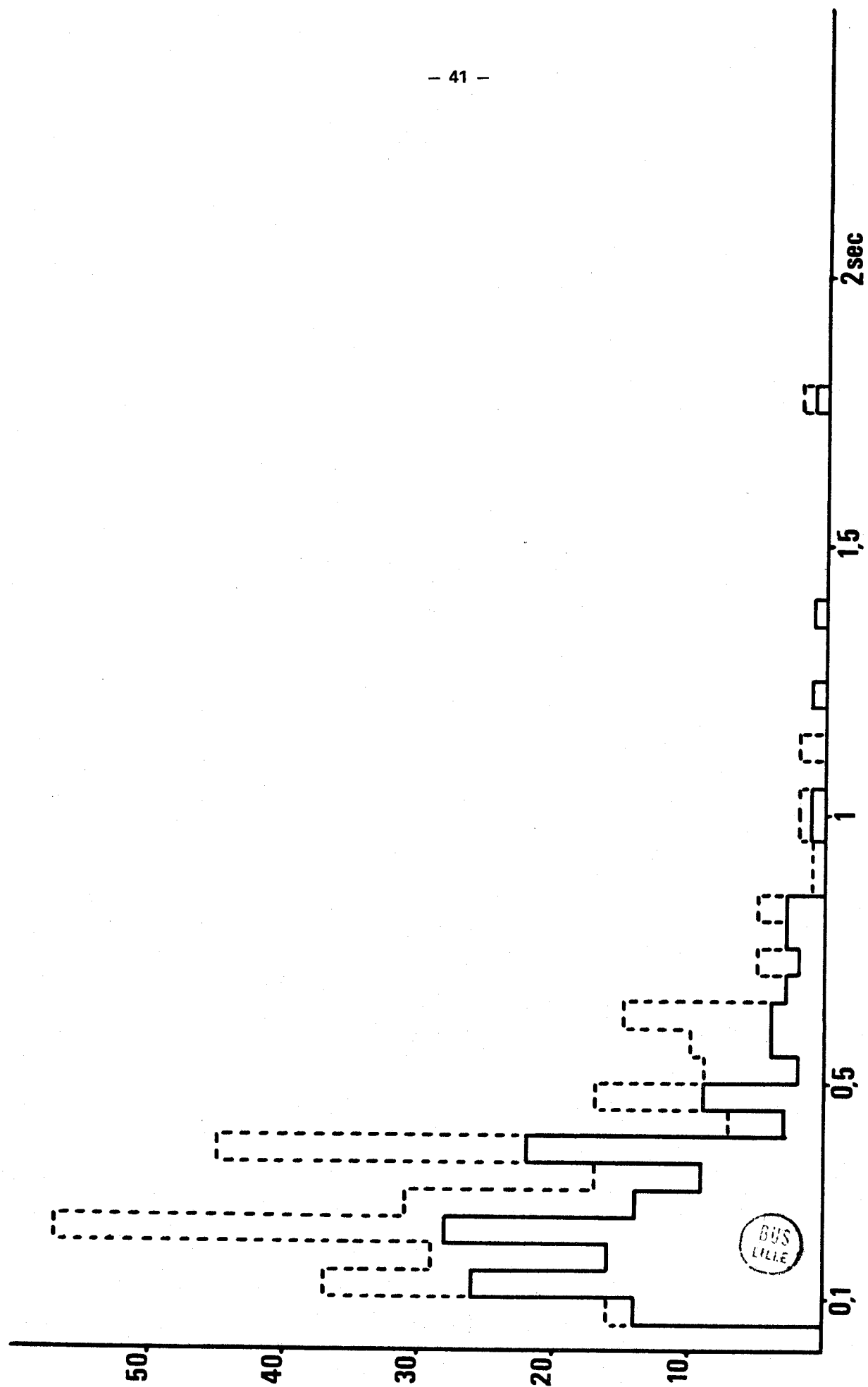


Figure 14 :

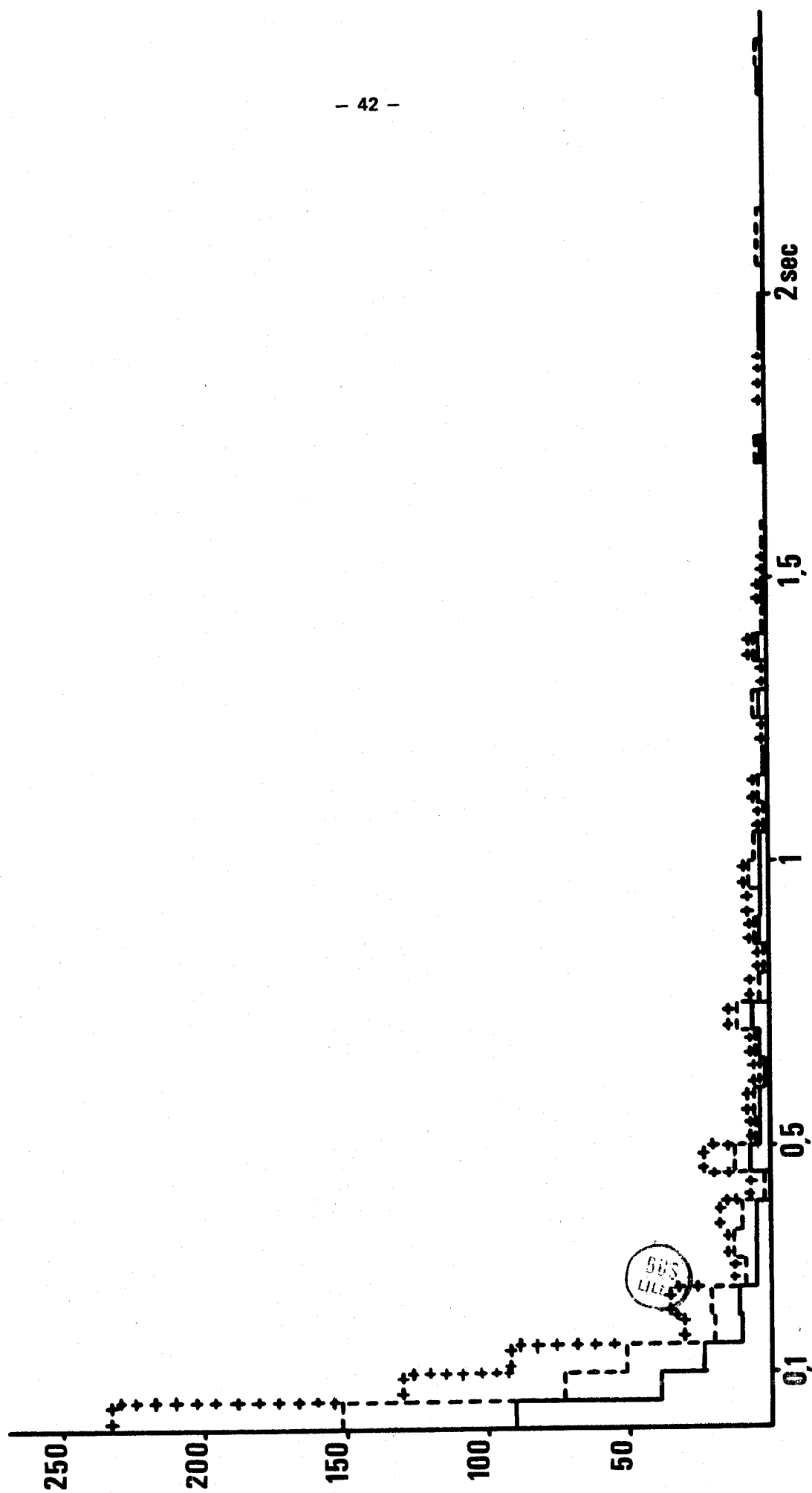
Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions pour trois portions adjacentes et de même durée (1 minute) d'une séquence d'enregistrement de l'activité unitaire d'une cellule du noyau arqué.

- * 1 minute d'enregistrement : 231 intervalles mesurés
- * 2 minutes d'enregistrement: 431 intervalles mesurés
- * 3 minutes d'enregistrement: 695 intervalles mesurés.

Axe des ordonnées : Fréquences absolues des différents intervalles.

Axe des abscisses : Durée des intervalles exprimée en secondes.

Intervalle de classe : 50 msec.



Un troisième exemple considère des séquences d'enregistrement non adjacentes prises à intervalles réguliers. Les variations de la fréquence moyenne λ sont importantes, les valeurs doublant ou triplant en fonction des séquences considérées (tableau 5).

	Fréquence moyenne λ
Temps : 0 mn	0,13/sec.
Temps : 15 mn	0,09/sec.
Temps : 30 mn	0,28/sec.
Temps : 45 mn	0,11/sec.
Temps : 60 mn	0,32/sec.

Tableau 5

Cependant l'activité unitaire de cette cellule du noyau arqué est stationnaire en ce qui concerne la répartition des intervalles de temps entre les impulsions (fig. 15).

2) Fréquences moyennes

Le taux de décharge moyen d'unités isolées actives spontanément constitue la plus simple des mesures statistiques d'un train d'impulsions. C'est un préliminaire essentiel à l'application de méthodes plus compliquées d'analyse telles que l'histogramme d'intervalles entre potentiels d'action. En outre, en raison du fait que l'hypothalamus est impliqué dans de nombreux mécanismes neuro-endocriniens, chaque fonction peut être supposée sous la dépendance directe ou indirecte de changements dans l'activité électrique des neurones de régions hypothalamiques : d'où l'intérêt d'une mesure telle que le taux moyen de décharge.

Les cellules du noyau arqué présentent un large spectre des fréquences moyennes (0,08 à 5,8 impulsions par seconde). Par ailleurs, dans cette aire hypothalamique, 50 à 60 % des unités ont un taux de décharge moyen inférieur à 0,50 par seconde, comme le montre l'histogramme des fréquences de distribution de ces mesures (fig. 16).

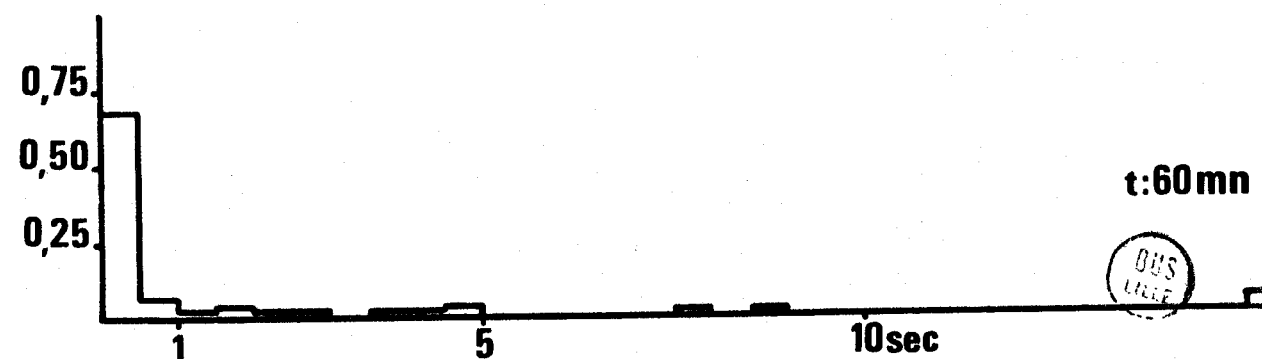
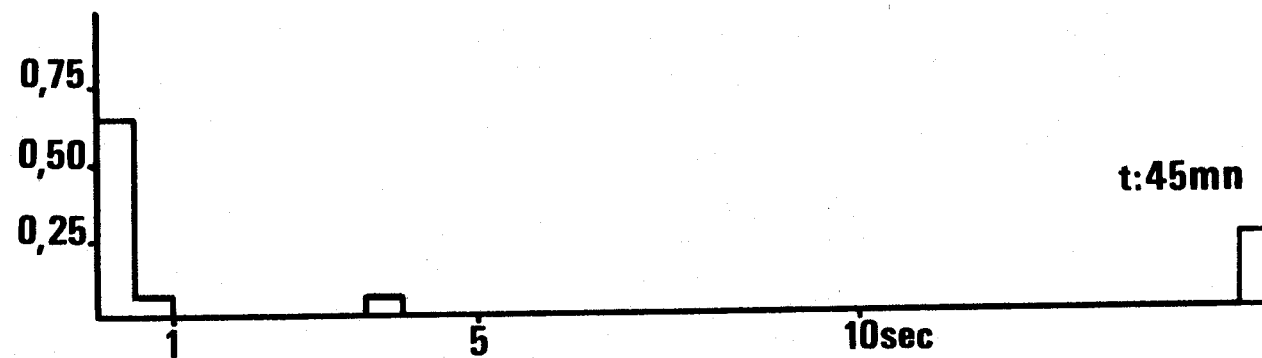
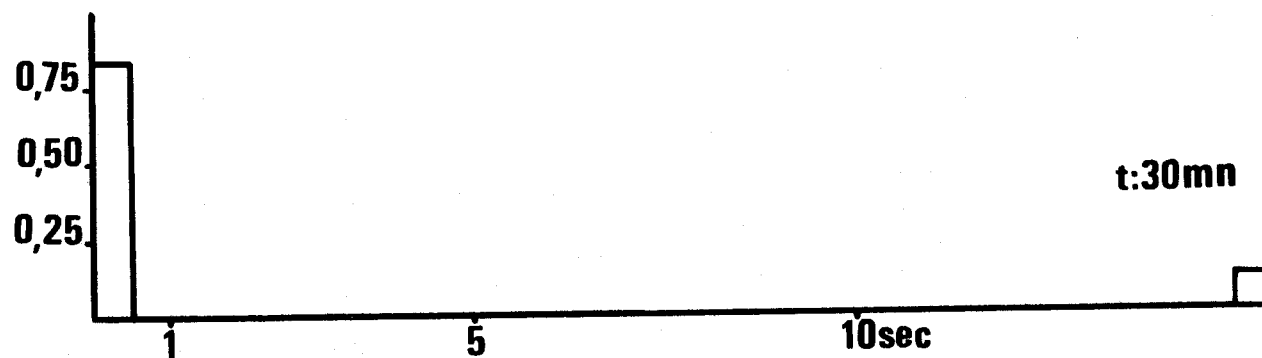
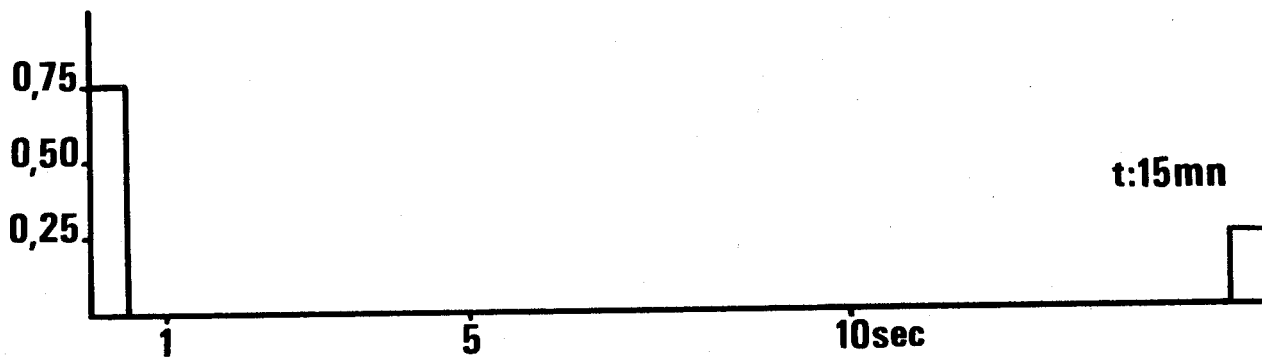
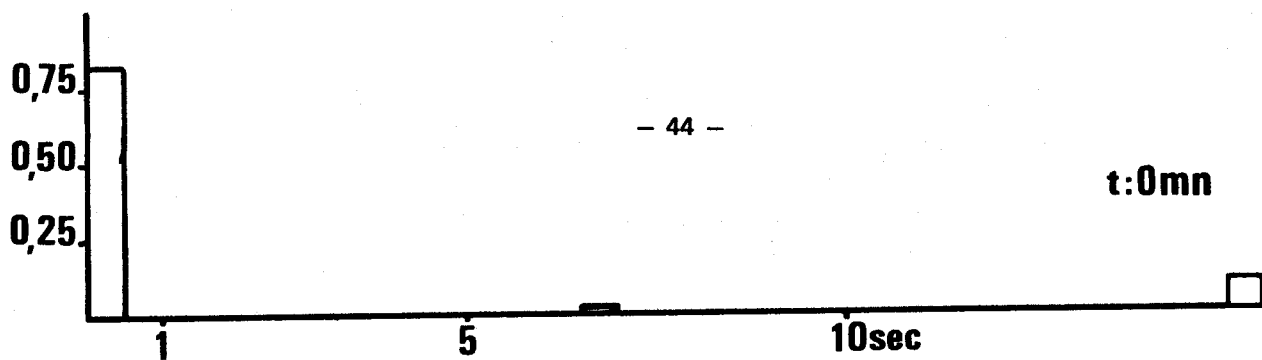
Figure 15 :

Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions à différents temps d'enregistrement de l'activité unitaire d'une cellule du noyau arqué.

Axe des ordonnées : Fréquences relatives des différents intervalles.

Axe des abscisses : Durée des intervalles de temps.

Intervalle de classe : 500 msec.



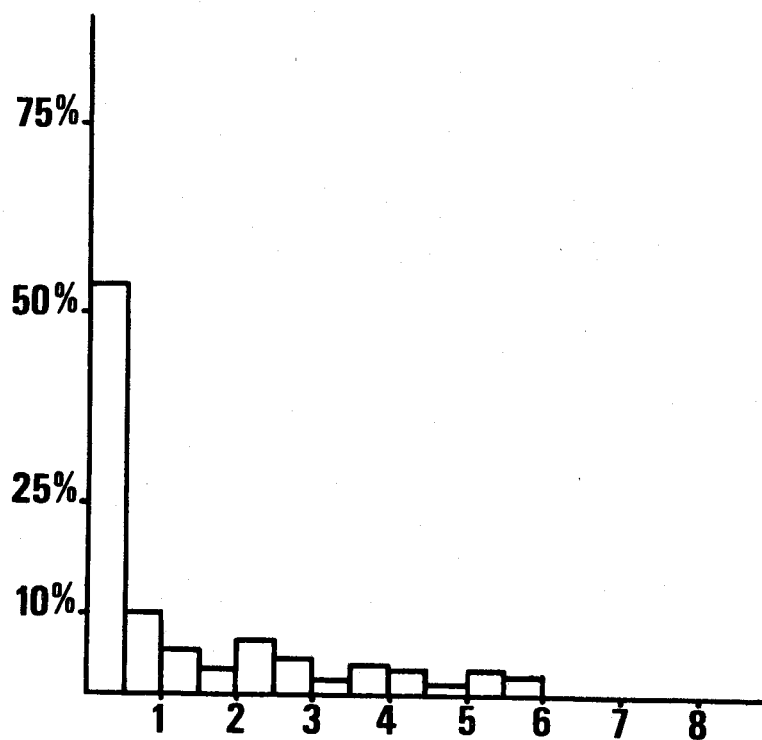


Figure 16 :

Histogramme montrant la répartition de la fréquence moyenne de l'activité unitaire spontanée des cellules du noyau arqué de l'hypothalamus de cobaye.

Axe des ordonnées : le pourcentage de cellules.

Axe des abscisses : la fréquence moyenne (nombre d'impulsions par seconde).



3) Structure temporelle de l'activité unitaire des neurones du noyau arqué

Les exemples montrés figure 17 indiquent que l'activité unitaire spontanée de telles cellules peut présenter un aspect très diversifié. La décharge unitaire (exemple A, figure 17) n'a ni «bursts» de fréquence de décharge élevée, ni longues périodes d'inactivité. Ou bien elle est marquée par la présence de «bursts» courts et longs séparés par de faibles périodes d'inactivité (exemple B, figure 17). Lors de ces «bursts», train d'impulsions survenant rapidement l'une après l'autre, l'amplitude des potentiels d'action diminue graduellement. Parfois, la cellule a également une activité sous forme de «bursts» séparés dans ce cas, par de longues périodes d'inactivité (exemple D, figure 17). Une décharge unitaire faible et assez régulière est illustrée par l'exemple C, figure 17.

Les histogrammes d'activité en fonction du temps des figures 18 et 19 sont le reflet à la fois, des fréquences moyennes très variées et des différentes structures temporelles de l'activité unitaire spontanée des neurones du noyau arqué.

4) Histogrammes de répartition des intervalles de temps entre les impulsions

L'activité unitaire consiste donc en une série d'impulsions revenant plus ou moins régulièrement de sorte qu'aucun pattern ordonné ne peut être détecté par inspection visuelle d'un enregistrement de cette activité. La question se pose de savoir si vraiment, il y a ou non structure temporelle organisée dans ces séquences d'impulsions. La réponse à cette question peut être obtenue grâce à l'établissement d'histogrammes de répartition d'intervalles de temps entre les potentiels d'action. En effet, toute modification de la structure temporelle doit évidemment être associée à certains changements dans la distribution des intervalles de temps entre les impulsions.

En raison du large spectre des fréquences moyennes de l'activité des neurones du noyau arqué, deux intervalles de classe pour l'établissement de ces histogrammes ont été choisis en fonction du taux moyen de décharge des cellules.

- dans le cas de cellules dont la fréquence moyenne est supérieure à une impulsion par seconde, l'intervalle de classe des histogrammes est égal à 50 msec.
- celui des histogrammes pour des cellules à faible activité spontanée (inférieure à une impulsion par seconde) a pour valeur 500 msec.

a) Histogrammes des courts intervalles (fig. 20)

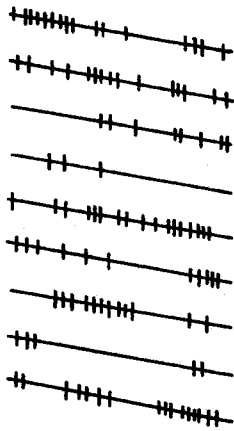
- Histogramme d'allure exponentielle exemple A
Où les faibles valeurs d'intervalles dominant. Un pic apparaît de 0 à 50 msec, après lequel la fréquence des

Figure 17 :

Enregistrements de l'activité unitaire de 4 neurones du noyau arqué. (Lecture de haut en bas et de gauche à droite).

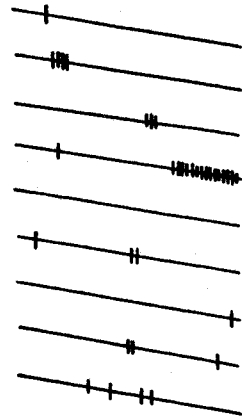
Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre total de potentiels d'action présents dans les séquences d'enregistrements montrées.

A



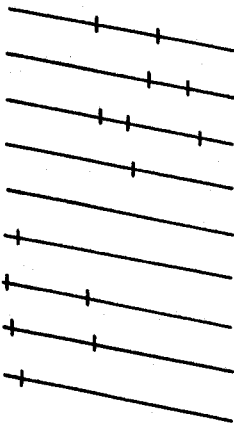
(103)

B



(35)

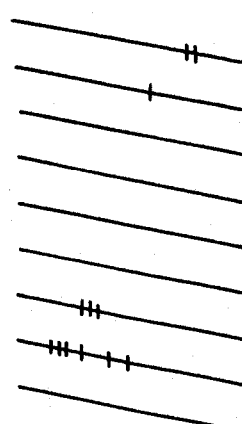
C



(14)

1sec

D



(12)



Figure 18 :

Histogrammes d'activité en fonction du temps de deux
cellules du noyau arqué.

A : Cellule de fréquence moyenne : 5,21/sec.

B : Cellule de fréquence moyenne : 1,35/sec.

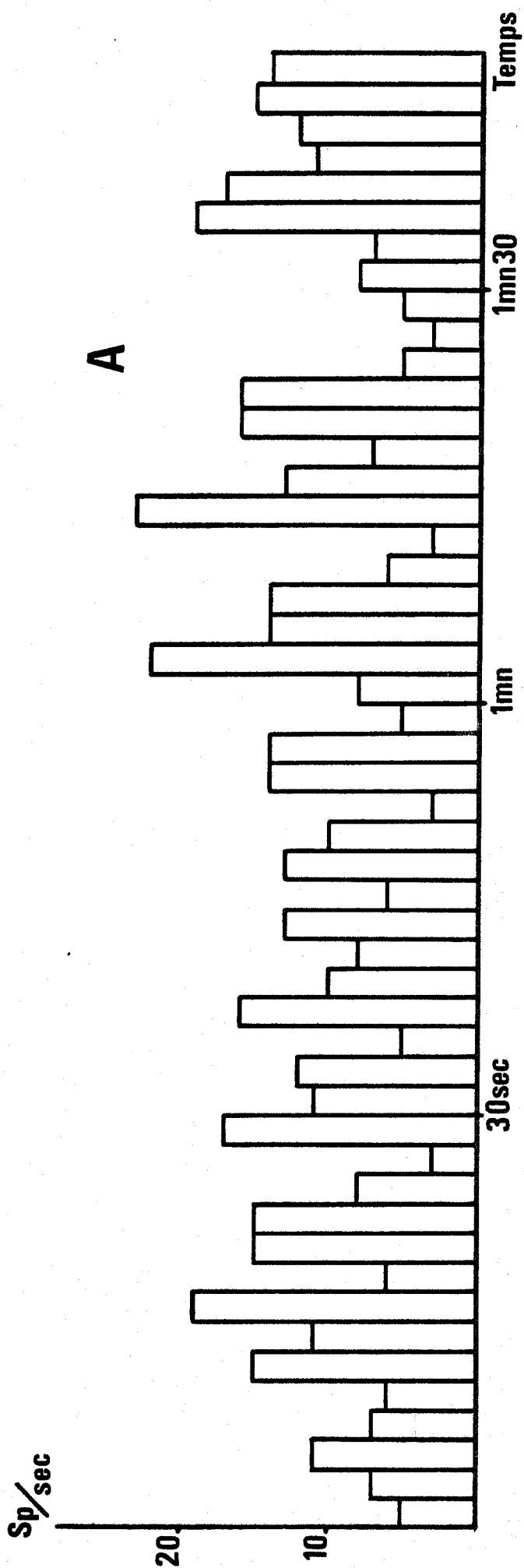


Figure 19 :

Histogrammes d'activité en fonction du temps de deux
cellules du noyau arqué à activité spontanée lente.

A : Fréquence moyenne de la cellule : 0,28/sec.

B : Fréquence moyenne de la cellule : 0,25/sec.

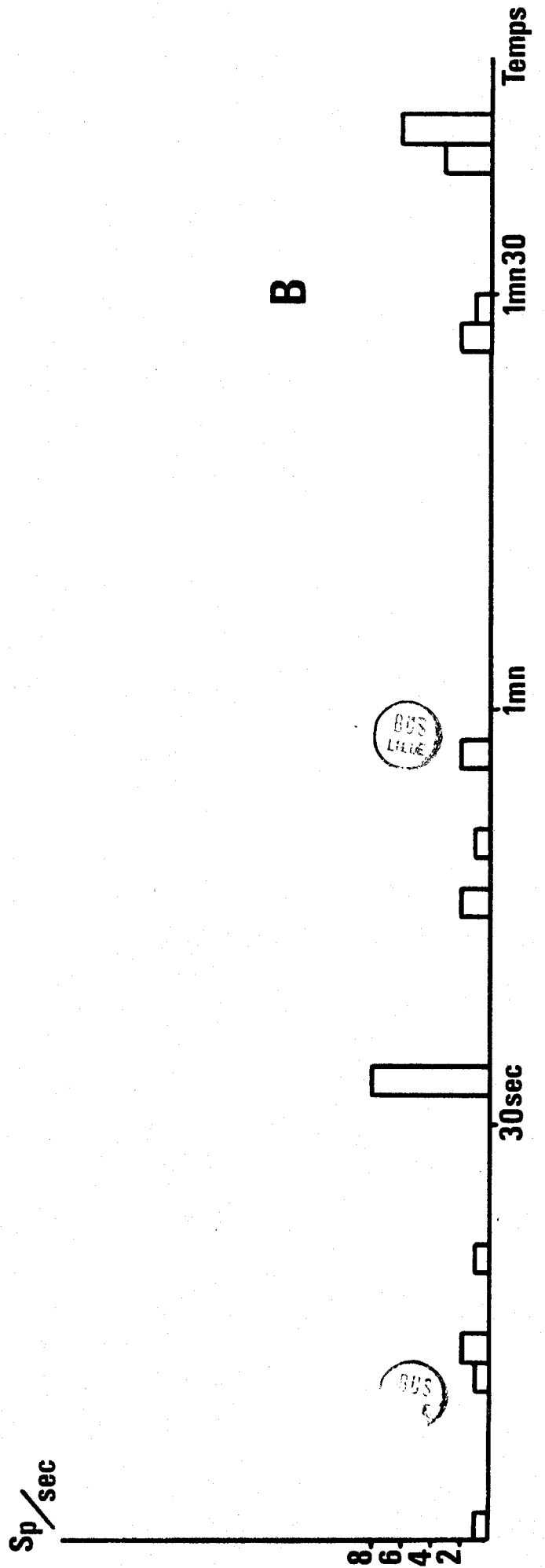
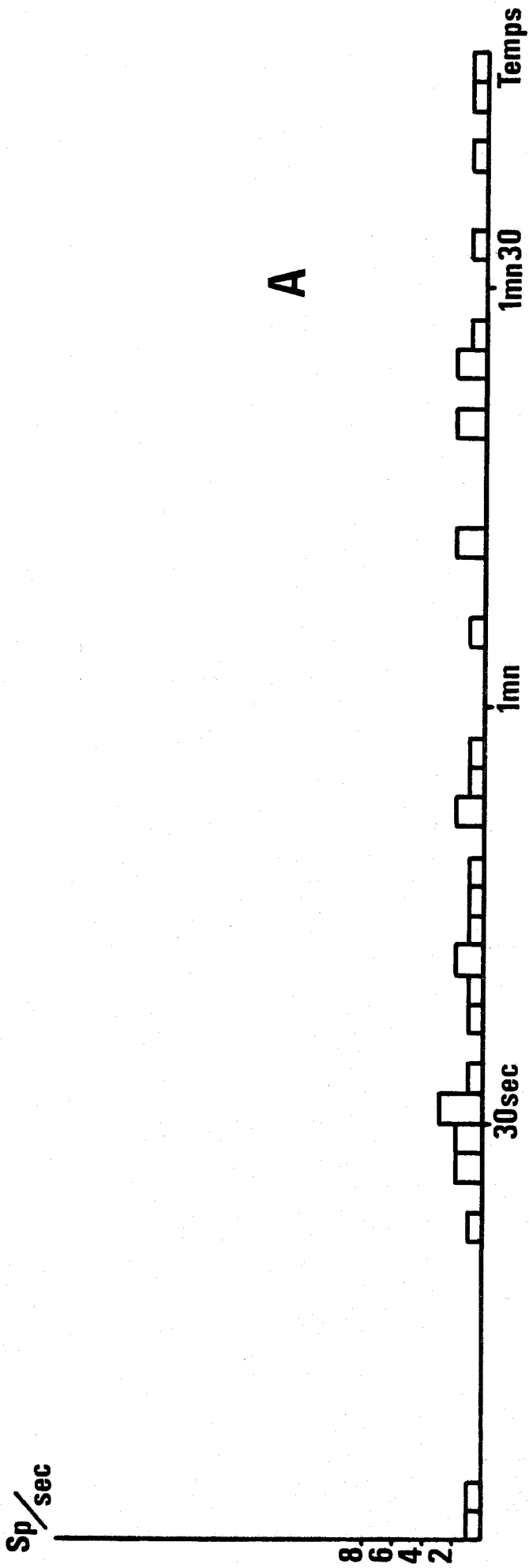


Figure 20 :

Histogrammes de répartition des courts intervalles de temps entre les impulsions.

Axe des ordonnées : Fréquences relatives des différents intervalles

Axe des abscisses : Durée des intervalles exprimée en secondes.

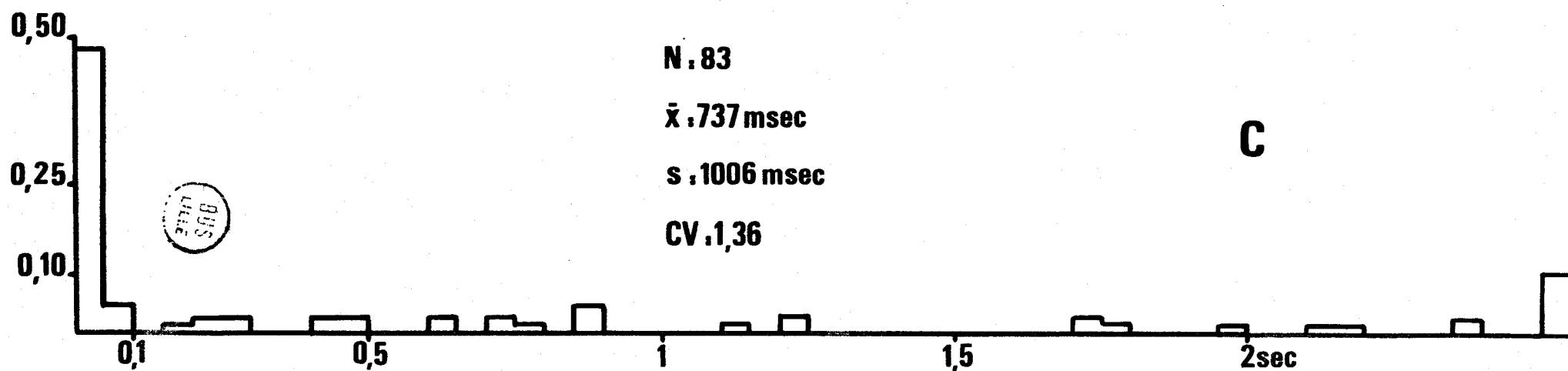
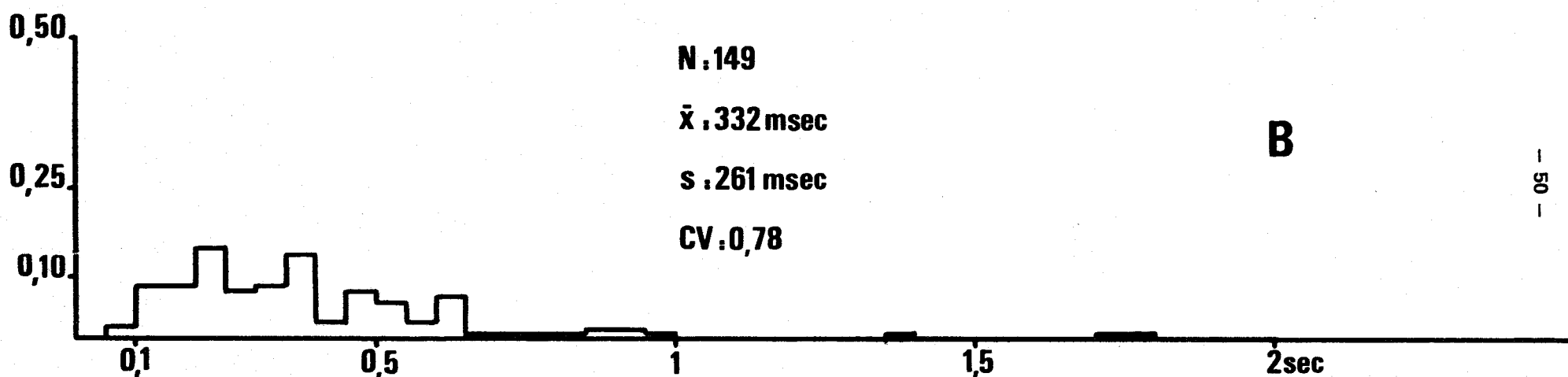
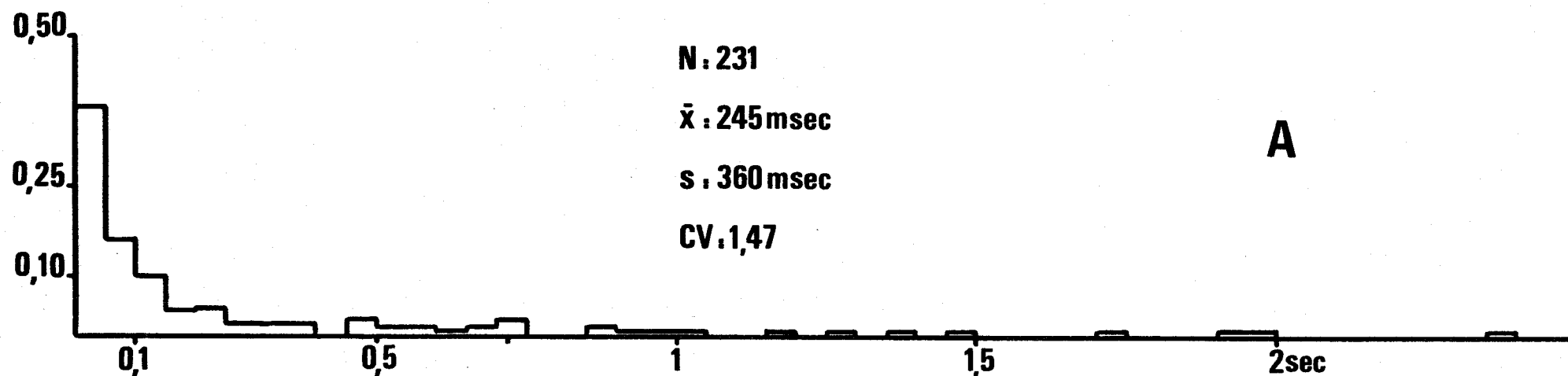
Intervalle de classe : 50 msec.

N : nombre d'intervalles mesurés

$\bar{x}$: intervalle moyen

s : déviation standard

CV : coefficient de variation



intervalles plus longs diminue de façon approximativement exponentielle. Ceci suggère que chaque décharge est indépendante de la précédente ou de la suivante (POGGIO et VIERNSTEIN 1964).

— Histogramme multi-modal exemple B

Il y a absence des faibles valeurs d'intervalles.

— Histogramme d'une activité sous forme de «bursts» exemple C

Une nette domination des très faibles valeurs d'intervalles apparaît avec un pourcentage proche de 50. Le reste des valeurs d'intervalles ne présente pas de continuité entre elles.

b) Histogrammes des longs intervalles (fig. 21)

— Histogramme sans forme définie exemple A

Les valeurs des intervalles présentent une grande dispersion.

— Histogramme d'une activité sous forme de «bursts» exemple B

Il y a prédominance des faibles valeurs d'intervalles.

5) Discussion

Il apparaît en fait, avec les exemples donnés (fig. 13, 14 et 15), que les tests complètement satisfaisants pour déterminer l'état stationnaire dans un train d'impulsions délimité n'existent pas (MOORE et coll. 1966). Ainsi, l'activité unitaire d'un neurone du noyau arqué peut être stationnaire tant du point de vue taux de décharge moyen que du point de vue répartition des intervalles de temps entre les potentiels d'action. Ou bien elle est seulement stationnaire en ce qui concerne les histogrammes d'intervalles, les fréquences moyennes présentant des fluctuations plus ou moins importantes.

Les cellules du noyau arqué de l'hypothalamus de cobaye montrent un large spectre des fréquences (0,08 à 5,8/sec.). Ceci est en accord avec les résultats de KAWAKAMI et KUBO (1971) qui indiquent une activité unitaire du noyau arqué tout à fait irrégulière : 0,2 à 10 impulsions/sec., chez des rattes adultes sous anesthésie légère à l'uréthane. Les autres régions de l'hypothalamus chez différents animaux présentent sensiblement les mêmes gammes de fréquence. DAFNY, BENTAL et FELDMAN (1965) ont enregistré des fréquences de 0,01 à 3,19/sec. dans l'hypothalamus postérieur de chats sous anesthésie au pentobarbitone. CROSS et SILVER (1963), BARRACLOUGH et CROSS (1963), dans l'étude de neurones hypothalamiques de lapins et de rats respectivement, sous uréthane, ont également observé une importante gamme des fréquences d'activité unitaire :

Figure 21 :

**Histogrammes de répartition des longs intervalles de temps
entre les impulsions.**

Axe des ordonnées : Fréquences relatives des différents intervalles

Axe des abscisses : Durée des intervalles.

Intervalle de classe : 500 msec.

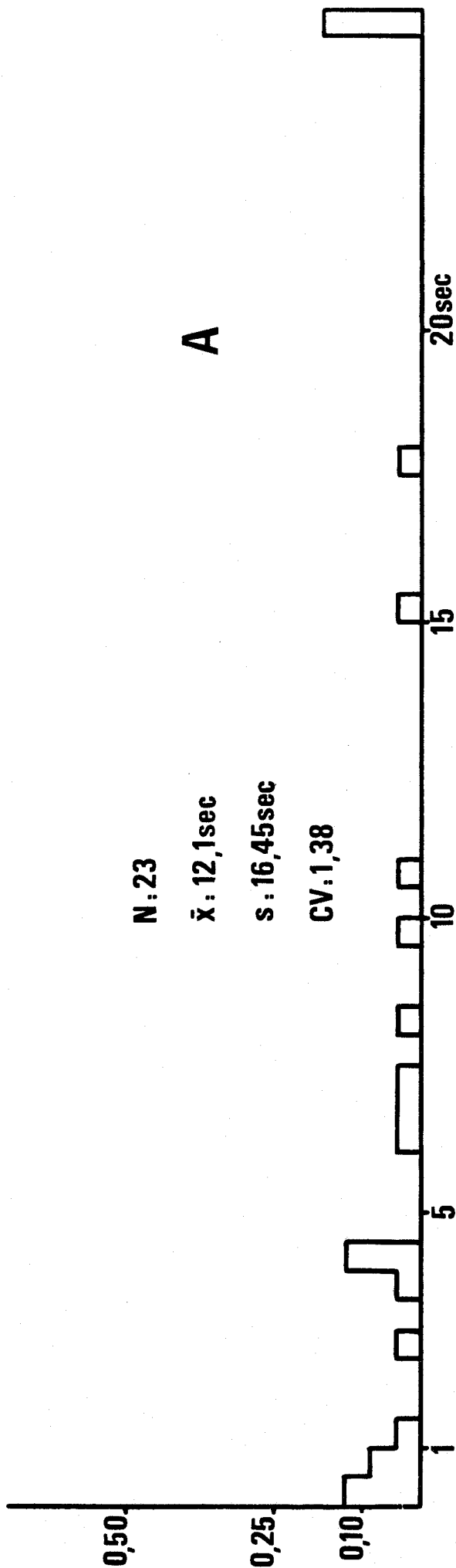
A

N: 23

$\bar{x}$: 12,1sec

s: 16,45sec

CV: 1,38



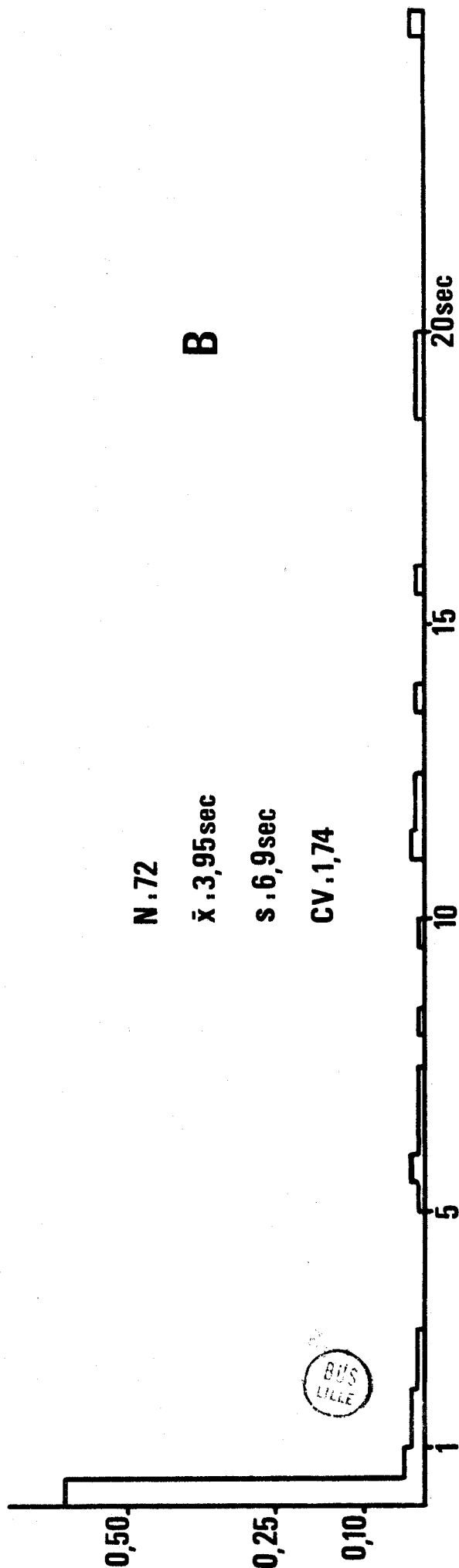
B

N: 72

$\bar{x}$: 3,95sec

s: 6,9sec

CV: 1,74



1 à 10/sec. CROSS et GREEN (1959), dans leur travail original sur l'activité unitaire hypothalamique trouvent qu'il y a une proportion élevée d'unités à activité lente et ce phénomène a été confirmé dans des études plus récentes (CROSS et SILVER, 1966). LINCOLN (1967) a établi que la relation entre le nombre d'unités des aires hypothalamiques latérales, pré-optiques et septales et leurs fréquences moyennes est de type exponentiel. Ce phénomène est encore plus accentué au niveau du noyau arqué comme l'indique l'histogramme de la figure 16. Un pourcentage élevé (50 à 60 %) d'unités rencontrées décharge à moins de 1 impulsion par seconde, ceci bien que la gamme des fréquences observées soit importante (0,08 à 5,8/sec.). Encore faut-il supposer que ce pourcentage d'unités présentant une faible fréquence moyenne inférieure à 0,5/sec., est plus élevé puisqu'il n'est pas possible d'enregistrer avec une probabilité égale de telles activités unitaires.

Il a été montré en outre, que la fréquence moyenne de décharge de l'ensemble des cellules de l'hypothalamus tubéral chez le rat est très faible : 1,4/sec. (MANDELBROD et FELDMAN, 1972). Si l'on considère uniquement la population cellulaire représentée par le noyau arqué, la valeur de cette fréquence moyenne globale est sensiblement la même : 1,42/sec. Cette observation a pour conséquence que tout échantillon d'unités du noyau arqué dépendra en partie du succès de l'enregistrement des unités à activité spontanée lente, en particulier des 50 à 60 % de cellules de taux moyen de décharge inférieur à 0,50/sec. Dans tout traitement expérimental susceptible d'influencer le niveau global de l'activité spontanée des cellules, il faudra prendre garde que les variations dans les caractéristiques des échantillons d'unités ne soient pas simplement le reflet d'échantillons contenant différentes populations de cellules. Les expériences d'enregistrement devront être réalisées avec soin, et les comparaisons entre expériences devront tenir compte des échantillons respectifs d'unités.

Cet ensemble de neurones à faible activité spontanée peut ne posséder qu'une petite signification fonctionnelle. Mais on peut tout aussi bien supposer que de telles cellules sont impliquées dans des fonctions spéciales, et, dans tous les cas, une faible activité spontanée et même une absence d'activité de n'importe quelle unité peuvent avoir beaucoup plus de signification fonctionnelle que la présence d'une activité plus importante.

L'absence d'enregistrement de l'activité unitaire sur bandes magnétiques et de calculateurs électroniques n'a pas permis une analyse poussée des distributions d'intervalles entre les impulsions dont l'établissement a été effectué à partir de séquences d'enregistrements filmés. Les caractéristiques des quelques histogrammes d'intervalles entre les potentiels d'action, donnés en exemple, (fig. 20 et 21) sont en accord avec celles rapportées par OOMURA et coll. (1964, 1969) et par ALEKSANYAN et coll. (1972) pour les

aires hypothalamiques ventro-médianes et latérales respectivement chez le chat et le rat. La plupart des histogrammes de neurones à activité spontanée sont de type exponentiel ou de type gamma 2. Plus rarement, des histogrammes correspondant à des activités sous forme de «bursts» sont établis. OOMURA et coll. (1969) ont établi un rapport entre le coefficient de variation CV et la forme des distributions d'intervalles entre les impulsions. A une forme exponentielle, correspond CV entre 0,8 et 1,5 ; à une forme gamma 2 équivaut CV entre 0,6 et 0,8. Dans le cas d'histogrammes de forme non définie, le coefficient de variation tend à être inférieur à 0,6 ou supérieur à 1,5. Si l'histogramme A (fig. 20) d'allure exponentielle a effectivement un CV compris entre 0,8 et 1,5 (1,47), par contre, les histogrammes C (fig. 20) A (fig. 21), sans forme définie, possèdent des valeurs de CV correspondant à des distributions d'allure exponentielle. Cependant, ces valeurs sont proches de 1,5. L'histogramme B (fig. 21) a un CV égal à 1,74 qui le classe dans les formes non définies. Quant à l'histogramme B (fig. 20), son coefficient de variation, égal à 0,78, tend à le classer dans le type de distribution gamma2.

D - RÉPONSES A LA STIMULATION DE **L'ÉMINENCE MÉDIANE**

1) Localisation des neurones

La stimulation de l'éminence médiane a induit des réponses unitaires dans les noyaux hypothalamiques suivants :

- le noyau pré-mamillaire (planche II, fig. a)
- le noyau ventro-médian (planche II, fig. b)
- le noyau arqué (planche II, fig. c et d).

Les corps cellulaires de tous ces neurones sont situés à moins de 0,8 mm de la ligne médiane (fig. 22).

Les réponses observées ne représentent pas nécessairement des activités antidromiques en raison de la présence de collatérales axoniques. Aussi chaque réponse à la stimulation de l'éminence médiane sera-t-elle soumise à un certain nombre de critères qui permettront de conclure à la nature antidromique ou non de l'activité obtenue.

2) Critères d'identification du caractère antidromique d'un potentiel d'action.

- forme du potentiel d'action antidromique

Les réponses obtenues à la suite de la stimulation de l'éminence médiane présentent le plus souvent une première phase positive dissociée en deux composantes par une inflexion plus ou moins nette (planche II, fig. a, b, c, d.). Cette première phase est soit simplement suivie d'une phase négative (planche II, fig. d) soit suivie de deux phases l'une négative, l'autre positive (planche II, fig. a et b). Certains potentiels d'action antidromiques ont une phase positive de faible amplitude suivie d'une phase négative plus développée (planche II, fig. d). Une telle observation correspondrait à l'utilisation d'une micro-électrode d'enregistrement de faible résistance selon BISHOP et coll., 1962.

- fixité de la latence des potentiels d'action antidromiques

La latence constante de chaque réponse unitaire est un critère nécessaire pour que la réponse observée soit considérée comme antidromique (planche II, fig. e). La majorité des cellules identifiées répondent à des stimulations appliquées à l'éminence médiane, toutes les 750 msec, avec une latence fixe, dont la durée est comprise entre 3 et 17 msec.

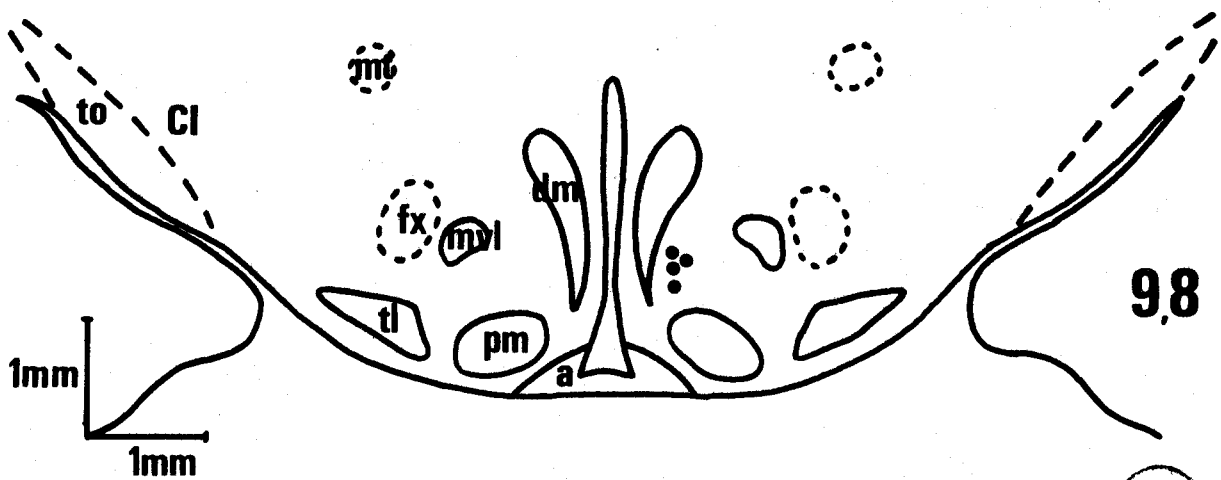
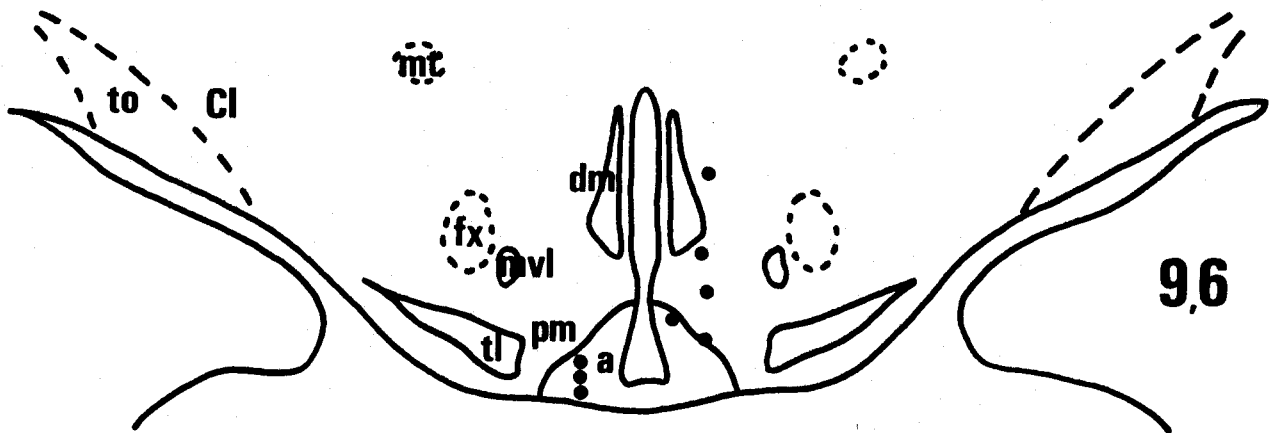
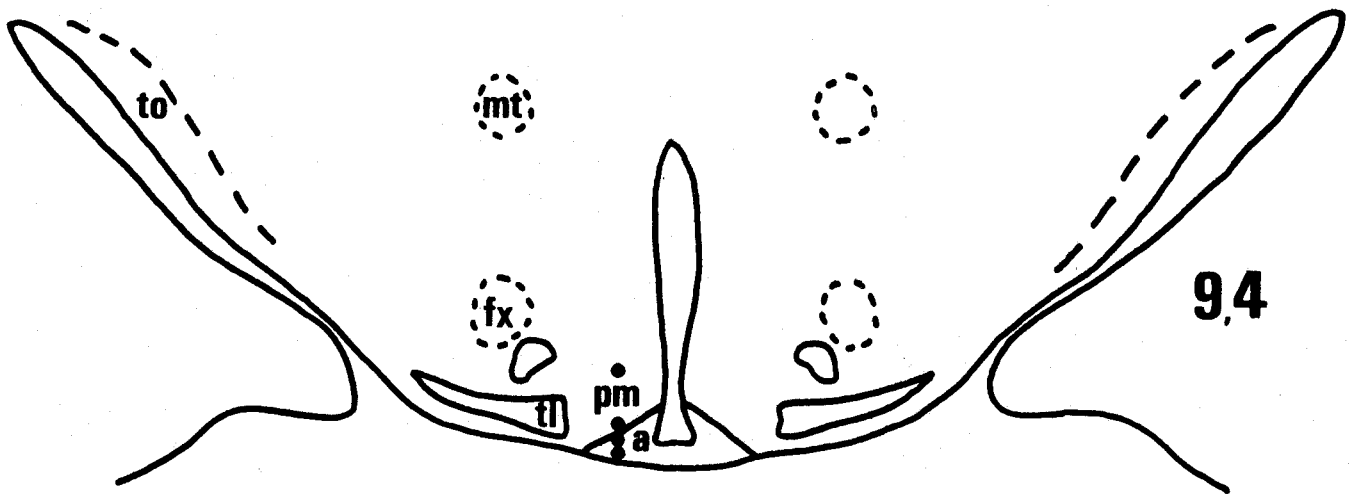
Figure 22 :

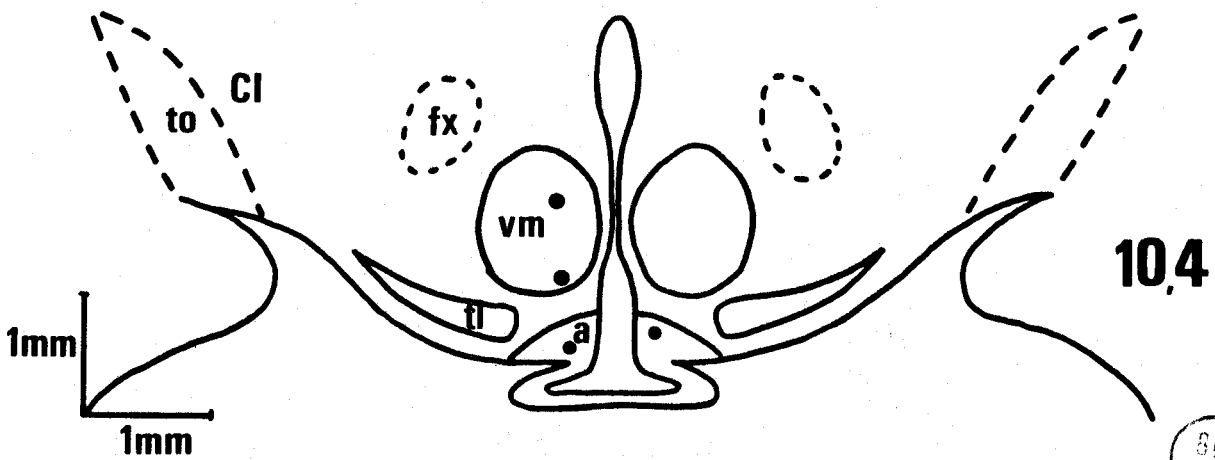
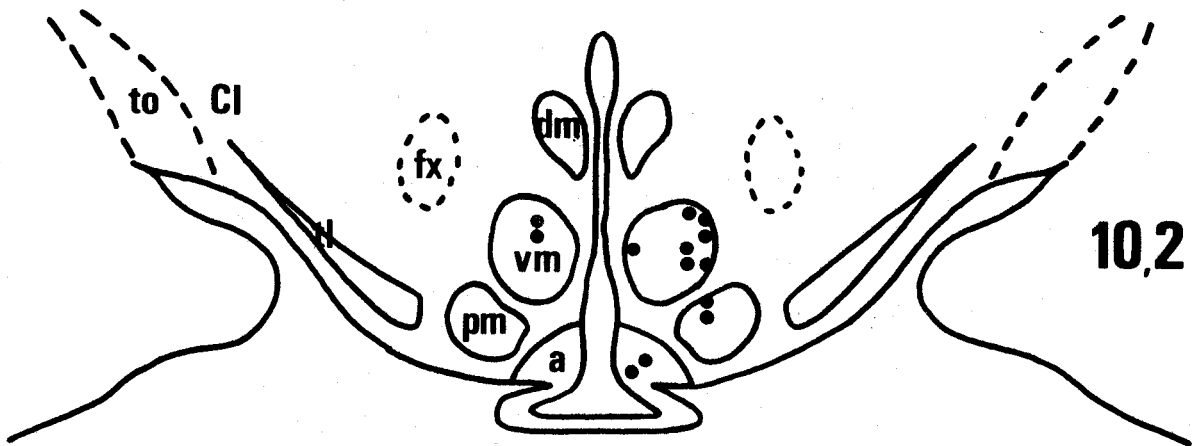
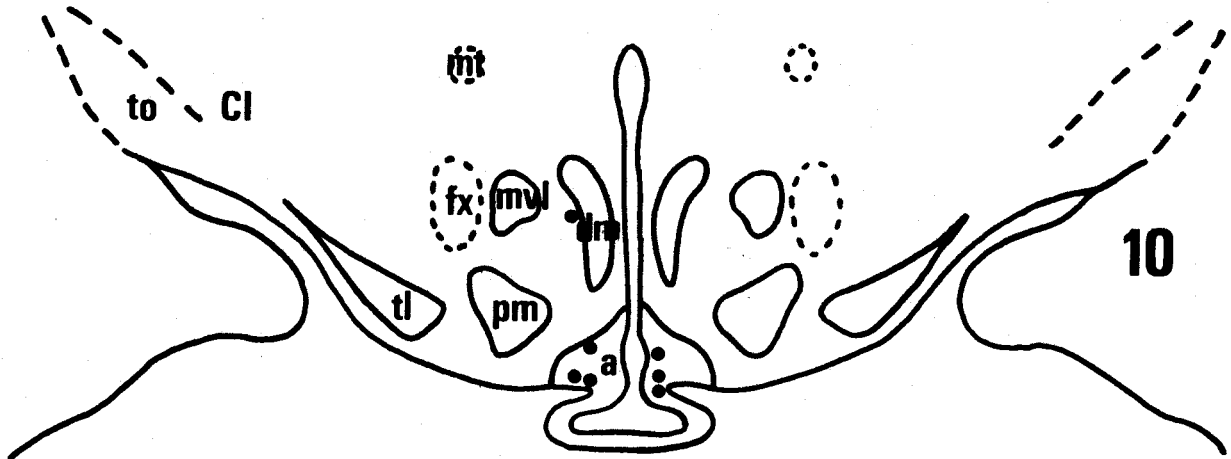
Schémas de différentes coupes frontales de l'hypothalamus de cobaye (d'après l'atlas stéréotaxique de POULAIN) indiquant la localisation de neurones activés antidromiquement par stimulation de l'éminence médiane.

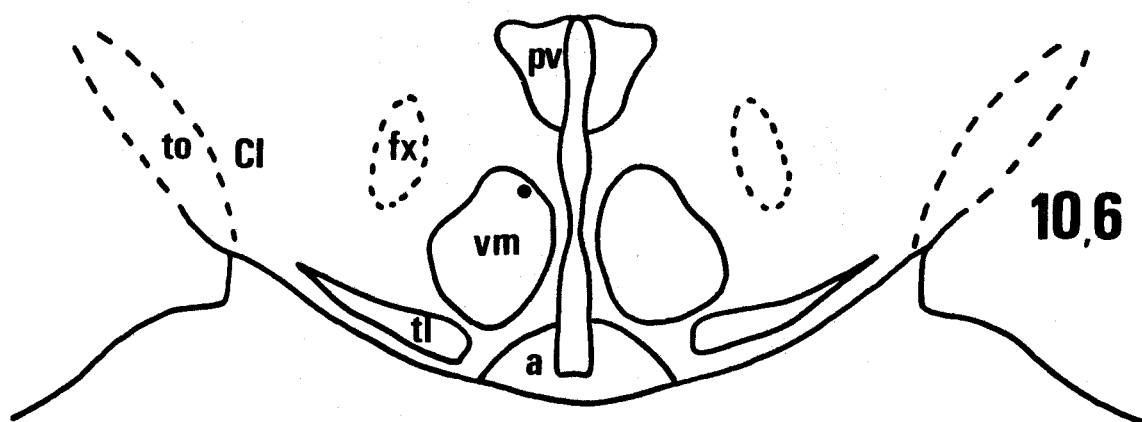
La localisation de chaque enregistrement est déterminée par calcul des mouvements du micromanipulateur en se référant à la position d'un spot.

Le nombre à la droite des différents schémas, correspond à la coordonnée antéro-postérieure.

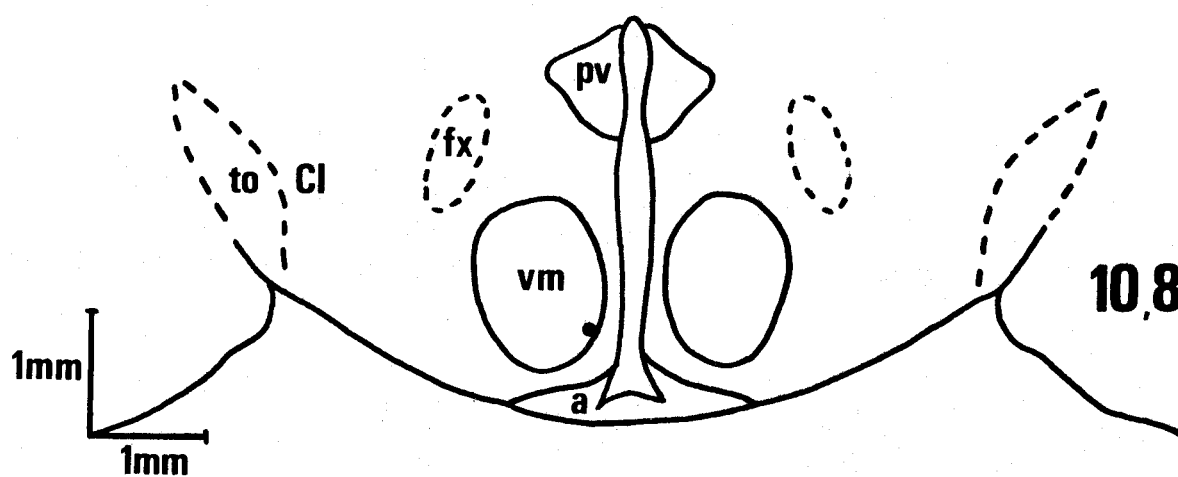
a	:	noyau arqué
CI	:	capsule interne
dm	:	dorso-médian
fx	:	fornix
mt	:	faisceau mamillo-thalamique
mvl	:	noyau magnocellulaire ventro-latéral
pm	:	noyau pré-mamillaire
pv	:	noyau para-ventriculaire
tl	:	noyau du tuber latéral
to	:	tractus optique
vm	:	noyau ventro-médian







10,6



10,8

BUS
LILLE

Planche II

Potentiels d'action antridromiques précédés du choc artéfact, en réponse à la stimulation de l'éminence médiane.

Les sites d'enregistrement sont :

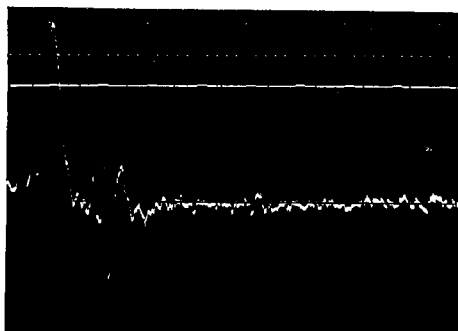
- le noyau pré-mamillaire (fig. a)
- le noyau ventro-médian (fig. b)
- le noyau arqué (fig. c et d)

Dans ces figures et dans les suivantes, la phase positive des potentiels d'action est vers le haut.

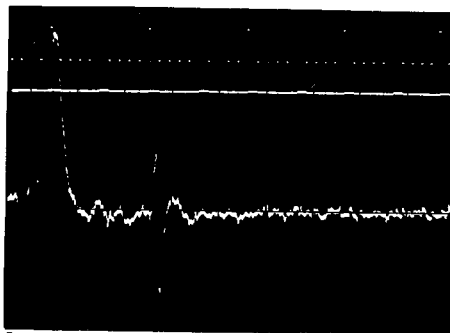
La figure e montre la fixité de la latence des réponses d'une unité du noyau ventro-médian. L'enregistrement inférieur est une superposition de trois réponses successives à des stimuli délivrés toutes les 750 msec. En comparaison, l'enregistrement supérieur correspond à la réponse à un seul stimulus.

Les calibrations indiquées sont valables pour tous les enregistrements présentés dans cette planche.

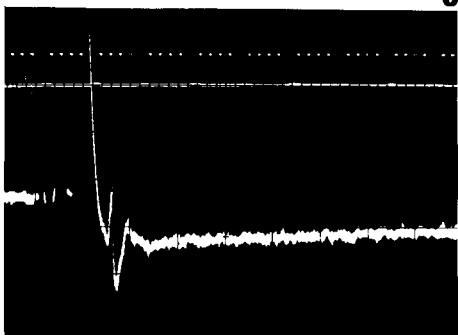




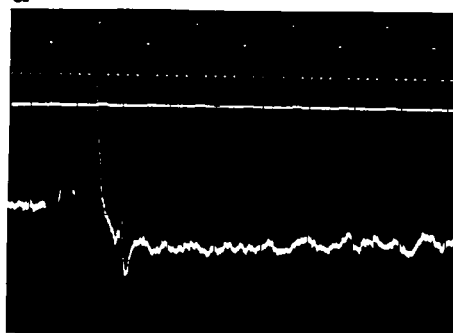
a



b

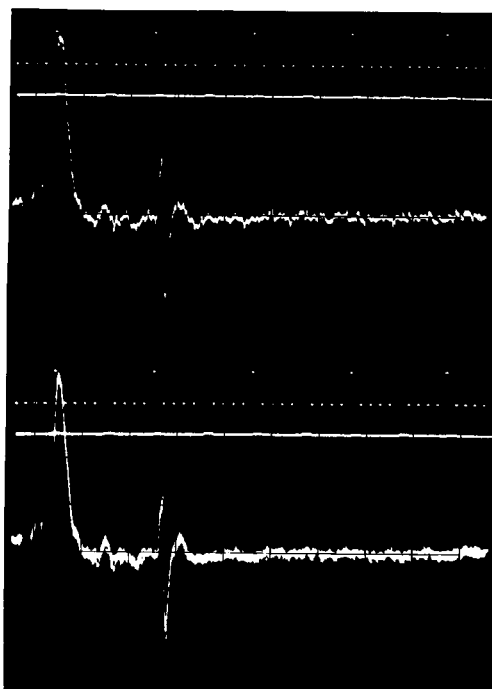


c



d

1 cliché



**3 clichés
superposés**

e

0,2 mV
5 msec



- réponses à des stimuli répétitifs

Chaque unité suit exactement un train de plusieurs chocs, appliqués à une fréquence élevée. La figure a, planche III, montre les potentiels d'action obtenus à la suite de trois stimuli, appliqués à la fréquence de 110 par seconde.

Les modifications de forme des impulsions, induites par stimulation à haute fréquence peuvent être attribuées à la période réfractaire relative de la membrane du soma et des dendrites (SAWAKI et YAGI, 1973).

- réponses à une paire de stimuli

a) réponses à deux stimuli de même intensité supra-luminaire séparés par un intervalle de temps important

Les deux potentiels d'action obtenus à la suite d'une telle stimulation présentent une configuration identique (planche III, fig. b).

b) réponses à deux stimuli, l'un conditionnant, l'autre test

ECCLES (1964) a mis en évidence au niveau de synapses excitatrices le phénomène de facilitation temporelle de la transmission tandis que HUBBARD (1963) rapporte l'idée de potentiation de la libération du transmetteur au niveau de la jonction neuro-musculaire. Ceci conduit à penser que le seuil et la latence d'une réponse, conséquence d'une activation synaptique, à un choc test à la suite d'un choc conditionnant seront plus faibles que dans le cas d'une réponse à un seul choc.

Or, il est possible de montrer que l'inverse se produit pour toute réponse à caractère antidromique. Deux chocs, l'un conditionnant, l'autre test sont appliqués, leur intensité étant située un peu au-dessus du seuil. La réduction de l'intervalle de temps entre ces deux stimuli entraîne d'abord une décomposition plus nette du potentiel d'action (Planche III, fig. c1). Au-delà d'un certain intervalle de temps, une seule réponse aux deux chocs est obtenue (planche III, fig. c2). L'obtention à nouveau d'une deuxième réponse entraîne la nécessité d'augmenter l'intensité de stimulation du choc test, l'intervalle de temps entre les deux stimuli restant le même (planche III, fig. c3).

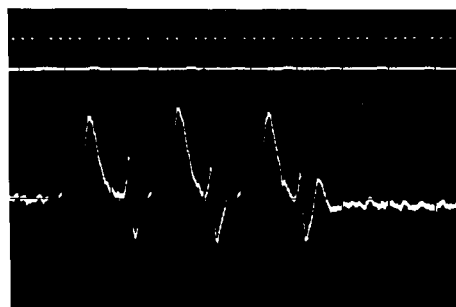
- collision d'un potentiel d'action antidromique avec des impulsions survenant spontanément.

Il est possible d'observer une annulation du potentiel d'action antidromique d'une cellule ayant une activité propre, par un potentiel d'action spontané (planche IV, fig. a).

Planche III

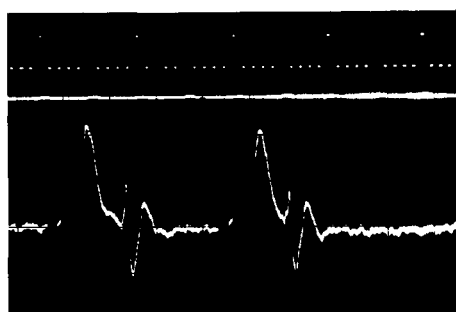
- Fig. a : Réponses d'une unité activée antidromiquement à des stimuli répétitifs (fréquence : 110 Hz)
- Fig. b : Réponses à une paire de stimuli séparés par 17 msec.
- Fig. c1 : Réponses à une paire de stimuli de même largeur (1 msec) et de même intensité séparés par 7 msec.
- Fig. c2 : Réponses à une paire de stimuli séparés par 5 msec.
Un seul potentiel d'action est enregistré.
- Fig. c3 : L'augmentation du second choc de stimulation permet l'obtention à nouveau de deux potentiels d'action, les deux chocs étant toujours séparés par le même intervalle de temps.



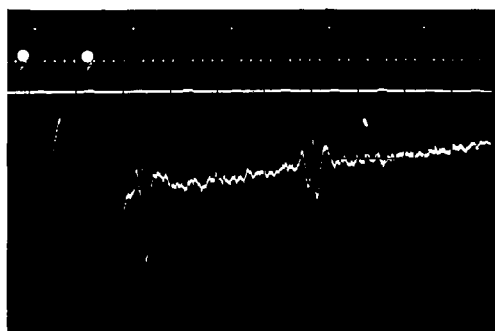


0,2mV
5msec

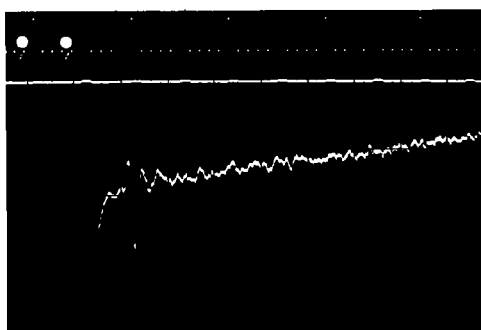
a



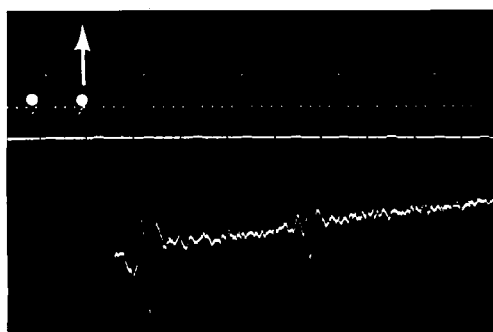
b



c1



c2



c3

BUS
LINE

3) Réponses atypiques

L'activation, par stimulation de l'éminence médiane, de certaines cellules conduit à des réponses ne présentant pas les critères précédemment décrits.

- les réponses à la suite de chocs répétés toutes les 750 msec ne possèdent pas une latence fixe (planche IV, fig. b1, b2).

- parfois deux voire trois potentiels d'action sont obtenus en réponse à chaque stimulus (planche IV, fig. c).

Il est supposé que ces deux types de réponse correspondent à une stimulation orthodromique.

4) Discussion

La répartition des 47 réponses unitaires obtenues à la suite de la stimulation de l'éminence médiane s'établit comme suit :

Tableau 6

	Réponses antidromiques	Réponses atypiques
noyau arqué	18	1
noyau ventro-médian	13	2
noyau pré-mamillaire	2	
autres localisations (région du tuber)	9	2

Ces résultats montrent qu'une grande partie des neurones du tractus tubéro-infundibulaire est située dans le noyau arqué. Cependant, des neurones des noyaux ventro-médian et pré-mamillaire participent également à la constitution de ce tractus. Ceci confirme les études électrophysiologiques de HARRIS et coll. (1971) et celles de SAWAKI et YAGI (1973).

Planche IV

Fig. a : montrant l'annulation du potentiel d'action antidromique (flèche) par un potentiel d'action spontané.

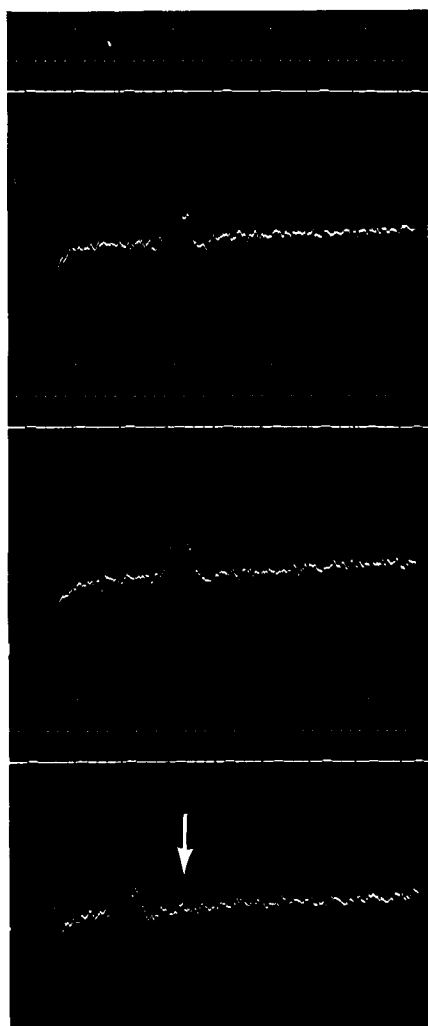
Fig. b1, b2 :

réponses atypiques : les latences ne sont pas constantes.

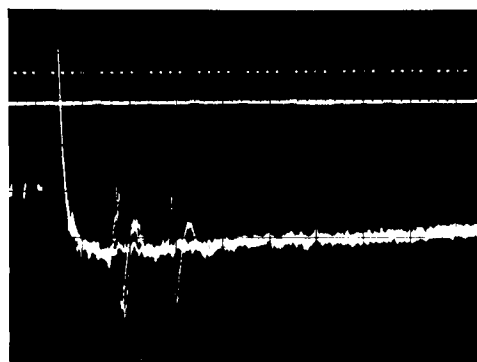
Chaque enregistrement correspond à la superposition de trois clichés.

Fig. c : réponse atypique : obtention de 2 potentiels d'action en réponse à un seul stimulus.

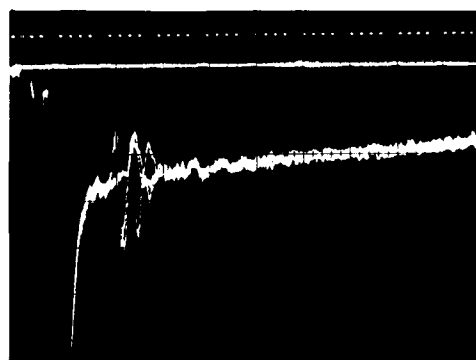




a

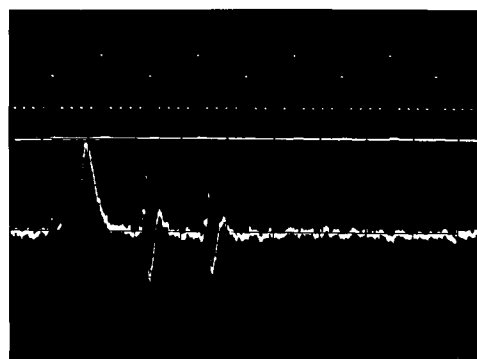


b₁



b₂

┐ 0,2 mV
5 msec



c



Il est à remarquer que, de toutes les unités identifiées antidromiquement, 54 % ne présentent pas d'activité spontanée durant l'enregistrement. Le test de collision ne peut pas leur être appliqué. Mais ces neurones satisfont les autres critères. CROSS et coll. (1969) rapportent que 75 % des neurones du noyau paraventriculaire, activés antidromiquement par stimulation du lobe nerveux de l'hypophyse, ne sont pas actifs spontanément au moment de leur approche par la microélectrode d'enregistrement. Dans le cas des neurones des aires hypothalamique antérieure et pré-optique médiane, 31 % des cellules identifiées antidromiquement sont «silencieuses» lors de l'enregistrement (DYER et CROSS, 1972).

La forme particulière du potentiel d'action antidromique correspond à l'invasion successive du cône d'émergence puis de l'ensemble soma-dendrites du neurone par l'influx stimulant (BISHOP, BURKE et DAVIS, 1962). La première phase positive du potentiel d'action représente l'activité électrique au niveau du segment intermédiaire tandis que la phase tardive correspond au potentiel somato-dendritique. Le potentiel d'action venant de l'axone atteint une région critique pour sa propagation : c'est la jonction du segment intermédiaire avec le soma. A ce niveau, la surface du segment excitant est plus petite que celle du segment à exciter. Cette zone constitue donc un point faible pour la propagation de l'activité antidromique. Ceci explique qu'on puisse observer un potentiel du segment intermédiaire à latence fixe sur lequel se greffe le potentiel somato-dendritique à latence variable (fig. 23). Une telle dissociation du potentiel d'action antidromique est donc due à une différence dans l'excitabilité entre ces deux parties du neurone : le segment initial de l'axone et la partie somato-dendritique (ECCLES, 1964 ; KOIZUMI et YAMASHITA, 1972).

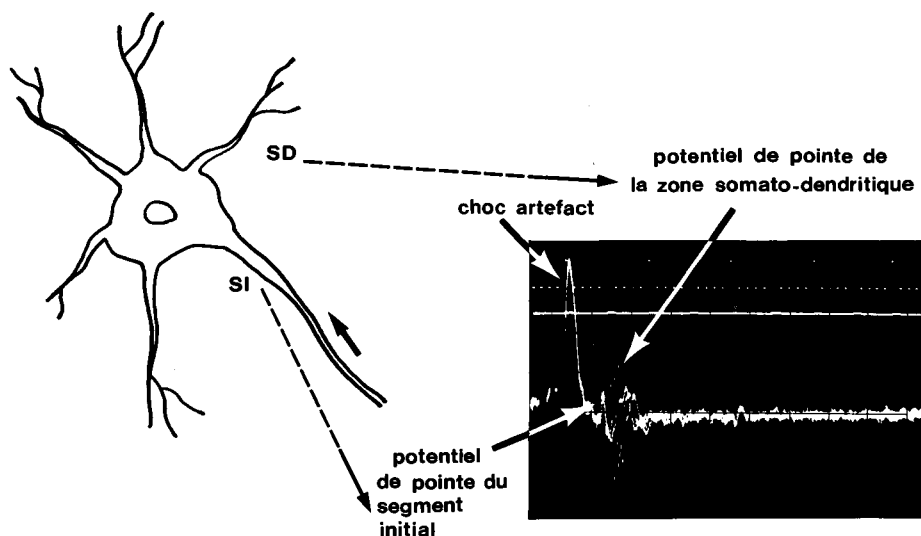


Fig. 23 : Réponse antidromique à la stimulation de l'éminence médiane. L'enregistrement correspond à la superposition de trois clichés.

Une latence constante et la possibilité de répondre à des fréquences de stimulation élevées ont toujours été utilisées comme principaux critères pour identifier les corps cellulaires des neurones du système hypothalamo-neurohypophysaire (ISHIKAWA et coll. 1966 ; YAGI et coll. 1966 ; DYBALL et KOIZUMI, 1969 ; KELLY et DREIFUSS, 1970 ; NOVIN-SUNDSTEN et CROSS, 1970 ; YAMASHITA et coll., 1970 ; BARKER et coll., 1971 ; DYBALL, 1971 ; DYBALL et DYER, 1971 ; DREIFUSS et KELLY, 1972 ; KOIZUMI et YAMASHITA, 1972 ; LINCOLN et WAKERLEY, 1972). Nos réponses observées (planche II, fig. e et planche III, fig. a) satisfont également ces critères et les valeurs de latence obtenues (3 à 17 msec) sont comparables à celles rapportées chez le rat (2,5 à 20 msec) par HARRIS et coll. (1971) et chez la ratte (1,1 à 12,3 msec) par SAWAKI et YAGI (1973) pour des neurones tubéro-infundibulaires. Une telle variation de la latence de ces potentiels peut refléter des valeurs très différentes de la vitesse de conduction des fibres correspondantes. Ceci peut être attribué à la présence de fibres nerveuses fonctionnellement distinctes dans le tractus tubéro-infundibulaire.

Ces critères cependant, sont seulement deux des conditions nécessaires pour que la réponse observée soit considérée comme antidromique. Un stimulus conditionnant juste au-dessus du seuil n'est pas suivie par la facilitation de la génération d'une impulsion par le stimulus test (planche III, fig. c1, c2, c3). Il est donc vraisemblable que les réponses observées ne correspondent pas à une activation des neurones à travers des synapses excitatrices.

L'abolition des potentiels évoqués indique une cancellation des impulsions antidromiques par collision avec des potentiels d'action orthodromiques. Il est, par conséquent, probable que les impulsions induites représentent une invasion antidromique des neurones tubéro-infundibulaires par des potentiels primitivement évoqués dans l'éminence médiane.

Tous les neurones dont l'activation par stimulation de l'éminence médiane répondra aux critères d'une réponse antidromique seront considérés comme faisant partie de la voie finale commune du système hypothalamo-adénohypophysaire. Cette méthode de l'activation antidromique a déjà été utilisée pour classer des unités dans certaines parties de l'hypothalamus. Ainsi, par application de stimuli appropriés à la neurohypophyse, des unités ont été identifiées dans les noyaux paraventriculaire (DYBALL et DYER, 1971 ; DYBALL et KOIZUMI, 1969 ; MOSS et coll., 1971) et supra-optique (DYBALL et KOIZUMI, 1969 ; MOSS et coll. 1971 ; YAGI et coll., 1966). La stimulation de la région noyaux arqué-ventro-médian (DYER et CROSS, 1972) a permis d'établir une relation directe entre les neurones de la région pré-optique et une aire connue pour être impliquée dans la libération des hormones gonadotropes à partir de l'adénohypophyse. POULAIN et PARTOUCHE (1973) ont précisé que la région pré-optique contenait des neurones dont les axones se rendaient directement

à l'éminence médiane, sans faire relais synaptique au niveau du noyau arqué. De même, la technique de stimulation de l'éminence médiane permet d'identifier les corps cellulaires de neurones tubéro-infundibulaires (HARRIS et coll., 1971 ; SAWAKI et YAGI, 1973).

E - RÉSULTATS EN MICROÉLECTROPHORESE

1) Effet du courant

L'observation des effets du courant a été faite à partir de canaux d'une microélectrode multiple contenant une solution de NaCl 2M.

La plupart des cellules testées peuvent être excitées par un courant entrant (pointe de microélectrode négative) et inversement, elles peuvent être inhibées par un courant sortant (pointe positive) (KRNJEVIC et PHILLIS, 1963). L'effet est le mieux observé quand la cellule a une décharge spontanée, et se trouve donc déjà dans un état excitable. Cet effet n'est pas surprenant puisque le courant entrant tendra à dépolariser les zones les plus proches du neurone, ceci pouvant être suffisant pour déclencher des potentiels d'action. L'effet est le plus souvent immédiat, il se termine également instantanément (planche V, fig. a).

En raison de ces actions, le courant servant à l'éjection d'une substance sera neutralisé par un courant d'intensité égale et de polarité opposée à travers un canal NaCl 2M de la microélectrode triple.

Les effets du courant dépendent : - de l'amplitude du courant

- de la taille du neurone étudié

- de la distance à laquelle les potentiels d'action sont enregistrés.

En raison de ce dernier facteur, un courant dépolarisant de quelques nano-ampères, amplitude suffisante pour déclencher un effet, servira de test dans le cas où une cellule ne répondra pas à l'action d'une substance éjectée par microélectrophorèse dans son milieu extracellulaire.

Il ne sera pas tenu compte des cellules ne répondant pas à l'action d'une «drogue» ni à celle d'un courant de quelques nano-ampères négatifs. Par contre, une cellule répondant à un effet du courant mais ne répondant pas à l'action d'une substance sera considérée comme ayant été réellement soumise à l'action de cette «drogue», (planche V, fig. b et c).

Planche V

Fig. a : Effets du courant sur l'activité unitaire spontanée d'une cellule de la partie dorsale du noyau arqué.

- neurone excité par 10nA- puis 5nA-
- neurone inhibé par 10nA⁺

Fig. b : Effets du glutamate (35nA⁺) et d'un courant 10nA- sur une cellule du noyau ventro-médian ayant une faible activité spontanée.

- activation peu marquée par le glutamate
- activation plus nette par le courant

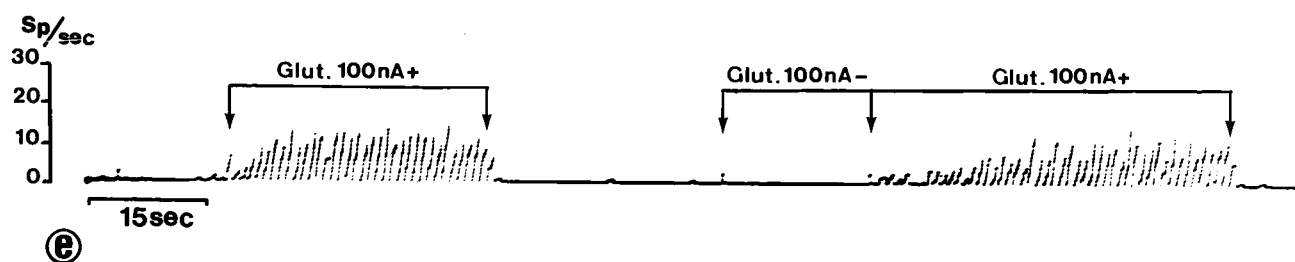
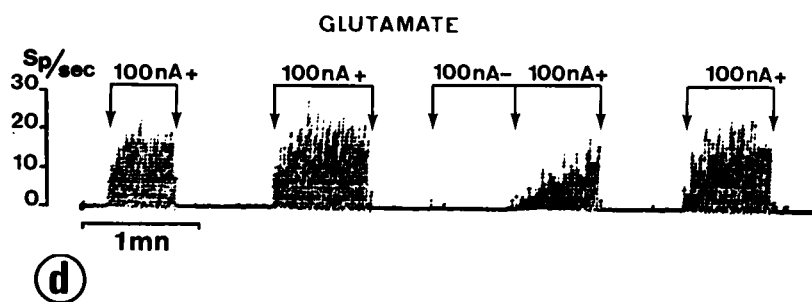
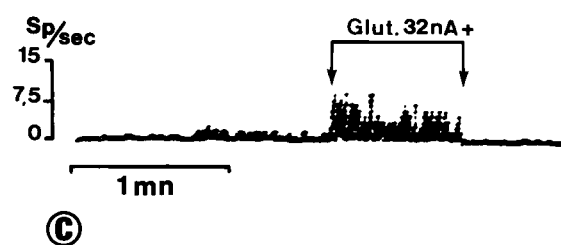
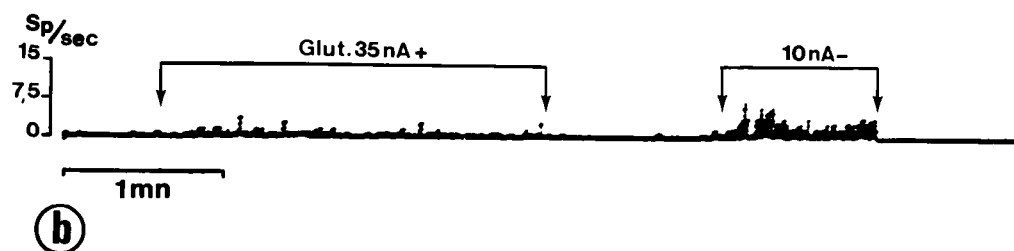
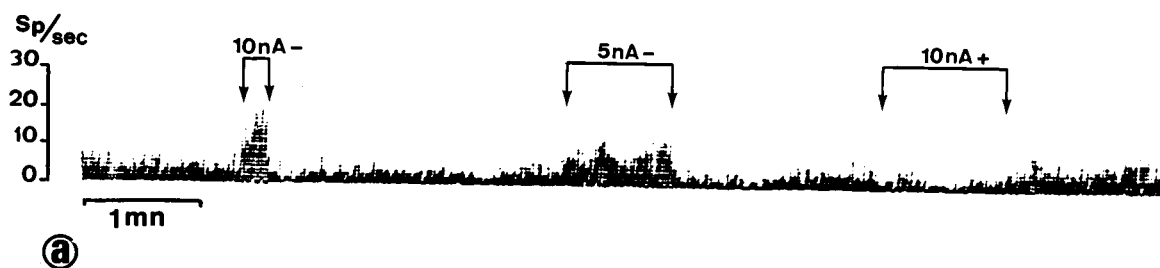
Fig. c : Effets du glutamate (32nA⁺) obtenus sur une autre cellule également à faible activité spontanée au cours de la même descente, à l'aide de la même micro-électrode.

Fig. d et e :

Effets du glutamate sur deux cellules de l'hypothalamus médio-basal.

- effets répétés du glutamate
- inefficacité d'un courant de 100 nA- (glutamate)
- apparition et disparition de l'effet très rapides.





2) Effets du L-glutamate sur les neurones de l'hypothalamus médio-basal

- nombre et localisation des neurones testés

Des neurones des noyaux dorso-médian, ventro-médian, pré-mamillaire et arqué ont été soumis à l'action du glutamate ainsi que des neurones dont la localisation ne correspondait à une population cellulaire définie. La plupart de ces cellules (59/79 soit 76 %) sont activées par le glutamate ; une seule cellule a eu son activité inhibée par cette substance, le reste n'étant pas influencé (fig. 24).

Localisation	Nombre de neurones testés	cellules activées par le glutamate	% correspondant
dorso-médian	10	9	90 %
ventro-médian	22	14	63 %
pré-mamillaire	4	2	
infundibulaire	11	9	81 %
autres localisations dans l'hypothalamus médio-basal	32	25	78 %

Tableau 7 : indiquant le nombre de neurones testés, de neurones activés par le glutamate et le pourcentage correspondant.

- caractéristiques des effets du glutamate

^{1/} le glutamate libéré dans le milieu extra cellulaire par microélectrophorèse active, à la fois les neurones sans activité spontanée et ceux préalablement actifs. Le nombre d'impulsions par unités de temps est pris comme critère pour l'excitation.

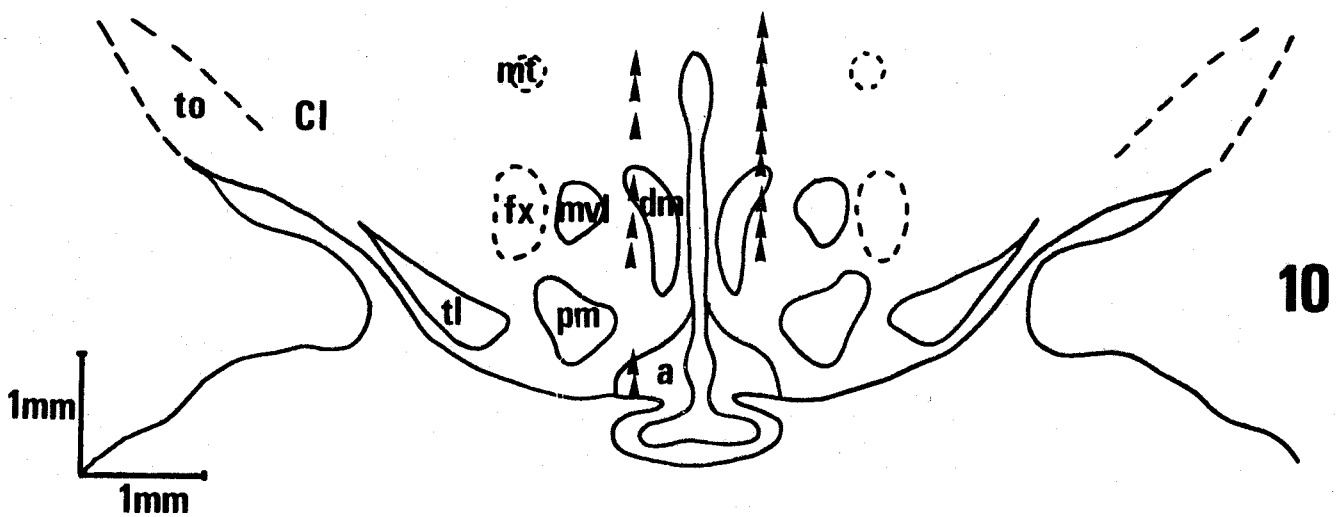
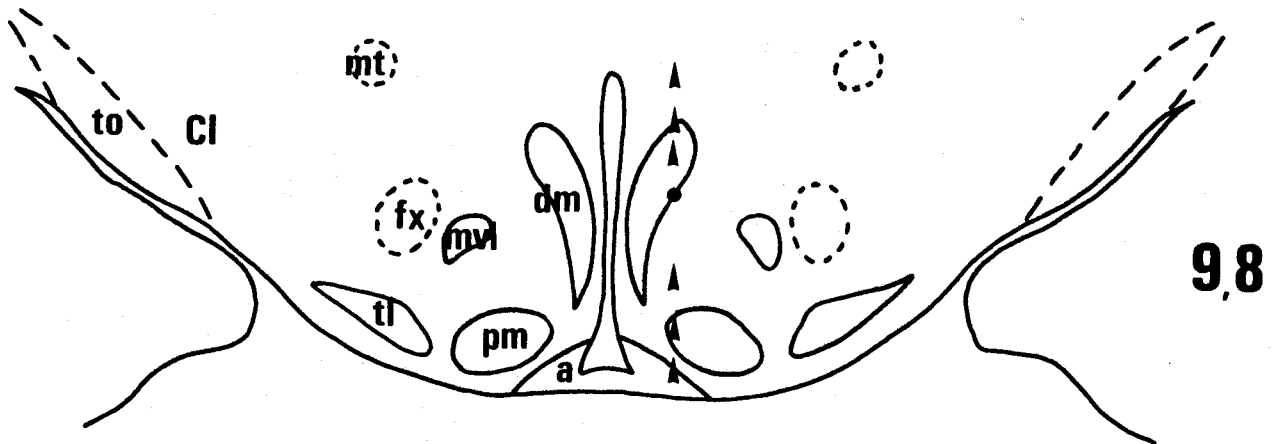
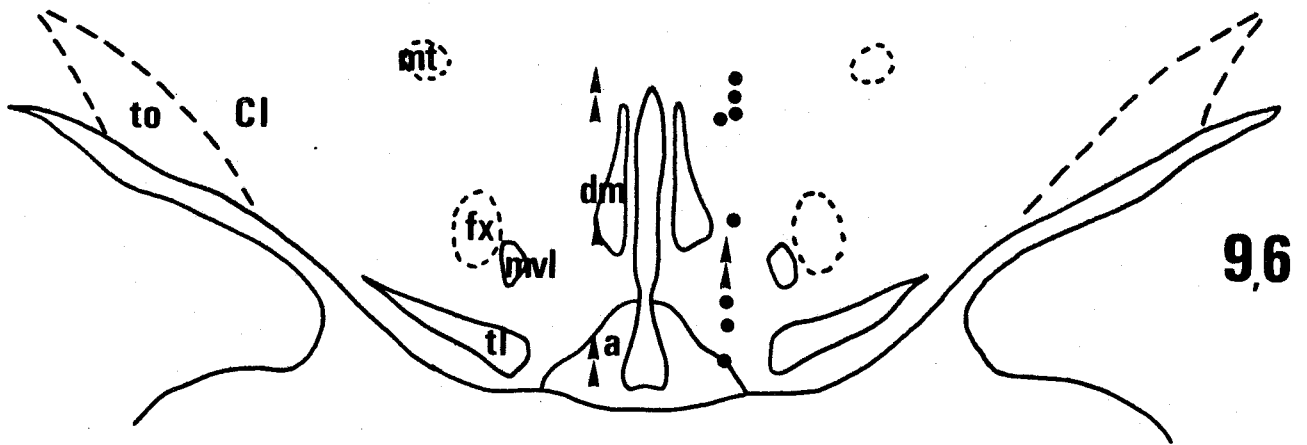
L'apparition et la disparition de l'effet du glutamate sont rapides : l'activation commence en moins de une seconde après le début de la microélectrophorèse ; elle cesse en des durées similaires après l'arrêt de l'éjection de la substance.

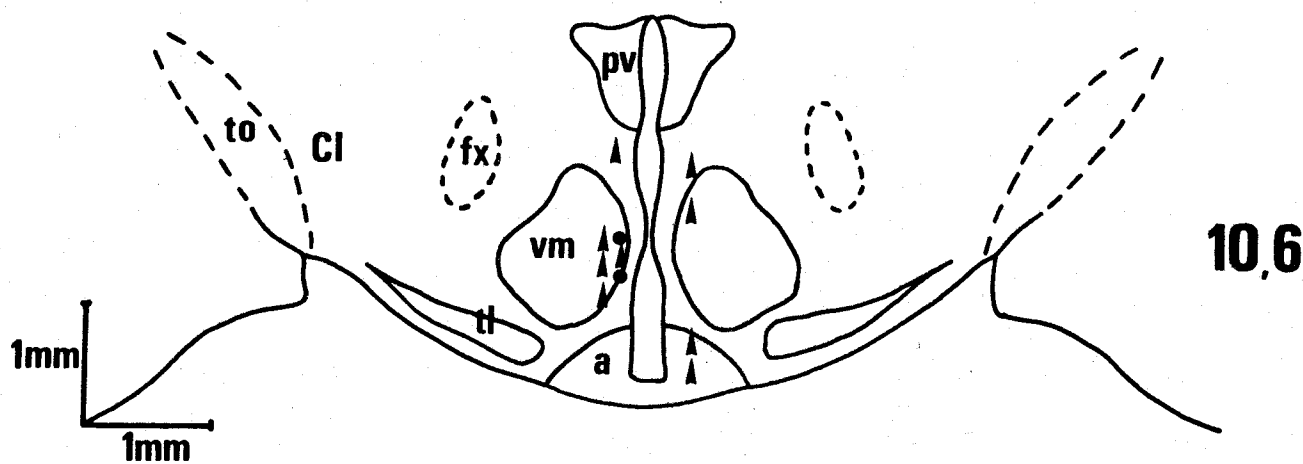
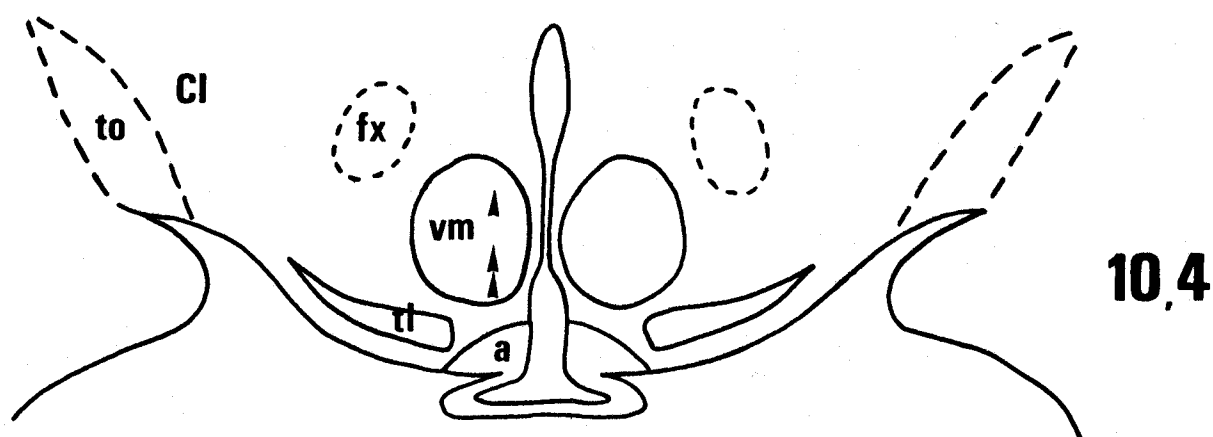
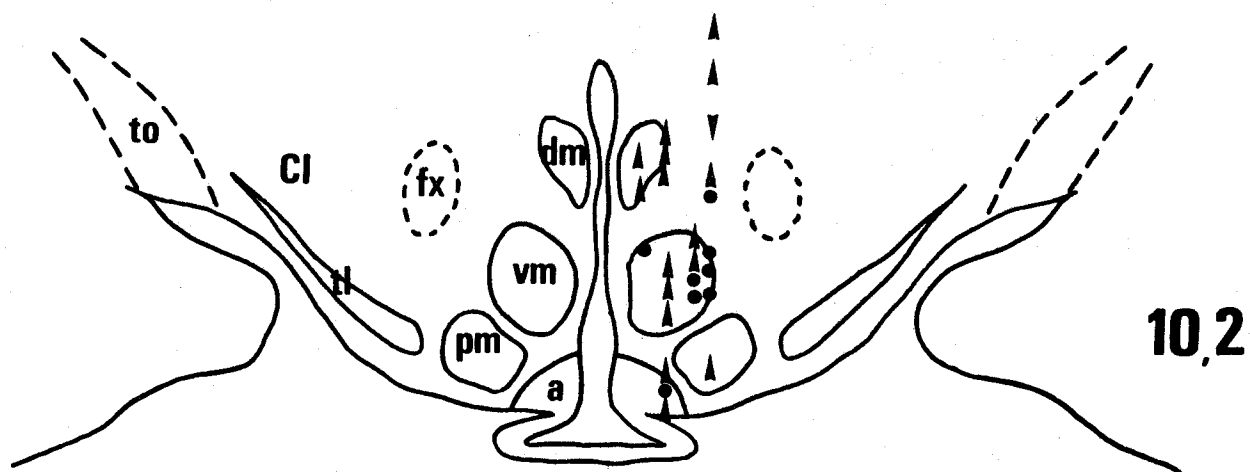
Figure 24

Schémas de différentes coupes frontales de l'hypothalamus de cobaye (d'après l'atlas stéréotaxique de POULAIN), indiquant la localisation des neurones soumis à l'action du glutamate. Les triangles correspondent à des cellules activées par le glutamate ; les cercles à des cellules ne répondant pas à l'action de cette substance. La seule réponse inhibitrice obtenue est indiquée par un triangle dont le sommet est dirigé vers le bas.

La localisation de chaque enregistrement est déterminée par calcul des mouvements du micromanipulateur en se référant à la position d'un spot.

a	:	noyau arqué
CI	:	capsule interne
dm	:	noyau dorso-médian
fx	:	fornix
mt	:	faisceau mamillo-thalamique
mvl	:	noyau magnocellulaire ventro-latéral
pm	:	noyau pré-mamillaire
pv	:	noyau paraventriculaire
tl	:	noyau du tuber latéral
to	:	tractus optique
vm	:	noyau ventro-médian.





- 2/ Les neurones «silencieux», activés par le glutamate redeviennent inactifs immédiatement à la fin de l'éjection.
- 3/ La reproductibilité des effets excitateurs d'une dose donnée de glutamate est possible pourvu qu'un intervalle d'au moins 30 secondes soit observé entre les éjections successives et que celles-ci n'excèdent pas une durée de 40 à 50 secondes chacune. Il n'y a donc pas désensibilisation de la cellule vis-à-vis de la substance.
- 4/ Seuls les courants positifs sont capables d'éjecter le glutamate dans le milieu extracellulaire. Un courant d'intensité similaire mais de polarité opposée, bien neutralisé, dans le canal glutamate se révèle inefficace vis-à-vis de la cellule. (planche V, fig. d et e).
- 5/ Dans certaines limites, l'effet du glutamate dépend de la dose éjectée (planche VI, fig. a).
- 6/ Un autre effet du glutamate est parfois observable : c'est le phénomène de blocage partiel par dépolarisation. Après une brutale activation, la fréquence des impulsions diminue, parallèlement l'amplitude des potentiels d'action diminue puis ces impulsions disparaissent tout à fait, (planche VI, fig. b).
- 7/ Le plus souvent, les cellules soumises à l'action du glutamate retrouvent un taux de décharge égal à celui de la cellule avant application de la substance (planche VI, fig. c). Parfois, il y a une dépression de l'activité après arrêt de la microélectrophorèse. Seuls quelques potentiels d'action peuvent encore être déclenchés (planche VI, fig. d).

3) Discussion

En général, le glutamate tend à exciter les cellules nerveuses comme l'ont montré CURTIS et coll. (1960b) sur les motoneurones spinaux, CURTIS et KOIZUMI (1961) sur les cellules de la formation réticulée, CURTIS et DAVIS (1962) sur les cellules du corps géniculé latéral, KRNJEVIC et PHILLIS (1963) sur les neurones du cortex cérébral. Au niveau de l'hypothalamus, cette substance a également un effet excitateur sur les cellules de l'hypothalamus latéral et du noyau ventro-médian (OOMURA et coll. 1969) sur les cellules du noyau paraventriculaire (CROSS et coll. 1971).

En dépit du fait que, selon GALINDO et coll. (1968), l'application électrophorétique du glutamate au niveau du cuneus, entraîne un schéma d'excitation ressemblant de très près à celui qui est produit par un influx sensoriel, l'universalité d'action de cette substance permet difficilement de conclure à une action totale ou partielle du glutamate sur les récepteurs synaptiques.

Planche VI

Fig. a : Effets de doses 25nA^+ et 35nA^+ sur l'activité d'une cellule du noyau arqué.

L'activation est d'autant plus importante que la dose est élevée.

Fig. b : Effets d'une dose (30nA^+) de glutamate sur une cellule du dorso-médian.

Phénomène de blocage partiel par dépolarisation.

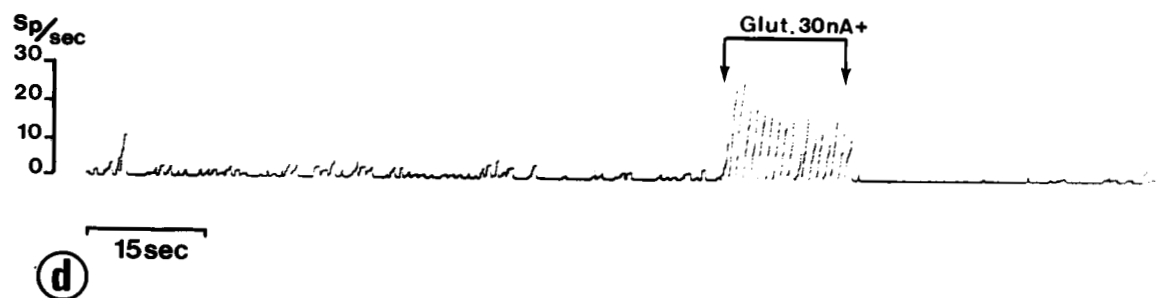
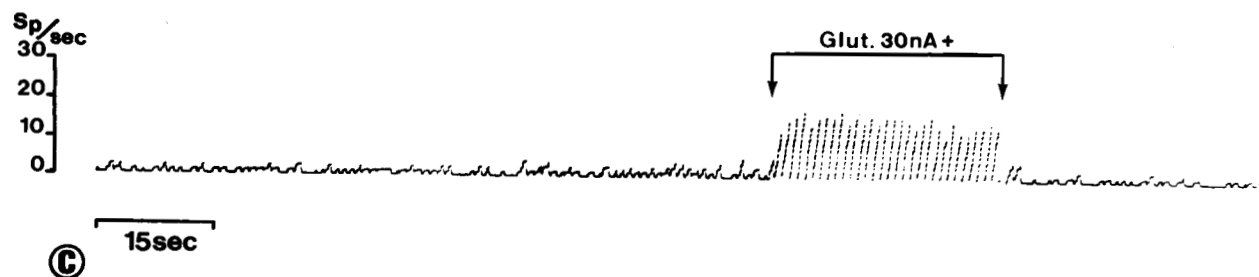
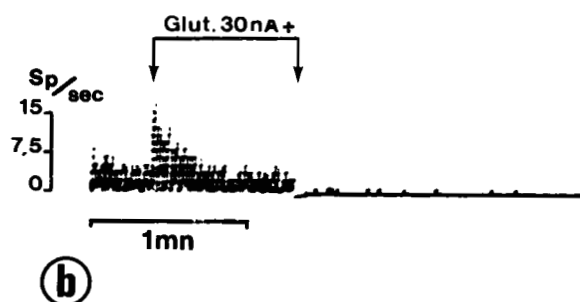
Fig. c : Effets du glutamate 30nA^+ sur une cellule du ventro-médian.

La cellule retrouve son activité spontanée de base dès la fin de l'application du glutamate.

Fig. d : Effets d'une dose identique de glutamate (30nA^+), appliquée avec la même microélectrode sur un neurone du noyau arqué.

La cellule ne retrouve son activité qu'au bout de 30 à 40 secondes après la fin de la microélectrophorèse.





Des expériences électrophysiologiques *in vitro* suggèrent que l'exposition du tissu nerveux au glutamate induit une dépolarisation et une augmentation de la perméabilité des membranes nerveuses au Na^+ (BRADFORD et McILWAIN, 1966 ; HARVEY et McILWAIN, 1968). *In vivo*, le glutamate, introduit dans le milieu extra-cellulaire d'un neurone par iontophorèse stimule la décharge de ce neurone de la façon suivante : il se lierait à une région de la membrane, importante dans le contrôle de la perméabilité, région commune à tous les neurones mais qui n'est pas un récepteur post-synaptique pour une transmission synaptique spécifique. Il en résulterait une augmentation de la perméabilité membranaire sodique dont on sait qu'elle est à l'origine du déclenchement des potentiels d'action. (HODGKIN et KATZ, 1949 ; HODGKIN et HUXLEY, 1952).

PEREZ et OLNEY (1972) ont observé une dégénérescence des neurones du noyau arqué de l'hypothalamus de jeunes souris à la suite d'une administration sous-cutanée de glutamate monosodique. Dans ce cas, les ions glutamate jouent un rôle relativement direct dans la production de ce syndrome neurotoxique, qui représente une exagération du phénomène neuro-excitateur provoquée par cette substance. Au lieu d'une dépolarisation réversible de la membrane nerveuse par une augmentation faible transitoire du glutamate extra-cellulaire, comme cela a lieu dans le cas d'une microélectrophorèse, l'administration sous-cutanée de glutamate, par production d'une soudaine élévation de la concentration extra-cellulaire de cette substance dans la région arquée, peut provoquer une dépolarisation persistante et une augmentation prolongée de la perméabilité des membranes nerveuses. Ceci conduit probablement à une nécrose des neurones impliqués, résultat de la perte de protection normalement fournie par les caractéristiques de perméabilité de la membrane plasmatique du neurone.

Plusieurs études ont indiqué que toutes les cellules nerveuses ne répondent pas au glutamate de la même façon. Les neurones thalamiques peuvent présenter une sensibilité à cette substance forte ou faible (McLENNAN et coll. 1968) tandis que seulement peu d'unités du bulbe olfactif répondent à la «drogue» appliquée iontophorétiquement (VON BAUMGARTEN et coll. 1963). Ainsi il apparaît que les effets excitateurs du glutamate peuvent être tout à fait spécifiques. Ces observations pourraient signifier que certains neurones possèdent, ou non, des récepteurs spécifiques à l'égard du glutamate, peut être synaptiques, en plus de lieux non spécifiques répondant à cette substance.

Dans la région de l'hypothalamus médio-basal, 76 % des neurones testés ont répondu au glutamate; il n'y a pas de différences significatives statistiquement entre les noyaux de cette zone en réponse à cette substance. C'est ainsi que dans le noyau ventro-médian, 50 % des neurones selon OOMURA et coll.(1969) ont leur activité augmentée, notre taux étant

de 63 %. Dans le noyau arqué, c'est 81 % des cellules qui répondent dans le sens d'une activation. Cependant, ces neurones ne semblent pas présenter la même sensibilité vis-à-vis du glutamate. Ceux qui montrent une activité spontanée faible ont leur taux de décharge peu augmenté, l'activation ne commençant pas sitôt l'éjection du glutamate, ou, si ce n'est pas le cas, cette activation ne se poursuit pas durant son temps d'application. (fig. 25)

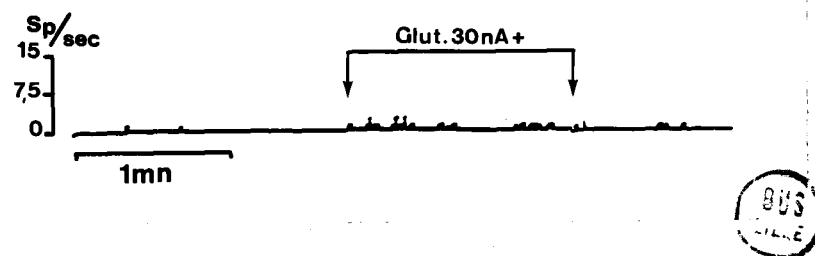


Fig. 25 : Effets du glutamate (30 nA+) sur une cellule du noyau arqué à faible activité spontanée.

En revanche, les neurones du noyau arqué à activité spontanée plus élevée montrent une augmentation de leur taux de décharge plus marquée en réponse au glutamate, caractérisée par le fait que celle-ci débute rapidement, se maintient durant l'éjection de la substance, l'arrêt de la microélectrophorèse étant suivi d'une dépression de l'activité de la cellule pendant environ 30 secondes. (fig. 26)

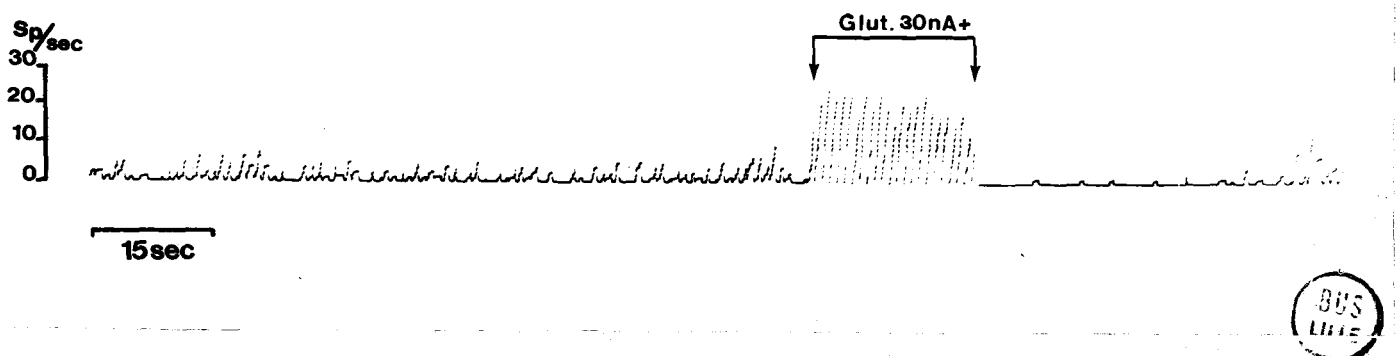


Fig. 26 : Effets d'une dose identique de glutamate (30nA+) sur une cellule du noyau arqué à activité spontanée plus élevée au cours de la même descente à l'aide de la même microélectrode.

Selon PEREZ et OLNEY (1972), le noyau arqué présente vis-à-vis du glutamate une position privilégiée. Cette région de l'hypothalamus accumule de façon préférentielle cette substance administrée de façon sous-cutanée à de jeunes souris puisque l'on peut y observer un syndrome neurotoxique, absent dans un noyau hypothalamique voisin : le noyau ventromédian. Cette observation s'expliquerait de la façon suivante : LAJTHA et coll. (1959), utilisant du glutamate radio-actif, suggère que cette substance pénètre dans le cerveau adulte à partir du sang mais qu'aucune augmentation du taux de glutamate dans le cerveau ne peut être détectée parce que cette «drogue» retourne immédiatement dans le sang ou est métabolisée. Chez l'adulte et même dans une large mesure chez la jeune souris, la plupart du cerveau est apparemment protégé par un mécanisme maintenant un taux constant de glutamate à ce niveau. PEREZ et OLNEY (1972) suggèrent, d'après leurs données expérimentales, que le noyau arqué des jeunes souris se situe hors de cette protection. OLNEY (1969b) rapporte que des souris traitées durant les premières semaines avec du glutamate monosodique montrent une obésité et des anomalies neuro-endocriniennes au stade adulte. Ces faits peuvent faire penser à une intervention du noyau arqué dans la régulation neuro-endocrinienne en rapport avec le glutamate. Selon STEINER et RUF (1966), il est concevable que certains amino-acides tels que le L-glutamate et le GABA régulent les réponses nerveuses et ainsi fournissent l'activité électrique de base pour une action synaptique de «vrais» neurotransmetteurs.

DISCUSSION GÉNÉRALE

A - PROBLEMES DE L'ECHANTILLON CELLULAIRE

La technique de l'enregistrement unitaire par microélectrodes, appliquée à l'étude de neurones hypothalamiques présentent de sérieuses limites :

- la taille de l'échantillon cellulaire étudié est nécessairement très petite comparée à la population totale des cellules en relation avec une fonction donnée.
- en outre, il est plus facile d'enregistrer des potentiels d'action de grande amplitude ayant pour origine les grandes cellules.

Aussi, un échantillon donné de neurones, collecté au moyen de l'enregistrement par microélectrodes contiendra une beaucoup plus importante proportion de grands neurones que ne contient réellement l'aire hypothalamique étudiée.

A ces limites, s'ajoutent deux faits propres au noyau arqué. L'étude de l'activité unitaire spontanée des neurones de ce noyau a en effet, montré une fréquence moyenne d'activité peu élevée de l'ensemble cellulaire, liée à un pourcentage important (50 à 60 %) de cellules possédant une faible activité spontanée. Il est d'ailleurs souvent arrivé d'atteindre, avec une électrode simple d'enregistrement, le noyau arqué, sans pour autant obtenir une seule activité unitaire. Les possibilités sont différentes pour d'autres aires du système nerveux central puisque LINCOLN (1967) rapporte qu'il a pu enregistrer six à huit unités par millimètre de trajet des microélectrodes dans les noyaux thalamiques, deux à cinq dans les aires hypothalamiques antérieures et latérales, et légèrement plus dans l'aire septale latérale. La technique de stimulation de l'éminence médiane a montré que, de toutes les cellules du noyau arqué activées antidromiquement, plus de 50 % ne présentent pas d'activité spontanée au moment de leur approche par la microélectrode. De plus, les neurones du noyau infundibulaire font partie du système parvocellulaire de l'hypothalamus et ont une faible taille (environ 15 μ), ce qui rend d'autant plus difficile la captation de leur activité unitaire.

Il apparaît donc nécessaire d'élargir le plus possible l'échantillon cellulaire de cette région hypothalamique afin qu'il en soit un reflet assez exact pour une analyse en relation avec une fonction donnée.

De ce point de vue, l'apport de la technique de stimulation de l'éminence médiane est important puisqu'elle permet de détecter des neurones «silencieux». Le glutamate en dehors

de son intérêt propre possible vis-à-vis du noyau arqué, permet également d'élargir l'échantillon cellulaire de la zone étudiée en raison de ses propriétés excitatrices. Il est en effet possible, dans la région infundibulaire, d'éjecter continuellement, par microélectrophorèse, du glutamate afin de mettre en route des cellules soit inactives spontanément, soit à très faible activité spontanée. De plus, cette «drogue» permettra de stimuler de telles cellules en vue de l'action, également par microélectrophorèse, de substances susceptibles de posséder des effets inhibiteurs.

Si les limites de l'enregistrement unitaire demeurent du fait même de la technique utilisée, il est toutefois possible d'obtenir un échantillon cellulaire, reflet plus exact de la zone étudiée, en couplant les techniques de microélectrophorèse (glutamate) et de stimulation de l'éminence médiane.

B - NEURONES TUBÉRO-INFUNDIBULAIRES DOPAMINERGIQUES **ET NEURONES ACTIVÉS ANTIDROMIQUEMENT**

Des méthodes histochimiques de fluorescence indiquent que la couche externe de l'éminence médiane contient un réseau dense de terminaisons nerveuses renfermant des catécholamines : noradrénaline et dopamine. (CARLSSON et coll. 1962 ; FUXE 1964 ; FUXE et HOKFELT, 1967 - 1969 ; AKMAYEV 1969 ; BJORKLUND et coll. 1970).

Le groupe d'axones noradrénergiques a pour origine des aires situées en dehors de l'hypothalamus médio-basal. Par contre, le groupe d'axones dopaminergiques a pour origine les corps cellulaires de neurones situés dans les noyaux arqué et ventro-médian (MARTINEZ, 1960 ; CARLSSON et coll. 1965-1966 ; BJORKLUND et coll. 1970). FUXE et HOKFELT (1966) estiment que 10 à 20 % des neurones du noyau infundibulaire sont de type dopaminergique. Ces résultats font donc apparaître que le tractus tubéro-infundibulaire dopaminergique est formé de certaines cellules nerveuses des noyaux arqué et ventro-médian, envoyant leurs axones vers l'éminence médiane.

La présence de terminaisons axoniques contenant des «releasing factors» ou facteurs hypophysiotropes au niveau de l'éminence médiane a été bien établie (McCANN et DHARIWAL, 1966 ; SZENTAGOTHAÏ et coll. 1968 ; CLEMENTI et coll. 1970).

La localisation identique de terminaisons synaptiques renfermant de la dopamine et de celles contenant des «releasing factors» a conduit à penser que les neu-

rones tubéro-infundibulaires dopaminergiques sont impliqués dans le contrôle de la fonction anté-hypophysaire, le plus probablement par une influence sur la libération des facteurs hypophysiotropes au niveau de l'éminence médiane. Cependant, des résultats obtenus avec des techniques variées, à l'appui de cette hypothèse, il ressort un désaccord au sujet du type facilitateur ou inhibiteur de cette influence.

SCHNEIDER et McCANN (1969) estiment vraisemblable que la dopamine est le transmetteur synaptique pour la libération de LRF au niveau de l'éminence médiane. Des injections de α -méthyl-dopa dans la région tubérale médio-basale bloquent l'ovulation chez la ratte (KORDON 1971). Les changements dans l'intensité de fluorescence des corps cellulaires de neurones dopaminergiques tubéro-infundibulaires, détectés par microfluorimétrie à la suite de la castration (BARRY, 1968a, 1969d, ; BARRY et LÉONARDELLI 1968 ; HERMAND et LÉONARDELLI, 1969 ; HYPPA, 1969), durant le cycle œstral (LÉONARDELLI, 1968b) sont interprétés comme indiquant une action facilitatrice de ces neurones sur la libération des hormones gonadotropes.

Par contre, FUXE et collaborateurs concluent à partir de recherches histochimiques que l'action des neurones dopaminergiques sur la sécrétion gonadotrope est probablement inhibitrice (FUXE, HOKFELT et NILSSON, 1967, 1969a, b).

L'interprétation d'expériences avec injection de dopamine est difficile car l'amine injectée peut reproduire réellement un mécanisme physiologique ou exercer une action pharmacologique. Par ailleurs, la plupart des résultats par la technique de microscopie en fluorescence serapportent à des changements observés après plusieurs heures, voire plusieurs jours. Il est évident que durant ce temps, l'état des systèmes de contrôle peut varier.

La technique de stimulation de l'éminence médiane permet l'identification électrophysiologique de neurones tubéro-infundibulaires, cellules susceptibles de modifier le contrôle par les facteurs hypophysiotropes des fonctions adénohypophysaires. Les techniques d'enregistrement unitaire et de microélectrophorèse offrent respectivement, la possibilité d'une analyse fine d'un phénomène à travers des séquences d'enregistrement de signaux électriques, et celle d'une action directe de substances sur une population cellulaire localisée de façon précise.

CONCLUSION

La technique d'enregistrement de l'activité unitaire des neurones du noyau arqué a permis de mettre en évidence :

- une fréquence moyenne faible de l'ensemble cellulaire que représente le noyau infundibulaire, liée à un pourcentage élevé de cellules ayant une activité spontanée lente.
- un aspect diversifié de la structure temporelle de l'activité unitaire des neurones de ce noyau.

La technique de stimulation de l'éminence médiane a permis de déterminer que le tractus tubéro-infundibulaire n'est pas uniquement formé de cellules du noyau arqué.

La microélectrophorèse a permis de suggérer que les cellules du noyau infundibulaire présentent vis-à-vis du glutamate une sensibilité forte ou faible.

La technique d'enregistrement unitaire au niveau de l'hypothalamus médio-basal, couplée à celles de stimulation de l'éminence médiane et de microélectrophorèse ouvre des perspectives nouvelles pour aborder le problème du contrôle hypothalamique de l'adénohypophyse et plus particulièrement celui concernant les fonctions gonadotropes pré-hypophysaires.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS D.B. - 1968

The activity of single cells in the midbrain and hypothalamus of the cat during affective defense behavior.

Arch. ital. Biol. 406, p. 243-269

AKMAYEV I.G. - 1969

Morphological aspects of the hypothalamic hypophyseal system

I - Fibers terminating in the neurohypophysis of mammals.

Z. Zellforsch. mikrok. anat. 96, p. 609-624

ALEKSANYAN Z.A. - SKVARIL J. - BURES J. - 1972

Stability of firing patterns of hypothalamic neurons subjected to direct electrical or chemical stimulation.

Experimental brain research, 15, p. 29

ATTRAMADAL A. - 1970

Cellular localization of ^3H -oestradiol in the hypothalamus.

Z. Zellforsch. 104, p. 572-581

BARKER J.L. - CRAYTON J.W. and NICOLL R.A. - 1971

Antidromic and orthodromic responses of paraventricular and supraoptic neurosecretory cells.

Brain Research, 33, p. 353-366

BARRACLOUGH C.A. and CROSS B.A. - 1963

Unit activity in the hypothalamus of the cyclic female rat : effect of genital stimuli and progesterone

J. Endocrinol. 26, n° 3, p. 339-359

BARRY J. - 1967 a

Morphologie et structure de l'infundibulum chez les mammifères.

Rev. Europ. Endocrinol., 4, p. 267-304

BARRY J. - 1968 a

Étude en fluorescence UV des monoamines tubéro-infundibulaires chez le cobaye mâle normal ou castré après injections de réserpine ou de α -méthyl m-tyrosine.

C.R. Soc. Biol., 162, p. 449-452

BARRY J. - 1969 d

Recherches sur le rôle des monoamines infundibulaires dans le contrôle de la sécrétion gonadotrope chez le cobaye et la souris.

5ème Symposium international sur la neurosécrétion - KIEL -

BARRY J. et LÉONARDELLI J. - 1968

Étude comparée des neurones et des fibres monoaminergiques de la région tubéro-infundibulaire chez le cobaye mâle normal ou castré.

C.R. Acad. Sci. (Paris), 265, p. 1141-1144

BISHOP P.O. - BURKE W. and DAVIS R. - 1962

The identification of single units in central visual pathways.

J. Physiol. (Lond.) 162, p. 409-431

BISHOP P.O. - LEVICK W.R. and WILLIAMS W.O. - 1964

Statistical analysis of the dark discharge of lateral geniculate neurones.

J. of Physiol. 170, p. 598-612

BJORKLUND A. - FALCK B. - HROMEK F. - OWMAN C. and WEST K.A. - 1970

Identification and terminal distribution of the tubero-hypophyseal monoamine fibre systems in the rat by means of stereotaxic and microspectrofluorimetric techniques.

Brain research, 17, p. 1-23

BOGDANOVE E.M. - 1954

Location of hypothalamic lesions affecting the adenohypophysis.

Anat. Rec., 118, p. 282-283

BRADFORD H. and McILWAIN H. - 1966

Ionic basis for the depolarization of cerebral tissues by excitatory acidic amino.

J. Neurochem. 13, p. 1163-1177

BRAWER J.R. - 1971

The role of the arcuate nucleus in the brain pituitary gonad axis

The Journal of Comparative Neurology, 143, p. 411

CARLSSON A. - DAHLSTROM A. - FUXE K. and HILLARP N.A. - 1965

Failure of reserpine to deplete noradrenaline neurons of α -methyl-noradrenaline formed from α -methyl-dopa.

Acta pharmac. tox., 22, p. 270-276

CARLSSON A. - FALCK B. and HILLARP N.A. - 1962

Cellular localization of brain monoamines.

Acta physiol. scand. 56, suppl. 196, p. 1-28

CARLSSON A. - LINDQVIST M. - FUXE K. and HOKFELT T. - 1966

Histochemical and biochemical effects of diaethyldithiocarbamate on tissue catecholamines

J. Pharm. Pharmac. 18, p. 60-62

CASTILLIO J. DEL and KATZ B. - 1955

On the localization of acetylcholine receptors
J. Physiol. 128, p. 157-181

CLEMENTI F. - CECCARELLI B. - CERATI E. - DEMONTE M.L. - FELICI M. - MOTTA M. and PECILE A. - 1970

Subcellular localization of neurotransmitters and releasing factors in the rat median eminence.
J. Endocr., 48, p. 205-213

CROSS B.A. and GREEN J.D. - 1959

Activity of single neurones in the hypothalamus : effect of osmotic and other stimuli.
J. Physiol., 148, p. 554-569

CROSS B.A. - MOSS R.L. and URBAN I. - 1971

Effect of iontophoretic application of acetylcholine and noradrenaline to antidromically identified paraventricular neurones.
The Journal of Physiol. 214, 28 pages

CROSS B.A. - NOVIN D. and SUNDSTEN J.W. - 1969

Antidromic activation of neurones in the paraventricular nucleus by stimulation in the neural lobe of the pituitary.
J. Physiol. 203, 68 pages

CROSS B.A. and SILVER I.A. - 1963

Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnea.
Exp. Neurol., 7, p. 375-393

CROSS B.A. and SILVER I.A. - 1966

Electrophysiological studies on the hypothalamus.
Br. med. Bull., 22, p. 254-260

CURTIS D.R. and DAVIS R. - 1962

Pharmacological studies upon neurones of the lateral geniculate nucleus of the cat.
Brit. J. Pharmacol. 18, p. 217-246

CURTIS D.R. and ECCLES R.M. - 1958

The excitation of Renshaw cells by pharmacological agents applied electrophoretically.
J. Physiol. 141, p. 435-445

CURTIS D.R. and ECCLES R.M. - 1958

The effect of diffusional barriers upon the pharmacology of cells within the central nervous system.

J. Physiol., 141, p. 446-463

CURTIS D.R. and KOIZUMI K. - 1961

Chemical transmitter substances in brain stem of cat.

J. Neurophysiol., 24, p. 80-90

CURTIS D.R. - PHILLIS J.W. and WATKINS J.C. - 1960 b

The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids.

J. Physiol., 150, p. 656-682

CURTIS D.R. and WATKINS J.C. - 1960

The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids.

J. Neurochim., 6, p. 117-141

DAFNY N. - BENTAL E. and FELDMAN S. - 1965

Effect of sensory stimuli on single unit activity in the posterior hypothalamus

Electroencephalogr. clin. neurophysiol. 19, n-3, p. 256-63

DAFNY N. and GILMAN S. - 1973

Characterization of spontaneous unit activity in hypothalamus and reticular formation recorded with semi-microelectrodes.

Brain research., 59, p. 243-255

DEY F.L. - 1943

Genital changes in female guinea pigs resulting from destruction of the median eminence

Anat. Rec. 87, p. 85-90

DREIFUSS J.J. and KELLY J.S. - 1972

The activity of identified supraoptic neurones and their response to acetylcholine applied by iontophoresis.

J. of Physiol., 220, p. 105

DYBALL R.E.J. - 1971

Oxytocin and ADH secretion in relation to electrical activity in antidromically identified supraoptic and paraventricular units.

J. Physiol. 214, p. 245-256

DYBALL R.E.J. and DYER R.G. - 1971

Plasma oxytocin concentration and paraventricular neurone activity on rats with diencephalic islands and intact brains.

J. Physiol. 216, p. 227-235

DYBALL R.E.J. and KOIZUMI K. - 1969

Electrical activity in the supraoptic and paraventricular nuclei associated with neurohypophysial hormone release.

J. Physiol. 201, p. 711-722

DYER R.G. and CROSS B.A. - 1972

Antidromic identification of units in the preoptic and anterior hypothalamic areas projecting directly to the ventro-medial and arcuate nuclei.

Brain research, 43, p. 254-

ECCLES J.C. - 1964

The physiology of synapses.

Berlin, Springer. Verlag., p. 101-113

FLERKO B. und BARDOS V. - 1959

Zwei verschiedene effekte experimenteller läsionen des hypothalamus auf die gonaden.

Acta Neuroveg. 20, p. 248-262

FUXE K. - 1964

Cellular localization of monoamines in the median eminence and the infundibular stem of some mammals.

Z. Zellforsch. mikrok. anat. 61, p. 710-724

FUXE K. and HOKFELT T. - 1966

Further evidence for the existence of tubero-infundibular dopamine neurons.

Acta physiol. scand. 66, p. 245-246

FUXE K. and HOKFELT T. - 1967

The influence of central catecholamine neurons on the hormone secretion from the anterior and posterior pituitary.

In Neurosecretion - Ed. F. STUTINSKY, New York - Springer Verlag., p. 165-177

FUXE K. and HOKFELT T. - 1969

Catecholamines in the hypothalamus and the pituitary gland.

IN Frontiers in Neuroendocrinology, p. 47-96, Ed. W.F. GANONG and L. MARTINI ; New York, Oxford University Press.

FUXE K. - HOKFELT T. and NILSSON O. - 1967

Activity changes in the tubero-infundibular dopamine neurons of the rat during various states of the reproduction cycle.

Life Sci., 6, p. 2057-2061

FUXE K. - HOKFELT T. and NILSSON O. - 1969a

Castration, sex hormones and tubero-infundibular dopamine neurons.

Neuroendocrinology, 5, p. 107-120

FUXE K. - HOKFELT T. and NILSSON O. - 1969b

Factors involved in the control of the activity of the tubero-infundibular dopamine neurons during pregnancy and lactation.

Neuroendocrinology, 5, p. 257-270

GALINDO A. - KRNJEVIC K. and SCHWARTZ S. - 1968

Patterns of firing in cuneate neurones and some effects of flaxedil.

Exp. Brain res., 5, p. 87-101

GALLO R.V. - JOHNSON J.H. - GOLDMAN B.D. - WHITMOYER D.I. and SAWYER CH. - 1971

Effects of electrochemical stimulation of the ventral hippocampus on hypothalamic electrical activity and pituitary gonadotropin secretion in female rats.

Endocrinology, 89, p. 704-713

GREEN J.D. and HARRIS G.W. - 1947

The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis.

J. Endocrinol. 5, p. 136-146

GRIFFITH - 1966

An analysis of spontaneous impulse activity of units in the striate cortex of unrestrained cats.

J. Physiol., 186, p. 516-534

HARRIS M.C. - MAKARA G.B. and SPYER K.M. - 1971

Electrophysiological identification of neurones of the tubero-infundibular system.

J. Physiol. 218, 86 P - 87 P

HARVEY J. and McILWAIN H. - 1968

Excitatory acidic amino acids and the cation content and sodium flux of isolated tissues from the brain.

Biochem. J. 108, p. 269-274

HERMAND E. et LÉONARDELLI J. - 1969

Action de la castration sur les monoamines infundibulo-tubériennes chez le hamster mâle.

C.R. Soc. Biol. 163, p. 416-417

HODGKIN A.L. and HUXLEY A.F. - 1952

Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axons of *Loligo*.

J. Physiol. 116, p. 449

HODGKIN A.L. and KATZ B. - 1949

The effect of sodium ions on the electrical of giant axon of the squid.

J. Physiol. 108, p. 37

HOLWEG W. und JUNKMAN K. - 1932

Die hormonal-nervöse regulierung der funktion des hypophysenvorderlappus.

Klin. Wschr. 11, p. 321-323

HUBBARD J.I. - 1963

Repetitive stimulation at the mammalian neuromuscular junction, and the mobilization of transmitter.

J. Physiol. 169, p. 641-662

HYPPA M. - 1969

A histochemical study of the primary catecholamines in hypothalamic neurons of the rat in relation to the ontogenetic and sexual differentiation.

Z. Zellforsch. 98, p. 550-560

IFFT J. - 1962

Evidence of gonadotropic activity of the hypothalamic arcuate nucleus in the female rat.

Anat. Rec. 142, p. 1-8

ISHIKAWA T. - KOIZUMI K. - BROOKS C.M. - 1966

Activity of supraoptic nucleus neurons of the hypothalamus.

Neurology, 16, p. 101-106

KAWAKAMI M. and KUBO K. - 1971

Neuro-correlate of limbic-hypothalamo-pituitary gonadal axis in the rat : change in limbic-hypothalamic unit activity induced by vaginal and electrical stimulation.

Neuroendocrinology, 7, p. 65-89

KELLY J.S. - DREIFUSS J.J. - 1970

Antidromic inhibition of identified rat supraoptic neurones.

Brain Research. 22, p. 406-409

KOIZUMI K. and YAMASHITA H. - 1972

Studies of antidromically identified neurosecretory cells of the hypothalamus by intracellular and extracellular recordings.

J. of Physiol. 221, p. 683

KORDON C. - 1971

Blockade of ovulation in the immature rat by local microinjection of α -methyl-dopa into the arcuate region of the hypothalamus.

Neuroendocrinology, 7, p. 202-209

KRNJEVIC K. and PHILLIS J.W. - 1963

Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex.

J. Physiol. 165, p. 274-304

LAJTHA A. - BERL S. and WAELSCH H. - 1959

Amino acid and protein metabolism of the brain. IV - the metabolism of glutamic acid.

J. Neurochem. 3, p. 322-332

LEFRANC G. - 1965

Étude du noyau infundibulaire et de l'éminence médiane du cobaye par la technique de triple imprégnation de Golgi.

C.R. Acad. Sci. 260, p. 4087-4090

LÉONARDELLI J. - 1968b

Modifications des fibres et cellules monoaminergiques de la région infundibulo-tubérienne du cobaye au cours du cycle œstral.

C.R. Soc. Biol. 162, p. 1937-1940

LE ROC'H Ch. et POULAIN P. - 1972

Repérage de neurones profonds par des techniques de micromarquages par colorants.

C.R. Soc. Biol. 166, p. 63-65

LINCOLN D.W. - 1967

Unit activity in the hypothalamus, septum and preoptic area of the rat : characteristics of spontaneous activity and the effect of oestrogen.

J. Endocr. 37, p. 177-189

LINCOLN D.W. and WAKERLEY J.B. - 1972

Accelerated discharge of paraventricular neurosecretory cells correlated with reflex release of oxytocin during suckling.

J. Physiol. 222, 23 P

LISK R.D. and NEWLON M. - 1963

Estradiol : evidence for its direct effect on hypothalamic neurons.

Science, 139, p. 223-224

McCANN S.M. and DHARIWAL A.P.S. - 1966

Hypothalamic releasing factors and the neurovascular link between the brain and the anterior pituitary.

IN : Neuroendocrinology, vol. 1, p. 261-296 - Ed. L. MARTINI and W.F. GANONG, New York, Academic Press.

Mc LENNAN H. - HUFFMAN R.D. and MARSHALL K.C. - 1968

Patterns of excitation of thalamic neurones by amino-acids and by acetylcholine.

Nature (Lond.) 219, p. 387-388

MANDELBROD I. and FELDMAN S. - 1972

Effects of sensory and hippocampal stimulation on unit activity in the median eminence of the rat hypothalamus.

Physiology and behaviour 9, p. 565-572

MARTINEZ P.M. - 1960

The structure of the pituitary stalk and the innervation of the neurohypophysis in the cat.

LUCTOR et EMERGO - LEIDEN

MAZZUCA M. - 1968

Structure fine des cellules du noyau infundibulaire et de leurs afférences chez le cobaye.

J. Microscopie, 7, p. 135-144

MOORE G.P. - PERKEL D.H. and SEGUNDO J.P. - 1966

Statistical analysis and functional interpretation of neuronal spike data.

Ann. Rev. Physiol. 28, p. 493-522

MOSS R.L. - DYBALL R.E.J. and CROSS B.A. - 1971

Responses of antidromically identified supraoptic and paraventricular units to acetylcholine, noradrenaline and glutamate applied iontophoretically.

Brain research. 35, p. 573

MURPHY J.T. and RENAUD L.P. - 1969

Mechanisms of inhibition in the ventro-medial nucleus of the hypothalamus.
J. Neurophysiol. 32, p. 85-102

NOVIN D. - SUNDSTEN J.W. - CROSS B.A. - 1970

Some properties of antidromically activated units in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.
Exp. Neurol. 26 (2), p. 330-341

OLNEY J.W. - 1969b

Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.
Science, N.Y., 164, p. 719-721

OOMURA Y. - KIMURA K. - OOHAMA H. - MAENO T. - IKI M. and KUNIYOSHI M. - 1964

Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of the cat.
Science, 143, p. 484-485

OOMURA - OOHAMA H. - NAKA F. - YAMAMOTO T. - ONO T. - and KOBAYASHI N. - 1969

Some stochastic patterns of single unit discharges in cat hypothalamus under chronic conditions.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 157, p. 666-689

OOMURA Y. - OOHAMA H. - YAMAMOTO T. - ONO T. - and KOBAYASHI N. - 1969

Behaviour of hypothalamic unit activity during electrophoretic application of drugs.
Ann.N.Y. Acad. Sci. 157, p. 642-665

PEREZ V.J. and OLNEY J.W. - 1972

Accumulation of glutamic acid in the arcuate nucleus of the hypothalamus of the infant mouse following subcutaneous administration of monosodium glutamate.
J. of Neurochemistry, 19, p. 1777-1782

PERKEL D.H. - GERSTEIN G.L. and MOORE G.P. - 1967

Neuronal spike trains and stochastic point processes. The single spike train.
Biophys. J. 7, p. 391-418

POGGIO G.F. and VIERNSTEIN L.J. - 1964

Time series analysis of impulse sequences of thalamic somatic sensory neurons.
J. Neurophysiol. 27, p. 517-545

POPA G.T. and FIELDING U. - 1930

A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region.
J. Anat. (London) 65, p. 88-91

POULAIN P. - 1971

Atlas stéréotaxique de l'hypothalamus du cobaye de 400 grammes. Systématisation et connexions des noyaux hypothalamiques.
Thèse de 3ème cycle, LILLE.

POULAIN P. - 1972

Excitation des neurones de l'hypothalamus médian par le glutamate et l'acétylcholine appliqués par iontophorèse chez le cobaye.
C.R. Soc. Biol. 166, p. 1723

POULAIN P. et BARRY J. - 1971

Les techniques d'analyse neuronique individuelle du système nerveux central.
LILLE Médical, 16, p. 498-506

POULAIN P. et PARTOUCHE C. - 1973

Relations des neurones de la région pré-optique et du septum avec le noyau arqué et l'éminence médiane.
C.R. Acad. Sc. 277, p. 737-739

ROSENTHAL F. - 1971

Relationships between positive-negative extracellular potentials and intracellular potentials in pyramidal tract neurons.
Electroenceph. clin. neuroph. 30, p. 38-44

SAWAKI Y. and YAGI K. - 1973

Electrophysiological identification of cell bodies of the tubero-infundibular neurones in the rat.
J. Physiol. 230, p. 75-85

SAWYER CH. - 1956

Effects of central nervous system lesions on ovulation in the rabbit.
Anat. Rec. 124, 358 (abstract)

SAWYER C.H. - 1959

Effects of brain lesions on estrous behaviour and reflexogenous ovulation in the rabbit.
J. Exp. Zool. 142, p. 227

SAWYER C.H. and ROBINSON B. - 1956

Separate hypothalamic areas controlling pituitary gonadotropic functions and mating behaviour in female cats and rabbits.

J. clin. Endocrinol. 16, p. 914-915

SCHNEIDER H.P.G. and McCANN S.M. - 1969

Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH releasing factors.

Endocrinology, 85, p. 121-132

SEGUNDO - TAKENAKA and EUCABO - 1967

Electrophysiology of bulbar reticular neurons.

J. of Neurophysiol. 30, p. 1194

SPYER - 1972

Baroreceptor sensitive neurones in the anterior hypothalamus of the cat.

J. of Physiol. 224, p. 245

STEINER F.A. and RUF K: - 1966

Excitatory effects of L. glutamic acid upon single unit activity in rat brain and their modification by thiosemicarbazide and pyridonal - 5'-phosphate.

Helvetica physiologica et pharmacologica acta 24, p. 181-192

STRUMWASSER F. - 1958

Long-term recording from single neurons in brain of unrestrained mammals.

Science, 127, p. 469-470

STUMPF W.E. - 1968

Estradiol concentrating neurons : topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography.

Science, 162, p. 1001-1003

SZENTAGOTHAI J. - FLERKO B. - MESS B. and HALASZ B. - 1968

Hypothalamic control of the anterior pituitary.

Budapest : Akademiai kiado

THOMAS R.C. and WILSON V.J. - 1965

Precise localization of Renshaw cells with a new marking technique.

Nature (Lond.) 206, p. 211-213

VON BAUMGARTEN R. - BLOOM F.E. - OLIVER A.P. and SALMOIRAGHI G.C. - 1963

Response of individual olfactory nerve cells to microelectrophoretically administered chemical substances.

Pflügers Archiv. 277, p. 125-140

YAGI K. - AZUMA T. and MATSUDA K. - 1966

Neurosecretory cell : capable of conducting impulse in rats.

Science N.Y., 142, p. 778-779

YAMASHITA H. - KOIZUMI K. and BROOKS C.M. - 1970

Electrophysiological studies of neurosecretory cells in the cat hypothalamus.

Brain Research, 20, p. 462-466

