

50376  
1981  
195

50376  
1981  
195

N° D'ORDRE 532

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à

l'Université des Sciences et Techniques de Lille

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Bernard CARETTE

**EFFETS DE DIFFÉRENTS NEURORÉGULATEURS  
APPLIQUÉS PAR MICROIONTOPHORÈSE  
OU PAR COMPRESSION SUR L'ACTIVITÉ  
UNITAIRE DE NEURONES ENDOCRINES  
PARVOCELLULAIRES ET ADJACENTS  
CHEZ LE COBAYE**

Soutenue le 17 décembre 1981, devant la Commission d'examen

MM. P. GUILBAULT, Président

J. BARRY, Rapporteur

J.-D. VINCENT, Rapporteur

J.-P. ROUSSEAU, Examineur

M. PORCHET, Examineur

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertziennne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G U I L B A U L T

*J'exprime ma profonde gratitude pour m'avoir initié à l'électrophysiologie.*

*J'ai pu bénéficier de son enseignement et de ses conseils qui m'ont été fort utiles pour aborder par la suite, des études électrophysiologiques au niveau du cerveau des mammifères.*

*Je le remercie vivement d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR B A R R Y

*J'exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir  
accueilli dans son laboratoire.*

*Je le remercie de la confiance qu'il m'a témoignée  
tout au long de mon travail ainsi que des encoura-  
gements qu'il m'a prodigués.*

*Qu'il trouve ici l'expression de mon respectueux  
attachement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR V I N C E N T

*J'exprime mes plus vifs remerciements pour avoir  
accepté de siéger dans le Jury de cette thèse en  
tant que rapporteur.*

*Sa haute compétence dans le domaine de la  
neuroendocrinologie me conduit à espérer qu'il  
trouvera quelque intérêt à la lecture du présent  
travail.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R O U S S E A U

*Que je remercie de la bienveillante attention qu'il me témoigne en examinant ce travail et de l'honneur qu'il me fait en participant au jury de cette thèse.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P O R C H E T

*Qui a aimablement accepté de faire partie du jury.*

*Je lui exprime mes plus vifs remerciements.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur  
Pierre POULAIN, pour sa collaboration dans la  
réalisation d'une grande partie de ce travail.*

P L A N

INTRODUCTION .....	P. 1
POSITION DU PROBLEME .....	P. 5
1/ Neurorégulateurs (neurotransmetteurs, neuromodulateurs): définition .....	P. 6
a) Neurotransmetteurs .....	P. 6
b) Neuromodulateurs .....	P. 7
2/ Méthodes pour l'étude des neurorégulateurs dans le contrôle des fonctions neuroendocrines .....	P. 8
a) Méthodes histophysiologiques .....	P. 8
b) Méthodes pharmacologiques .....	P. 8
3/ Relation entre l'activité électrique et la libération hormonale dans un neurone endocrine .....	P. 10
4/ Modèle expérimental pour l'étude des neurones endo- crines .....	P. 11
MATERIEL ET METHODES .....	P. 12
I - ANESTHESIE DES ANIMAUX .....	P. 13
II - TECHNIQUES STEREOTAXIQUES .....	P. 13
1/ Principe .....	P. 12
2/ Description de l'appareil stéréotaxique et mise en place des animaux .....	P. 13
3/ Plans de référence de l'atlas stéréotaxique .....	P. 14
III - ENREGISTREMENT UNITAIRE EXTRACELLULAIRE .....	P. 15
1/ Types d'électrodes utilisés .....	P. 15
a) Microélectrodes simples .....	P. 15
b) Microélectrodes multiples .....	P. 15
2/ Solutions utilisées .....	P. 16
3/ Mesure des résistances des microélectrodes .....	P. 16
4/ Appareils électroniques .....	P. 16
IV - STIMULATION .....	P. 18
1/ Description des électrodes utilisées .....	P. 18
2/ Mise en place de l'électrode de stimulation .....	P. 19
3/ Appareils électroniques .....	P. 20
4/ Paramètres de stimulation .....	P. 20
V - TECHNIQUES D'EJECTION DE SUBSTANCES A PARTIR DE MICRO- PIPETTES MULTIPLES .....	P. 20
A - LA MICROIONTOPHORESE .....	P. 20
1/ Principe .....	P. 20
2/ Facteurs intervenant dans l'éjection microiontophoré- tique .....	P. 21
3/ Diffusion spontanée de substances à partir de micro- pipettes .....	P. 22
4/ Relation entre les quantités éjectées et les courants appliqués .....	P. 23
5/ Types d'électrode utilisés en microiontophorèse .....	P. 23

a) Position du problème .....	P. 23
b) Solutions possibles .....	P. 24
α) Les électrodes dites "parallèles" .....	P. 24
β) La combinaison d'une électrode métallique d'enregistrement avec une électrode multi- ple de verre .....	P. 25
γ) Les microélectrodes avec une fibre de carbone ultrafine .....	P. 25
c) Electrodes utilisées par nous-mêmes .....	P. 25
α) Electrodes sans saillie .....	P. 25
β) Electrodes selon FORD (1974) .....	P. 25
γ) Electrodes avec saillie du canal d'enre- gistrement .....	P. 26
.. Procédé mis au point .....	P. 26
.. Avantages de la méthode .....	P. 29
6/ Source d'artéfacts : le courant électrique .....	P. 30
7/ Appareil utilisé pour l'éjection iontophorétique	P. 30
8/ Tableau résumant les caractéristiques des diffé- rentes substances éjectées par microiontophorèse	P. 30
 B - LA PRESSION .....	 P. 33
1/ Principe .....	P. 33
2/ Facteurs intervenant dans l'éjection par pression	P. 33
a) Le diamètre interne de la pointe d'électrode.	P. 33
b) La viscosité du solvant .....	P. 33
3/ Diffusion spontanée de substances à partir de mi- cropipettes multiples .....	P. 34
4/ Relation entre les quantités éjectées et les pres- sions appliquées .....	P. 34
a) Mesure des dimensions de la goutte formée à l'extrémité de la pointe des électrodes .....	P. 34
b) Mesure à l'aide de radioisotopes .....	P. 35
c) Comparaison des deux méthodes .....	P. 35
5/ Résultats obtenus avec nos électrodes .....	P. 35
a) Description des électrodes utilisées .....	P. 35
b) Système d'éjection par pression .....	P. 36
c) Quantification des volumes éjectés .....	P. 36
d) Application <u>in vivo</u> avec le glutamate .....	P. 39
α) Calibration <u>in vitro</u> .....	P. 39
β) Effets du glutamate appliqué par pression	P. 39
γ) Application du solvant du glutamate .....	P. 39
δ) Application d'une solution saline physio- logique .....	P. 39
6/ Caractéristiques des substances éjectées par pression (tableau 2) .....	P. 42

C - EJECTIONS PAR PRESSION ET PAR IONTOPHORESE SIMULTANEMENT .....	P. 42
D - PROTOCOLE EXPERIMENTAL A SUIVRE DANS LE CAS D'UNE EJECTION PAR PRESSION .....	P. 43
VI - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES .....	P. 45
1/ Prélèvement et fixation du cerveau .....	P. 45
2/ Confection des coupes .....	P. 45
3/ Examen des coupes .....	P. 46
 CHAPITRE I : IDENTIFICATION ET LOCALISATION DE NEURONES ENDOCRINES PARVOCELLULAIRES .....	P. 47
I - PRINCIPE DE L'IDENTIFICATION ANTIDROMIQUE .....	P. 48
II- REPNSES ORTHODROMIQUES .....	P. 50
III- LOCALISATION DES CORPS CELLULAIRES DES NEURONES ACTIVES ANTIDROMIQUEMENT .....	P. 52
IV- PROPRIETES ELECTRIQUES DES NEURONES ENDOCRINES .....	P. 54
A - CARACTERISTIQUES DES POTENTIELS D'ACTION ANTIDROMIQUES .....	P. 54
1/ Forme .....	P. 54
2/ Période réfractaire absolue .....	P. 54
3/ Latences et vitesses de conduction .....	P. 54
B - ACTIVITE UNITAIRE SPONTANEE .....	P. 55
V - DISCUSSION .....	P. 55
A - APPROCHES POUR LA STIMULATION DE L'EMINENCE MEDIANE .....	P. 55
1/ Résultats obtenus avec une approche trans-pharyngée .....	P. 55
2/ Résultats obtenus avec une approche par voie dorsale .....	P. 56
B - SUPPORTS ANATOMIQUES DES DONNEES OBTENUES AVEC L'ELECTROPHYSIOLOGIE .....	P. 57
C - LOCALISATION DES CORPS CELLULAIRES DE NEURONES ENDOCRINES PAR LES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES .....	P. 58
1/ Localisation des corps cellulaires des neurones à TRH .....	P. 58
2/ Localisation des corps cellulaires des neurones à LHRH .....	P. 59
3/ Localisation des corps cellulaires des neurones à somatostatine .....	P. 60

CHAPITRE II : NORADRENALINE .....	P. 61
I - INTRODUCTION .....	P. 62
II - RESULTATS .....	P. 63
III- DISCUSSION .....	P. 66
A - EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR DES NEURONES DES AIRES SEPTALE, PREOPTIQUE ET HYPOTHALAMIQUE ANTERIEURE ...	P. 66
B - EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR D'AUTRES NEURONES HYPOTHALAMIQUES ET DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL .....	P. 66
C - TYPES DE RECEPTEUR NORADRENERGIQUE IMPLIQUES DANS LES REPOUSES A LA NORADRENALINE .....	P. 67
D - CONTROLE DE LA SECRETION DE LH PAR LA NORADRENALINE	P. 68
1/ Adénohypophyse et éminence médiane : sites d'action peu probables de la noradrénaline .....	P. 68
2/ Aires préoptique et hypothalamique antérieure : site possible pour l'action de la noradrénaline .	P. 68
 CHAPITRE III : HISTAMINE .....	P. 74
I - INTRODUCTION .....	P. 72
II - RESULTATS .....	P. 73
A - REPOUSES EXCITATRICES A L'HISTAMINE .....	P. 73
1/ Réponses rapides .....	P. 73
2/ Réponses lentes .....	P. 73
B - REPOUSES INHIBITRICES A L'HISTAMINE .....	P. 74
1/ Réponses rapides .....	P. 74
2/ Réponses lentes .....	P. 74
III- DISCUSSION .....	P. 77
A - ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES .....	P. 77
1/ Effets de l'histamine dans les aires préoptique et septale .....	P. 77
2/ Effets de l'histamine sur d'autres neurones hypo- thalamiques .....	P. 77
3/ Effets de l'histamine sur des neurones d'autres aires du système nerveux central .....	P. 78
B - VOIES HISTAMINERGIQUES .....	P. 78
C - CORRELATIONS ENTRE LES EFFETS ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE L'HISTAMINE ET SES RECEPTEURS .....	P. 79
D - IMPLICATION DE L'HISTAMINE DANS LE CONTROLE DES SE- CRETIONS HYPOPHYSAIRES .....	P. 81
1/ Site d'action de l'histamine : l'adénohypophyse ?	P. 81
2/ Site d'action de l'histamine : l'éminence médiane	P. 81
3/ Site d'action de l'histamine : l'hypothalamus et le septum .....	P. 81
E - HISTAMINE : NEUROTRANSMETTEUR ET/OU NEUROMODULATEUR	P. 82

CHAPITRE IV : ENKEPHALINES .....	P. 84
I - INTRODUCTION .....	P. 85
II - RESULTATS .....	P. 86
A - EFFETS DE LA LEUCINE-ENKEPHALINE ET DE LA METHIONINE- ENKEPHALINE SUR DES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS TUBE- RAL .....	P. 86
1/ Neurones sensibles aux deux enképhalines .....	P. 86
2/ Neurones sensibles à une enképhaline mais non à l'autre .....	P. 87
3/ Localisation des neurones étudiés .....	P. 87
B - EFFETS DES ENKEPHALINES ET DE LA NALOXONE SUR DES NEURONES ENDOCRINES ET ADJACENTS DE L'HYPOTHALAMUS TUBERAL .....	P. 87
1/ Neurones endocrines .....	P. 89
2/ Neurones adjacents .....	P. 90
3/ Localisation des neurones étudiés .....	P. 90
C - EFFETS DES ENKEPHALINES, DE LA NALOXONE ET DU MAGNE- SIUM SUR DES NEURONES ENDOCRINES ET ADJACENTS DE L'AIRE SEPTO-PREOPTIQUE ET DE LA BANDE DIAGONALE DE BROCA .....	P. 92
1/ Effets des enképhalines .....	P. 92
2/ Interactions avec la naloxone .....	P. 92
3/ Interactions avec le magnésium .....	P. 93
4/ Localisation des neurones étudiés .....	P. 93
III- DISCUSSION .....	P. 96
A - EFFECTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES ENKEPHALINES SUR LES NEURONES .....	P. 96
1/ Types d'effets des enképhalines sur les neurones du système nerveux central .....	P. 96
a) Neurones de l'hypothalamus et du septum .....	P. 96
b) Autres neurones du système nerveux central ..	P. 96
2/ Effets des enképhalines sur l'activité évoquée par le glutamate .....	P. 97
3/ Phénomène de désensibilisation .....	P. 97
4/ Neurones sensibles à une enképhaline et non à l'autre .....	P. 98
a) Nos résultats ne sont pas dûs à la technique utilisée .....	P. 98
b) Etudes électrophysiologiques à l'appui de nos observations .....	P. 99
c) Observations morphologiques .....	P. 100
d) Fonctions différentielles de la leu-enképha- line et de la mét-enképhaline .....	P. 100
e) Récepteurs pour la leu-enképhaline, récepteurs pour la mét-enképhaline .....	P. 100

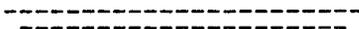
B - EFFETS DES ENKEPHALINES : INTERACTION AVEC LA NALOXONE .....	P. 101
1/ Existence de récepteurs morphiniques multiples ..	P. 101
2/ Etudes électrophysiologiques .....	P. 101
3/ Récepteurs mu et récepteurs delta .....	P. 102
C - ACTIONS PRE- ou POST-SYNAPTIQUES DES ENKEPHALINES ..	P. 105
D - ENKEPHALINES ET CONTROLE NEUROENDOCRINE .....	P. 107
1/ Enképhalines et contrôle de la fonction LH .....	P. 107
2/ Enképhalines et contrôle des autres fonctions adénohypophysaires .....	P. 109
3/ Sites d'action proposés pour les effets des enképhalines sur les sécrétions neurohypophysaires	P. 110

## CHAPITRE V : STEROIDES

I - INTRODUCTION .....	P. 113
II - RESULTATS .....	P. 114
A - ETUDES IONTOPHORETIQUES .....	P. 114
1/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol 7 $\alpha$ -acide butyrique ...	P. 114
2/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol 7 $\alpha$ -acide butyrique et des désoxycorticostérones 7 $\alpha$ et 7 $\beta$ -acétiques ..	P. 114
3/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol 7 $\alpha$ -acide butyrique, de l'androsta-4-ène, 3,17-dione-7 $\alpha$ -acétique et du 20 carboxy-pregna-1,4-diène-3-one .....	P. 115
B - ETUDES CONCERNANT L'EJECTION PAR PRESSION DE STEROIDES NATURELS .....	P. 117
1/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol .....	P. 117
a) Réponses excitatrices .....	P. 117
b) Réponses inhibitrices .....	P. 117
2/ Comparaison des effets du 17 $\beta$ -oestradiol et du 17 $\beta$ -oestradiol 7 $\alpha$ -acide butyrique .....	P. 118
3/ Comparaison des effets du 17 $\beta$ -oestradiol et du cortisol .....	P. 120
4/ Localisation des neurones sensibles aux stéroïdes	P. 121
III- DISCUSSION .....	P. 123
A - EFFETS DE STEROIDES "ACIDES", APPLIQUES PAR IONTOPHORESE, SUR DES NEURONES SEPTAUX ET PREOPTIQUES .....	P. 123
B - EFFETS DE STEROIDES CONVENTIONNELS SUR DES NEURONES SEPTAUX, PREOPTIQUES, HYPOTHALAMIQUES ET DU BULBE OLFACTIF .....	P. 124
1/ Etude <u>in vitro</u> : stéroïdes dans le milieu de culture .....	P. 124
2/ Etude <u>in vivo</u> : application des stéroïdes par pression .....	P. 124
3/ Etude <u>in vivo</u> : application des stéroïdes par un flux d'air .....	P. 125
C - COMPARAISON DES EFFETS DES STEROIDES "ACIDES" ET CONVENTIONNELS SUR UN MEME NEURONE .....	P. 125

D - SPECIFICITE DES REPONSES OBSERVEES .....	P. 125
E - EFFETS MEMBRANAIRES DES STEROIDES .....	P. 127
F - IMPLICATION FONCTIONNELLE POSSIBLE DES EFFETS ELEC- TRIQUES DES STEROIDES DANS CERTAINS EVENEMENTS NEURO- ENDOCRINIENS .....	P. 128
1/ La décharge pulsatile de LH .....	P. 128
2/ La rétroaction négative des oestrogènes dans le contrôle de la libération de LH .....	P. 129
G - LE 17 $\beta$ -OESTRADIOL EN TANT QUE NEUROMODULATEUR .....	P. 130
DISCUSSION GENERALE .....	P. 131
I - CONTROLE SYNAPTIQUE DES NEURONES ENDOCRINES PARVOCELLU- LAIRES .....	P. 132
II - ROLE DES POTENTIELS D'ACTION DANS L'ACTIVITE ENDOCRINE D'UN NEURONE .....	P. 133
A - SYNTHÈSE DE LA NEUROHORMONE .....	P. 134
B - TRANSPORT AXONIQUE DE LA NEUROHORMONE .....	P. 134
C - LIBERATION DE LA NEUROHORMONE .....	P. 134
III- CONNEXIONS NERVEUSES ENTRE LE FAISCEAU MEDIAN DU TELENCEPHALE, L'AIRE PREEPTIQUE ET L'HYPOTHALAMUS BASAL	P. 135
IV - INTERACTION 17 $\beta$ -OESTRADIOL, NEURONES NORADRENERGIQUES .	P. 137
V - INTERACTION ENKEPHALINE, NORADRENALINE SUR DES NEURONES A LULIBERINE .....	P. 139
VI - INTERACTIONS 17 $\beta$ -OESTRADIOL, ENKEPHALINE ET 17 $\beta$ -OESTRADIOL HISTAMINE.....	P. 141
CONCLUSION .....	P. 142
BIBLIOGRAPHIE .....	P. 146

I N T R O D U C T I O N



L'hypothalamus est une région du cerveau impliquée directement dans le contrôle des sécrétions hypophysaires (GREEN et HARRIS, 1947 ; BARGMANN et SCHARRER, 1951). A ce niveau, sont localisées des cellules nerveuses dont les axones se terminent au contact des capillaires dans lesquels sont déversés leurs produits de sécrétion. Nous reprenons, pour les désigner, le terme de neurones endocrines proposé par CROSS et coll. (1975).

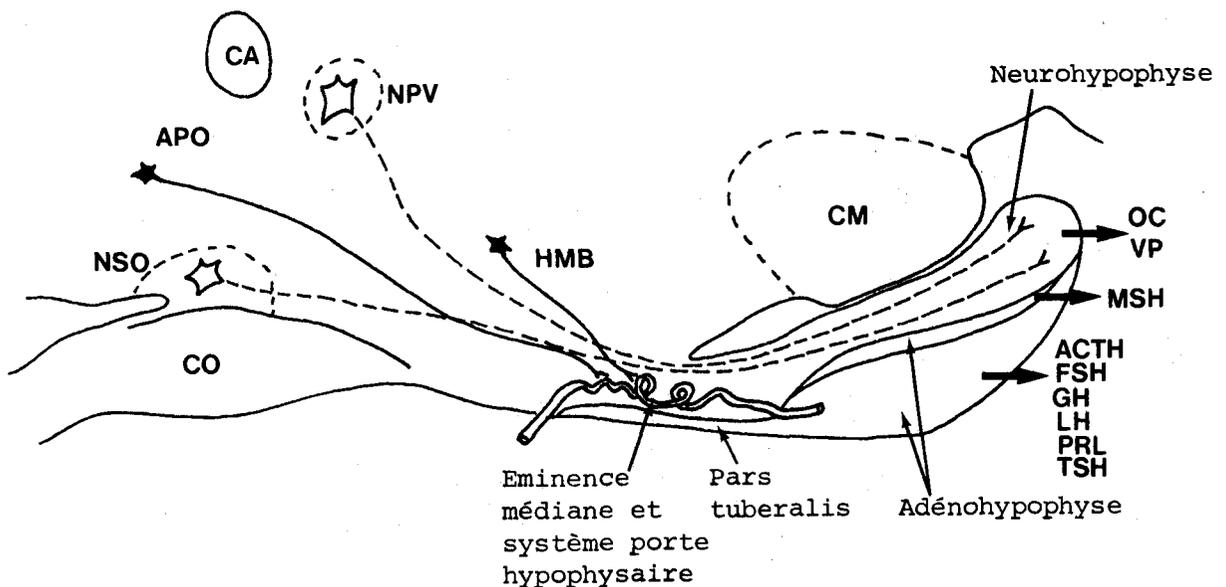
Il existe au niveau de l'hypothalamus, deux types de neurones endocrines (figure 1) :

- les neurones endocrines magnocellulaires constituant l'appareil hypothalamo-neurohypophysaire. Ces neurones ont un corps cellulaire de grande taille, localisé dans les noyaux supra-optiques et paraventriculaires, les terminaisons axoniques se situant dans la neurohypophyse, au contact de capillaires où leurs produits de sécrétion peuvent passer dans la circulation générale ;
- les neurones endocrines parvocellulaires dont les corps cellulaires de petite taille, n'ont pas une localisation aussi bien délimitée et dont les axones se terminent dans l'éminence médiane, au contact des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire, où sont déversées les sécrétions, pour contrôler la synthèse et la libération des hormones de l'adénohypophyse.

Ce sont les neurones endocrines parvocellulaires se projetant vers l'éminence médiane qui font l'objet du travail présenté ici.

A la suite d'expériences de lésions, de stimulations ou d'implantations hypothalamiques d'hormones, une localisation de neurones endocrines parvocellulaires a pu être déterminée dans une aire appelée aire hypothalamique hypophysiotrope (SZENTAGOTHAÏ et coll., 1968). Entre 1969 et 1973, la structure chimique de trois des produits élaborés par les neurones endocrines parvocellulaires a pu être établie : la thyrolibérine (TRH), la lulibérine (LHRH), et la somatostatine (SRIF). Ces hormones synthétisées ont permis la fabrication

d'anticorps. Dès lors, ce sont développées deux méthodes immunologiques pour localiser les neurones endocrines parvocellulaires correspondants. L'une des méthodes consiste en une microdissection du cerveau et en un dosage radioimmunologique tandis que l'autre met en évidence des neurones par immunocytochimie. La première caractérisation topographique d'un neurone endocrine parvocellulaire par cette dernière méthode est réalisée par BARRY et coll. (1973). Elle concerne les neurones à lulibérine (LHRH) chez le cobaye.



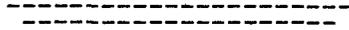
**FIGURE 1** : Schéma simplifié de l'hypothalamus de cobaye en coupe parasagittale montrant :

- les neurones endocrines magnocellulaires des noyaux paraventriculaires (NPV) et supraoptiques (NSO) dont les axones (en pointillés) se projettent vers la neurohypophyse, responsable de la libération de la vasopressine (VP) et de l'ocytocine (OC) ;
- les neurones endocrines parvocellulaires dont les corps cellulaires sont représentés en noir dans l'aire préoptique (APO) et l'hypothalamus médio-basal (HMB) et dont les axones se terminent au contact de capillaires du système porte hypophysaire dans l'Éminence médiane. Ces neurones élaborent des hormones, appelées facteurs hypothalamiques hypophysiotropes, qui régulent les sécrétions de l'adénohypophyse (ACTH, FSH, GH, LH, MSH, PRL et TSH)

CA : Commissure antérieure ; CM : corps mamillaire ; CO : chiasma optique.

Vers les années 1970, 1971, s'est développée une technique électrophysiologique pour identifier les neurones endocrines parvocellulaires. Elle consiste en une stimulation électrique des terminaisons axoniques de l'éminence médiane qui donne naissance à un potentiel d'action antidromique, enregistré à l'aide de microélectrodes au niveau du corps cellulaire du neurone (YAGI et SAWAKI, 1970 ; HARRIS et coll., 1971). C'est cette technique électrophysiologique que nous avons utilisée pour identifier et étudier les neurones endocrines parvocellulaires chez le cobaye. Sont également inclus dans cette étude, des neurones adjacents qui ne sont pas influencés par la stimulation de l'éminence médiane mais dont il n'est pas exclu qu'ils fassent partie de circuits impliqués dans un contrôle endocrine, dans la mesure où leurs axones se terminent sur des neurones endocrines pour en déterminer ou en moduler l'activité.

POSITION DU PROBLEME



## 1/ Neurorégulateurs (neurotransmetteurs, neuromodulateurs) : définition

### a) Neurotransmetteurs

L'implication de substances chimiques dans la communication neuronale a d'abord été suggérée et établie au niveau du système nerveux périphérique, au cours de la première moitié de ce siècle (références dans BARCHAS et coll., 1978). Cependant, au niveau du système nerveux central, la croyance générale était que seulement des phénomènes électriques permettaient le transfert rapide des signaux entre neurones. C'est seulement vers les années 1950 que s'est imposé le concept d'une transmission chimique de l'information entre neurones du système nerveux central.

Le neurotransmetteur se définit comme un messenger chimique produit et libéré par un neurone, responsable du transfert direct d'un signal, d'un neurone présynaptique vers un neurone postsynaptique à travers un récepteur.

Il existe deux types de récepteurs sensibles aux neurotransmetteurs :

- les récepteurs à action rapide, liés à un pore traversant la membrane et perméable sélectivement à certains ions ;
  - les récepteurs à action durable
- Ces récepteurs comportent deux sous-unités. L'une, située à la surface de la membrane cellulaire, représente le site de liaison du neurotransmetteur. L'autre sous-unité, une enzyme localisée à la partie interne de la membrane, est activée lorsque le site de liaison est occupé par le neurotransmetteur. Ces enzymes sont au nombre de deux, l'adénylate et la guanylate cyclase, et leur activation conduit respectivement à une augmentation du taux d'AMP et GMP cyclique, considérés comme les seconds messagers dans l'action des neurotransmetteurs.

Le neurotransmetteur peut activer la conductance membranaire du neurone à des ions spécifiques. Cette activation peut conduire soit à une dépolarisation soit à une hyperpolarisation, à l'origine respectivement de l'augmentation ou de la diminution de la fréquence des potentiels d'action du neurone.

Le neurotransmetteur peut également être à l'origine de différentes réponses métaboliques dans les neurones postsynaptiques.

Des critères ont été définis et permettent d'établir qu'une substance agit comme un neurotransmetteur. Ces critères sont :

- présence en concentrations élevées dans des terminaisons présynaptiques,
- libération calcium-dépendante par des stimuli dépolarisants,
- les réponses évoquées sur la cellule cible sont similaires à celles déclenchées par la stimulation nerveuse,
- des neurones contiennent les mécanismes pour la biosynthèse et l'inactivation,
- les réponses sur la cellule cible déclenchées par la substance et la stimulation nerveuse sont sensibles de façon similaire, à des inhibiteurs pharmacologiques.

#### b) Neuromodulateurs

Le concept de neuromodulation est relativement plus récent et découle d'un certain nombre d'études indiquant que des composés interviennent dans la communication entre neurones mais n'agissent pas d'une façon transsynaptique. Les neuromodulateurs, en contraste avec les neurotransmetteurs, ne peuvent pas être responsables du transfert direct d'une information à partir d'un neurone présynaptique vers un neurone postsynaptique.

La neuromodulation peut présenter deux aspects :

- elle peut s'effectuer à travers un neurotransmetteur, et affecte sa synthèse, sa libération, son interaction avec un récepteur, son inactivation,
- elle peut être directe. Le neuromodulateur, libéré à partir du cerveau ou d'autres organes, agit directement sur le neurone à une certaine distance de son site de libération.

Bien que les neuromodulateurs ne modifient pas directement la conductance ionique des membranes neuronales, ils peuvent altérer l'activité électrique des neurones ainsi que leurs processus métaboliques.

## 2/ Méthodes pour l'étude des neurorégulateurs dans le contrôle des fonctions neuroendocrines

### a) Méthodes histophysiologiques

Ces méthodes tentent d'établir une corrélation entre l'intensité de fluorescence aminergique, ou la concentration ou le renouvellement des neurorégulateurs dans des aires spécifiques du cerveau et une sécrétion hormonale.

L'avantage de cette méthode est que les aires du système nerveux central impliquées peuvent être localisées. La difficulté se situe dans l'interprétation des résultats observés.

### b) Méthodes pharmacologiques

La relation de cause à effet entre neurorégulateurs et changements hormonaux est déterminée, mais la localisation du site d'interaction n'est pas obtenue.

Les méthodes pharmacologiques consistent à administrer :

- le neurorégulateur lui-même, pour obtenir un effet, il est souvent nécessaire d'utiliser des doses élevées bien supérieures aux concentrations endogènes du cerveau. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir des effets non spécifiques et il n'est pas surprenant d'observer des résultats contradictoires ;
- des substances interférant avec la biosynthèse du neurorégulateur ou bloquant son action sur des récepteurs.

Les substances utilisées ne sont jamais totalement spécifiques d'un neurorégulateur donné. Elles peuvent l'affecter n'importe où dans le cerveau.

Il apparaît bien qu'aucune de ces méthodes ne soit réellement adéquate pour déterminer les mécanismes complexes globaux, mis en jeu dans les systèmes régulateurs neuroendocrines. Il est plutôt souhaitable d'émettre l'hypothèse d'un site d'action pour les neurorégulateurs et de tester cette possibilité par une technique adéquate. On peut envisager trois niveaux d'action pour les neurorégulateurs :

- L'organe effecteur lui-même de la régulation neuroendocrine, c'est-à-dire l'adénohypophyse :

Dans ce cas, la substance agit directement sur les cellules adénohypophysaires :

- .. pour bloquer ou augmenter la sécrétion d'une hormone,
- .. ou pour modifier la réponse de la cellule à l'hormone hypothalamique correspondante.

Les cultures hypophysaires constituent la technique adéquate pour tester cette possibilité. Les neurorégulateurs sont mis en contact avec les cellules, seuls ou en combinaison avec d'autres substances (comme les facteurs hypophysiotropes), les taux d'hormones hypophysaires sont mesurés par dosages radioimmunologiques.

- L'éminence médiane :

La substance est présente dans des terminaisons nerveuses en contact étroit avec celles d'un neurone endocrine et agit à travers un contact axo-axonique. Ou bien la substance est présente dans le neurone endocrine et agit à l'intérieur de ce dernier pour libérer l'hormone correspondante.

Cette hypothèse peut être testée sur des fragments de tissu contenant des terminaisons neurosécrétoires. Les substances sont appliquées seules ou en combinaison avec d'autres substances, les taux de facteurs hypophysiotropes (LHRH, TRH, SRIF) sont mesurés par dosages radioimmunologiques (RAMIREZ et KORDON, 1978)

- L'hypothalamus et les structures extrahypothalamiques :

Le site d'action de la substance peut se situer dans une voie afférente au neurone endocrine. Cette voie afférente peut être hypothalamique ou extrahypothalamique. Ou bien le site d'action est le corps cellulaire du neurone endocrine lui-même.

Méthodes histophysiologiques et pharmacologiques ne sont pas adéquates dans ce cas.

Dans le travail que nous présentons ici, nous avons choisi le neurone endocrine et les neurones adjacents comme sites d'action possibles pour les neurorégulateurs. La technique in vivo utilisée comporte l'identification électrophysiologique du neurone endocrine et l'enregistrement extracellulaire de ses potentiels d'action. L'activité électrique du neurone endocrine constitue l'un des aspects importants de son fonctionnement.

### 3/ Relation entre l'activité électrique et la libération hormonale dans un neurone endocrine

La libération de neurotransmetteurs aux extrémités axoniques met en jeu essentiellement des potentiels d'action et des ions  $Ca^{++}$ . Des mécanismes similaires pour la libération hormonale au niveau des terminaisons axoniques des neurones endocrines magnocellulaires, sont démontrés indirectement par des expériences in vivo et in vitro (RICHARD et coll., 1978). En particulier, l'activité électrique de neurones endocrines individuels magnocellulaires, identifiés par stimulation de la neurohypophyse, présente des changements parallèles à ceux de la libération hormonale, induite par des stimuli variés. La relation temporelle entre les deux événements permet d'affirmer qu'il y a une relation de cause à effet entre les deux.

C'est seulement récemment que des résultats équivalents pour les neurones parvocellulaires ont été obtenus. DYER et coll. (1980) étudient la libération de la lulibérine en réponse à la stimulation électrique de l'hypothalamus médio-basal incubé in vitro. Ils déterminent la fréquence de stimulation à laquelle une libération survient et indiquent la nécessité que le calcium soit présent dans le milieu d'incubation.

#### 4/ Modèle expérimental pour l'étude des neurones endocrines

Avec l'identification électrophysiologique de neurones endocrines, l'enregistrement extracellulaire de leur activité unitaire, nous disposons d'un modèle expérimental qui nous permet d'apprécier les variations de leur fréquence de décharge avec pour conséquence des modifications de la libération de leurs hormones, en réponse à un neurorégulateur.

L'application des neurorégulateurs est effectuée au voisinage immédiat du corps cellulaire des neurones endocrines et adjacents à l'aide de deux techniques :

- la microiontophorèse pour les substances ionisables,
- l'éjection par pression pour les substances non ionisables.

La première partie de ce travail indiquera les différents critères pour l'identification électrophysiologique des neurones endocrines parvocellulaires et la localisation de leurs corps cellulaires.

La deuxième partie de ce travail sera consacrée à l'étude des effets de différents neurorégulateurs : noradrénaline, histamine, méthionine et leucine-enképhaline, stéroïdes acides et stéroïdes naturels, sur des neurones endocrines et adjacents.

Dans la partie matériel et méthodes, le paragraphe traitant de l'éjection de substances à partir des micropipettes sera développé en raison de la mise au point par nous-mêmes, d'une méthode permettant la fabrication de microélectrodes multiples avec saillie du canal d'enregistrement, et en raison de la mise au point d'un protocole expérimental, en collaboration avec P. POULAIN pour une éjection par pression, in vivo, de substances seule ou simultanément avec une éjection iontophorétique d'une autre substance.

MATERIEL et METHODES

---

---

## I - ANESTHESIE DES ANIMAUX

Toutes les expérimentations sont effectuées sur des cobayes mâles ou femelles, tricolores ou albinos. Les animaux ont atteint le stade adulte, leur poids se situe entre 380 et 420 grammes.

Les cobayes sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane (1,2 à 1,5 g/kg). Afin de maintenir l'animal anesthésié au cours de l'expérience, des injections supplémentaires d'uréthane sont effectuées au bout de quelques heures. CROSS et DYER (1971) montrent que l'activité électrique de l'hypothalamus est peu influencée par cet anesthésique. De plus, l'ovulation n'est jamais bloquée lorsque l'uréthane est injecté avant la décharge préovulatoire de LH (LINCOLN et KELLY, 1972). Dans certaines expériences, les cobayes sont trachéotomisés et mis sous respiration artificielle à l'aide d'une pompe BRAUN MELGUNSEN, après injection intramusculaire de flaxédil (2 mg/kg).

L'enregistrement des bruits du coeur, contrôlé périodiquement au cours de l'expérimentation, permet de s'assurer du bon état physiologique de l'animal.

## II - TECHNIQUES STEREOTAXIQUES

### 1/ Principe

Une électrode métallique ou de verre est placée, sans contrôle visuel direct, dans une structure du système nerveux central dont la position est donnée par référence à un système tri-dimensionnel de coordonnées.

### 2/ Description de l'appareil stéréotaxique et mise en place des animaux

L'appareil stéréotaxique (distribué par BALTIMORE instruments company) comporte deux parties solidaires :

- un appareil de contention qui permet de fixer la tête de l'animal dans une position déterminée,
- un dispositif d'implantation stéréotaxique.

L'ensemble est situé dans une cage de FARADAY.

Les animaux, mis en décubitus ventral, ont la tête placée dans l'appareil stéréotaxique au moyen de pointes d'oreilles. L'orientation du crâne est réalisée par une barre horizontale placée sous les incisives supérieures de l'animal. Enfin des griffes d'orbites assurent une immobilisation parfaite de la tête du cobaye. La peau du crâne est incisée, les os trépanés à l'aide d'une fraise de dentiste, la dure-mère enlevée. Une ligature du sinus longitudinal médian est pratiquée.

Le dispositif d'implantation stéréotaxique permet le déplacement du support de l'électrode dans les coordonnées stéréotaxiques. Le système est gradué en 1/10 mm pour les coordonnées antéro-postérieures et latérales. Pour la coordonnée de profondeur, le support est relié à un micromanipulateur hydraulique (type WELLS) qui permet de réaliser à distance (à l'extérieur de la cage de FARADAY), la descente, micron par micron, de l'électrode.

### 3/ Plans de référence de l'atlas stéréotaxique

Le système de coordonnées stéréotaxiques comporte trois plans perpendiculaires l'un à l'autre :

- le plan antéro-postérieur a comme plan de référence, celui passant par la ligne interauriculaire,
- le plan latéral a pour référence le plan passant par 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 (1974), pour des cobayes de 400 grammes. Il concerne l'hypothalamus et le septum de cet animal.

### III - ENREGISTREMENT UNITAIRE EXTRACELLULAIRE

#### 1/ Types d'électrodes utilisés

Les enregistrements unitaires extracellulaires sont réalisés à l'aide de microélectrodes de verre remplies d'une solution conductrice.

##### a) Microélectrodes simples

Ces électrodes sont fabriquées à partir de tubes de verre dans lesquels est incorporée une fibre de verre (diamètre externe du tube :  $2 \text{ mm} \pm 0,1 \text{ mm}$  ; diamètre interne :  $1,16 \text{ mm}$  ; CLARK Electromedical Instruments). Les tubes sont étirés à l'aide d'un appareil NARISHIGE à étirement vertical. Les tubes chauffés grâce à un filament, s'allongent sous l'effet d'un poids, puis sont étirés sous l'effet d'une force électromagnétique. Les microélectrodes ainsi obtenues ont un diamètre à la pointe de  $0,5$  à  $1,5$  micron.

##### b) Microélectrodes multiples

Les enregistrements sont également obtenus à partir d'un canal de micropipettes multiples (études iontophorétiques, études avec éjection par compression). Dans ce cas, la pointe du canal d'enregistrement soit se situe au même niveau que les pointes des autres canaux (étude de la noradrénaline), soit fait saillie par rapport aux autres pointes (étude des autres neuro-régulateurs). Le tube de verre correspondant à ce canal a un diamètre externe de  $4 \text{ mm}$ , un diamètre interne de  $2,5 \text{ mm}$ .

## 2/ Solutions utilisées

Les microélectrodes d'enregistrement sont remplies de NaCl 2M ou de colorants tels que le vert rapide (NaCl 2M saturé avec ce colorant), le bleu Alcian 8 GX 8%. Les colorants, éjectés des micropipettes grâce à un courant électrique, forment un dépôt à proximité des neurones étudiés, en vue de leur localisation à partir de coupes histologiques.

Le remplissage des microélectrodes est facilité par la présence de fibres de verre dans les tubes (TASAKI et coll., 1968).

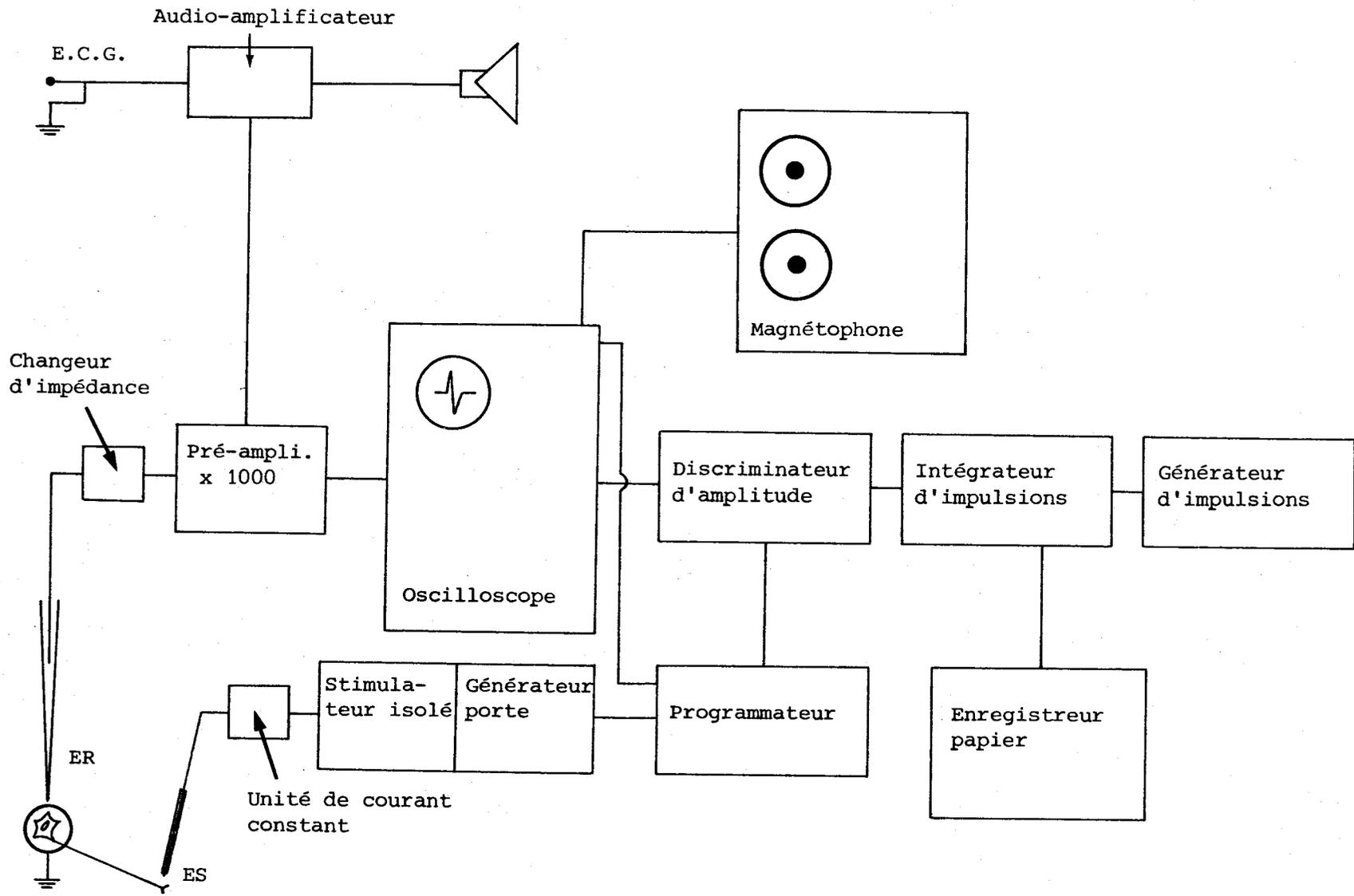
## 3/ Mesure des résistances des microélectrodes

Les résistances sont mesurées à l'aide d'un appareil WISTON Electronics Company, B-L 1000 B. La mesure est effectuée grâce à un courant d'intensité  $5 \times 10^{-9}$  ampères, de fréquence 135 Hz, passé à travers les électrodes dont la pointe est placée dans du NaCl 2M. Les valeurs obtenues se situent entre 3 et 15 Mégohms.

## 4/ Appareils électroniques

L'activité électrique des neurones est enregistrée grâce à un dispositif classique (figure 2), comprenant un adaptateur d'impédance, un amplificateur (x 1000). Elle est visualisée sur un oscilloscope TEKTRONIX 502 A et peut être filmée à l'aide d'une caméra GRASS. Les potentiels d'action sont isolés du bruit grâce à un discriminateur d'amplitude et convertis en impulsions de voltage constant. Ces impulsions sont ensuite comptées par période de 500 msec ou 1 seconde par un intégrateur (modules NEUROLOG), puis enregistrés sur papier thermosensible (DEVICES M2). Les signaux peuvent également être stockés sur bande magnétique grâce à un AMPEX.

Figure 2 : Dispositif expérimental pour l'enregistrement de l'activité unitaire des neurones et la stimulation de l'éminence médiane.



BUS  
LILLE

#### IV - STIMULATION

Une stimulation bipolaire de l'éminence médiane est réalisée afin de réduire l'aire de stimulation et la contamination des enregistrements par les chocs artéfacts.

##### 1/ Description des électrodes utilisées

La stimulation est assurée par deux types d'électrode (RHODES Medical Instruments) :

- soit par un fil métallique inséré dans un tube d'acier, faisant saillie à la pointe et formant ainsi une électrode concentrique (figure 3A),
- soit deux fils métalliques parallèles isolés sauf à leur pointe (figure 3B).

Les deux surfaces de l'électrodes exposées (représentées en noir sur les schémas) constituent les deux pôles (anode et cathode) de la stimulation.

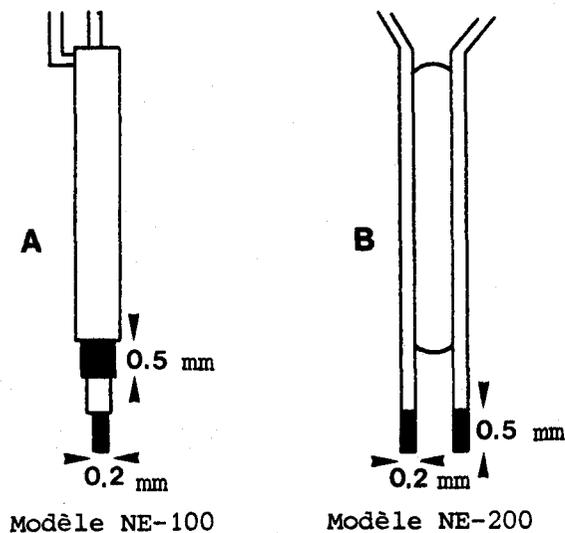


Figure 3 : Schémas des deux types d'électrodes utilisés pour la stimulation de l'éminence médiane.

## 2/ Mise en place de l'électrode de stimulation

L'extrémité de l'électrode de stimulation est implantée stéréotaxiquement, par approche dorsale, grâce au microdescendeur d'un appareil stéréotaxique, La Précision Cinématographique.

Dans le cas de l'enregistrement de l'activité unitaire des neurones de l'hypothalamus médio-basal, l'électrode de stimulation droite fait un angle d'environ 30° avec la verticale afin de permettre l'implantation de l'électrode d'enregistrement (figure 4, situation 2).

Dans le cas des neurones septo-préoptiques, la distance entre sites d'enregistrement et sites de stimulation est suffisamment importante pour permettre l'utilisation d'une électrode de stimulation présentant un angle droit. L'implantation stéréotaxique d'une telle électrode fournit des résultats plus précis (figure 4, situation 1).

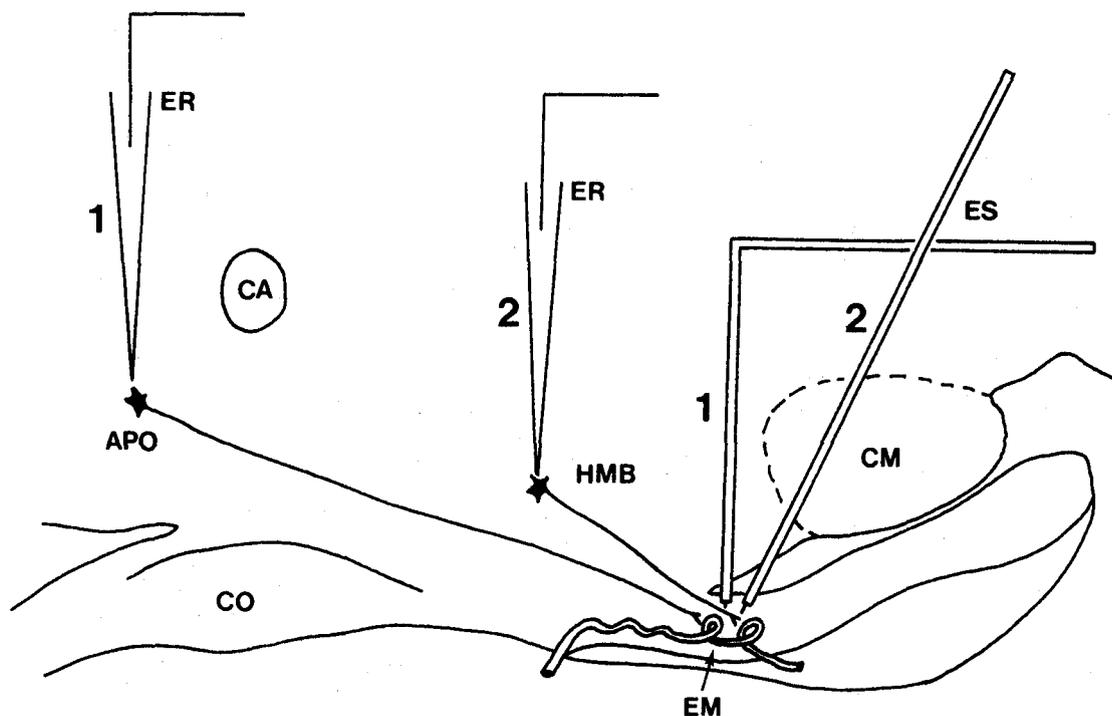


Figure 4 : Schéma de l'hypothalamus de cobaye en coupe parasagittale montrant les positions des électrodes d'enregistrement (ER) et de stimulation (ES) pour l'identification antidromique de neurones endocrines parvocellulaires.

Abréviations : APO, aire préoptique ; CA, commissure antérieure ; CM, corps mamillaire ; CO, chiasma optique ; EM, éminence médiane ; HMB, hypothalamus médio-basal.

### 3/ Appareils électroniques (figure 2)

Des chocs monophasiques sont délivrés à partir d'unités de stimulation isolées DEVICES type 2533, déclenchées par un générateur porte type 2521, programmé à partir d'un DEVICES Digitimer type 3290. L'intensité de stimulation est mesurée et demeure constante grâce à une unité de courant constant GRASS modèle CCU 1.

### 4/ Paramètres de stimulation

Les chocs de stimulation sont appliqués toutes les 750 msec. Ils ont une intensité comprise entre 0,15 et 2 mA, une durée de 0,1 à 1 msec.

## V - TECHNIQUES D'EJECTION DE SUBSTANCES A PARTIR DE MICROPIPETTES MULTIPLES

### A - LA MICROIONTOPHORESE

#### 1/ Principe

La microiontophorèse consiste en l'éjection contrôlée de petites quantités de substances chimiques ionisées, à l'extérieur de fines micropipettes, au moyen de courants électriques (figure 5).

La quantité de substances éjectées microiontophorétiquement est donnée par l'équation :

$$M = \frac{n \cdot I \cdot t}{zF}$$

M est la quantité de substance éjectée en moles, n le nombre transport, I le courant d'éjection, t le temps, z la valence de la substance, F la constante de Faraday.

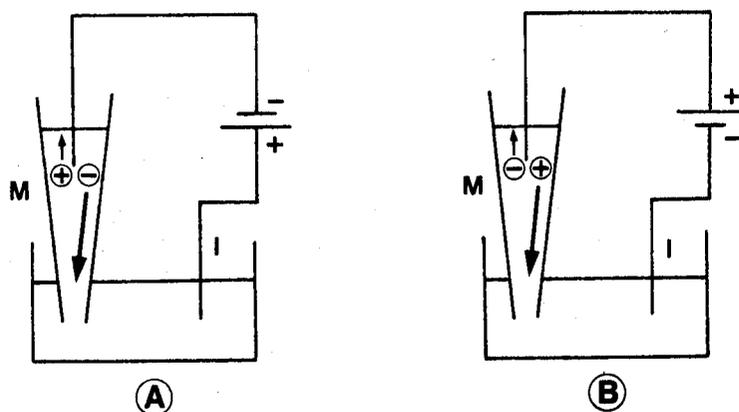


Figure 5 : Schémas montrant le principe de la microiontophorèse.

A : des anions sont éjectés de la micropipette (M) quand celle-ci est rendue négative par rapport au milieu externe,

B : en inversant le sens des courants, des cations sont éjectés de la micropipette.

I : électrode indifférente.

Le nombre transport est déterminé pour chaque substance à une concentration donnée. Il dépend de la solubilité, de la dissociation ionique, de la polarité de la substance. Le nombre transport varie, en outre, d'une micropipette à l'autre.

## 2/ Facteurs intervenant dans l'éjection microiontophorétique

La capacité pour une électrode d'assurer un passage correct des courants et par conséquent une éjection des substances, dépend essentiellement de sa résistance qui doit être à la fois faible et stable. La résistance d'une électrode est proportionnelle à la résistivité de la solution contenue dans celle-ci et est inversement proportionnelle au diamètre interne de sa pointe. Une contamination de la pointe d'électrode par des particules contenues dans la solution ou ayant pour origine le tissu nerveux tend à augmenter la

résistance de l'électrode et à réduire sa capacité de faire passer des courants. Ces fluctuations de résistance, tant qu'elles restent minimales, n'ont pas d'importance puisque des sources de courant constant sont utilisées pour l'éjection iontophorétique.

### 3/ Diffusion spontanée de substances à partir de micropipettes

L'éjection microiontophorétique de substances dépend des caractéristiques physiques de l'électrode ainsi que de la solution contenue dans celle-ci. Ces facteurs sont responsables, en l'absence de courants iontophorétiques, d'une diffusion, hors de la micropipette, de la substance à tester due :

- d'une part, à une différence de concentration de l'ion entre l'intérieur de l'électrode et le milieu externe,
- et d'autre part, à la pression hydrostatique créée par la colonne de liquide placée dans l'électrode en position verticale.

Cependant, en raison de la présence d'une solution concentrée dans la pipette, une entrée d'eau dans la pointe de celle-ci se produit et diminue ainsi la quantité de substance libérée.

De plus, cette "fuite" peut être éliminée par l'application d'un courant de rétention, c'est-à-dire d'un courant de polarité opposée à celle utilisée pour éjecter l'ion actif à partir de l'électrode. Cependant, différentes études montrent qu'un courant de rétention diminue peu la libération spontanée de substances, ou bien crée une déplétion substantielle de la substance active dans la pointe d'électrode, ce qui peut altérer les éjections iontophorétiques subséquentes (KELLY, 1975). Nous n'utilisons pas de courant de rétention au cours de nos expériences. Pour réduire la libération de substances à partir des extrémités des électrodes, les micropipettes ont des pointes relativement fines et les solutions sont peu concentrées.

#### 4/ Relation entre les quantités éjectées et les courants appliqués

L'introduction dans les micropipettes, de composés marqués au carbone <sup>14</sup> ou tritiés permet de déterminer, pour chaque électrode, la relation exacte entre l'intensité du courant appliqué et la quantité de composé libérée. Il est montré qu'à partir de la plupart des micropipettes, une relation linéaire existe entre les deux paramètres (KELLY, 1975).

Cependant, certaines électrodes échouent pour libérer des quantités détectables de substances bien qu'elles aient une faible résistance et qu'elles apparaissent assurer correctement le passage de courants (KELLY, 1975).

Il n'est pas possible d'effectuer une calibration in vitro de chaque électrode, avant son utilisation in vivo. De ce fait, lorsqu'aucun effet de la substance testée n'est obtenu avec une électrode, les résultats sont rejetés de l'analyse. Par contre, une électrode sera de "bonne qualité" lorsque les changements d'activité unitaire en réponse à une substance, seront nettement proportionnels aux intensités des courants iontophorétiques appliqués (SZABADI et BRADSHAW, 1974).

#### 5/ Types d'électrode utilisés en microiontophorèse

##### a) Position du problème

La technique de microiontophorèse nécessite l'utilisation d'électrodes multicanaux pour, d'une part enregistrer l'activité électrique des neurones et d'autre part, délivrer au moyen de courants électriques, différentes substances. Si les électrodes ont un diamètre à la pointe de l'ordre de 1 micron ou moins, les résistances électriques élevées des différents canaux limitent la capacité d'y faire passer des courants.

Lors de l'éjection iontophorétique, il se produit un "bruit électrique" qui peut masquer la réponse de la substance à tester. Pour surmonter cette difficulté, les électrodes multiples sont le plus souvent cassées à leur extrémité afin d'abaisser la résistance électrique des canaux.

Le diamètre à la pointe peut atteindre dès lors, 3 à 10 microns en fonction du nombre de canaux de l'électrode multiple. Les électrodes de ce type sont surtout utilisables pour l'étude de neurones de grande taille (50 à 100 microns) du système nerveux central. Par contre, l'approche de neurones de petite taille (10 à 20 microns) s'avère plus difficile lorsque l'on veut isoler les signaux électriques à partir d'une cellule. L'activité unitaire est petite, difficile à discriminer du bruit de fond, des enregistrements stables sur de longues périodes sont rarement obtenus. Tous ces problèmes sont dûs aux tailles relatives et à l'arrangement spatial des électrodes et des neurones étudiés.

#### b) Solutions possibles

Devant ces difficultés pour l'étude iontophorétique de petits neurones du système nerveux central, plusieurs solutions sont proposées.

##### α) Les électrodes dites "parallèles"

Ces électrodes sont composées d'une micropipette multiple conventionnelle sur le côté de laquelle est fixée une micropipette simple de façon que sa pointe se projette quelques microns à quelques dizaines de microns au-delà de la pointe de la micropipette multiple. En utilisant ce type d'électrode, à la fois l'amplitude et la stabilité de l'activité enregistrée sont grandement améliorées. Différents procédés sont décrits pour l'obtention de ces électrodes (CURTIS, 1968 ; SPEHLMANN, 1969 ; OLIVER, 1971 ; CROSSMAN et coll., 1974 ; TAMURA et MARUYAMA, 1979). Ils consistent en l'assemblage, sous microscope, de deux électrodes, l'une simple, parfois courbée avec un angle spécifique, l'autre multiple préalablement remplie et cassée. Cet assemblage nécessite l'utilisation de micromanipulateurs adaptés et demande, le plus souvent, un temps assez important. Récemment, HAVEY et CASPARY (1980) ont décrit un procédé d'assemblage ne nécessitant ni micromanipulateur adapté, ni courbure de l'électrode d'enregistrement. Les auteurs affirment qu'avec une pratique minime, des micropipettes "parallèles" sont obtenues en 10 à 15 minutes.

β) La combinaison d'une électrode métallique d'enregistrement avec une électrode multiple de verre

Dans ce cas, il est pris avantage du meilleur rapport signal-bruit qu'offrent les électrodes métalliques d'enregistrement (FORD, 1974 ; SONNHOF et coll. 1975).

γ) Les microélectrodes avec une fibre de carbone ultra-fine

La microélectrode d'enregistrement qui contient une fibre de carbone présente un rapport signal-bruit de fond comparable à celui des microélectrodes métalliques. Elle peut être utilisée dans une électrode multiple destinée à l'application iontophorétique de substances (ARMSTRONG-JAMES et MILLAR, 1979).

c) Électrodes utilisées par nous-mêmes

α) Électrodes sans saillie

Elles ont été utilisées pour l'étude des effets de la noradrénaline. En raison des possibilités limitées des électrodes de ce type pour l'étude iontophorétique des petits neurones du système nerveux central, nous nous sommes efforcés d'utiliser d'autres types d'électrode.

β) Électrodes selon FORD (1974)

Nous avons repris la technique décrite par FORD (1974). Elle consiste à remplir l'un des canaux d'une électrode multiple, d'un alliage le CERROLOW dont le point de fusion est faible (70°C). Ce canal sert à l'enregistrement des activités électriques et a les caractéristiques d'une électrode métallique. La principale difficulté de cette technique consiste à mettre en place l'alliage en fusion à la pointe de la microélectrode. Nos tentatives se sont avérées peu efficaces. D'ailleurs, il ne nous semble pas, d'après la littérature, que cette technique ait été reprise.

γ) Electrodes avec saillie du canal d'enregistrement

- Procédé mis au point (CARETTE, 1978 a)

Nous avons tiré parti du fait que, lorsque deux tubes sont partiellement fusionnés, lors d'un étirement les pointes se séparent de quelques microns (TERZUOLO et ARAKI, 1961).

Sur la partie médiane d'une baguette de verre ou d'un tube de verre de longueur 15 cm, de diamètre externe 2 mm, sont fixés, à l'aide d'un mélange talc-silicate de soude, d'une façon décalée, des tubes de verre de longueur 4 cm, de diamètre externe 2 mm, de diamètre interne 1,16 mm, dont l'arrangement et le nombre sont indiqués sur la figure 6. A l'opposé de ces tubes est fixé un tube de longueur 4 à 5 cm, de diamètre externe 4 mm, de diamètre interne 2,5 mm (figure 6). Il est important d'une part que ce tube soit uniquement en contact avec le tube ayant la plus grande longueur dans l'assemblage, d'autre part qu'il ait un diamètre supérieur aux autres canaux afin qu'il ne soit pas nécessaire d'en recasser la pointe après étirement.

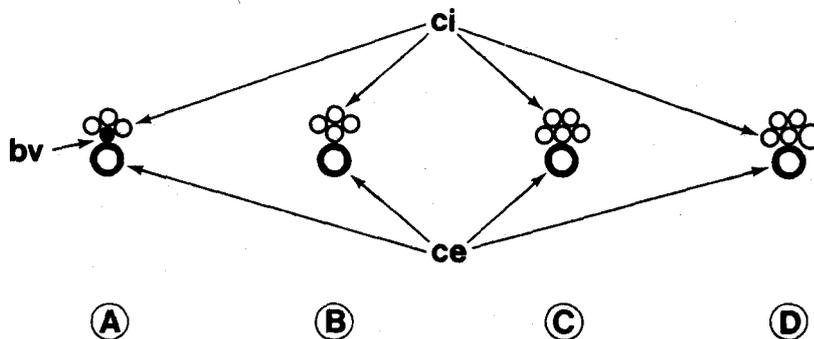


Figure 6 : Schémas montrant différents assemblages de tubes de verre en section transversale.

Abréviations : bv, baguette de verre ; ce : canal d'enregistrement ; ci : canaux pour l'iontophorèse.

Le mélange talc-silicate de soude se durcit lentement à la température ambiante ou plus rapidement dans une étuve portée à une température supérieure. Il a la propriété de résister aux températures élevées dans lesquelles le verre est porté pour être étiré. Les tubes sont chauffés dans la flamme d'un bec Bunsen, fusionnés à leur partie médiane par une torsion, replacés dans leur position initiale, puis étirés manuellement sur une distance de 10 à 20 centimètres. Après cassure au niveau de la zone étirée, les deux parties obtenues sont traitées d'une façon identique. Un petit crochet est confectionné à l'extrémité de la partie étirée. L'étirement final est alors accompli en deux étapes, dans une étireuse NARISHIGE, à l'aide d'un poids suspendu au crochet :

- au cours de la première étape, la partie étirée des tubes est placée dans le filament chauffant de l'appareil; un étirement est alors réalisé sur plusieurs centimètres grâce à un poids de 75 g,
- lors de la deuxième étape, le filament chauffant est recentré sur la partie nouvellement étirée pour l'étirement définitif à l'aide du même poids.

La microélectrode multiple ainsi obtenue présente à son extrémité, une pointe séparée des autres pointes par quelques microns (figure 7A). La pointe isolée appartient au tube ayant le plus grand diamètre. Les autres pointes sont groupées puisqu'elles correspondent à des tubes de l'assemblage qui sont en contact les uns avec les autres en deux points. Sous microscope, les pointes groupées sont doucement cognées contre l'extrémité d'une fine baguette de verre de façon à rendre saillante la pointe isolée de la microélectrode. La saillie obtenue peut varier de 10 à 80 microns (Figure 7B). L'obtention de cette électrode nécessite simplement deux microscopes classiques : l'un permet d'observer l'extrémité de l'électrode tandis que l'autre, sur la platine duquel est placée une baguette de verre, permet d'amener l'extrémité de celle-ci dans le champ du premier microscope.

Afin de consolider l'ensemble des canaux, une couche de vernis est appliquée en passant une goutte de ce produit, sous loupe binoculaire, de la pointe vers la partie supérieure de l'électrode. Le vernis est durci en plaçant la pipette dans une étuve à 100°C. pendant quelques heures. Les différents canaux sont ensuite remplis de solutions variées par action capillaire, facilitée par la présence de fibres de verre dans les tubes de 1,16 mm de diamètre interne (TASAKI et coll. 1968).

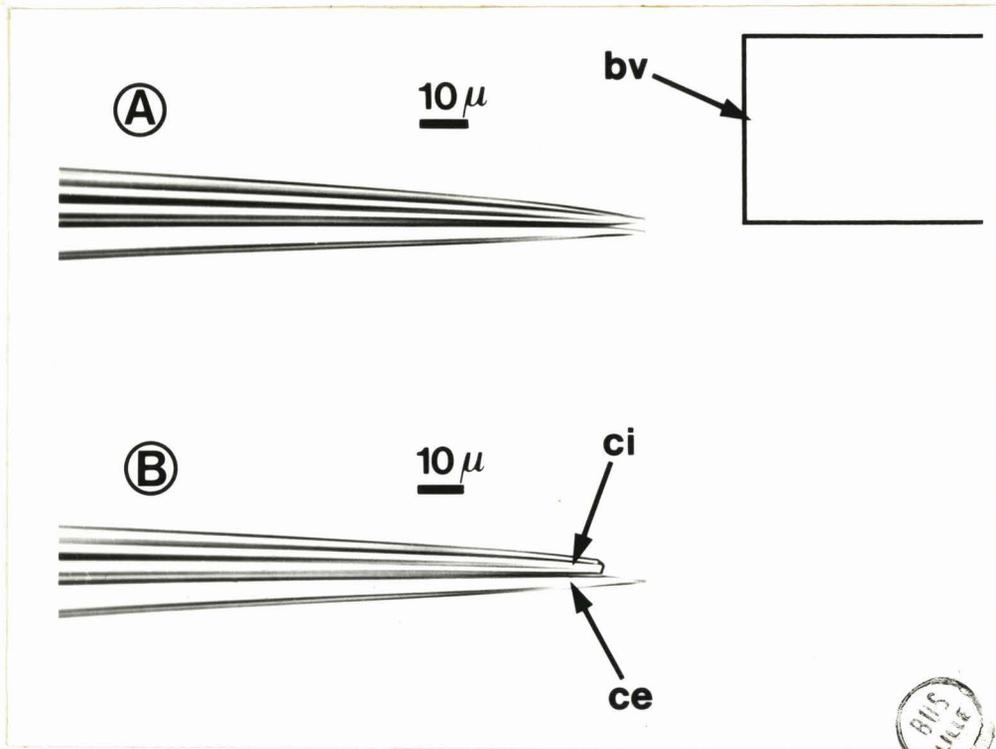


Figure 7 : A : photographie de l'extrémité d'une électrode multiple avec pointes séparées.

B : la même électrode avec projection d'une pointe de 10 microns.

Abréviations : bv : baguette de verre ; ce : canal d'enregistrement ; ci : canaux pour l'iontophorèse.

Par la suite, cette façon de procéder est modifiée en remplaçant le vernis par de l'alpha-cyanoacrylate. C'est un produit qui s'applique sans difficulté, sous loupe binoculaire, près de la pointe des électrodes, qui s'insinue dans les interstices situés entre les tubes de verre en durcissant très rapidement (environ 30 secondes) à la température ambiante. Dans ce cas, l'ordre des différentes étapes peut être modifié. Après étirement, les électrodes sont remplies, l'alpha-cyanoacrylate est appliqué, les pointes groupées sont brisées.

Le canal dont la pointe isolée fait saillie sert à l'enregistrement des activités électriques des neurones. Le plus souvent, sa résistance a une valeur compatible (quelques Mégohms) avec un enregistrement unitaire



extracellulaire puisque le tube de verre correspondant a un diamètre interne égal à 2,5 mm, supérieur à celui des autres tubes (1,16 mm). Si nécessaire, la pointe est brisée sur quelques microns, la résistance électrique est ainsi abaissée, mais cette pointe fait toujours saillie par rapport aux autres canaux.

- Avantages de la méthode

.....

Ce procédé de fabrication d'électrodes est relativement simple à mettre en place. La méthode ne nécessite pas l'assemblage de deux électrodes préalablement fabriquées. Il suffit d'assembler d'une certaine manière, des tubes de verre de diamètre déterminé, pour obtenir, en un temps relativement court, des électrodes multiples avec projection du canal d'enregistrement, d'un coût peu élevé. Lors de l'assemblage, les tubes de verre destinés à la microiontophorèse sont décalés l'un par rapport à l'autre, ainsi sont évitées les interactions électriques entre les solutions des différents canaux.

La résistance d'une électrode est inversement proportionnelle au diamètre interne de sa pointe. Dans le cas où la substance à tester est en solution à une faible concentration, il peut être intéressant d'abaisser la résistance du canal contenant cette substance en augmentant son diamètre à la pointe. Le passage des courants iontophorétiques est ainsi facilité. Ceci peut être obtenu en prenant des tubes de verre de diamètre interne plus important (1,62 mm) que celui (1,16 mm) des tubes habituellement utilisés (figure 6D).

Ce sont des électrodes avec saillie du canal d'enregistrement qui sont utilisées pour les études concernant l'histamine, les enképhalines et les stéroïdes acides (tableau 1). Les enregistrements des potentiels d'action antidromiques permettent l'appréciation du rapport signal/bruit obtenu avec ces électrodes (chapitre I).

## 6/ Source d'artéfacts : le courant électrique

Dans les études microiontophorétiques, l'artéfact le plus fréquent est l'influence polarisante du courant éjectant les substances, sur la membrane du neurone. L'activité électrique des cellules peut être excitée par des courants anioniques tandis qu'elle peut être inhibée par des courants cationiques. Les artéfacts de courant sont habituellement abolis en utilisant une technique de balancement, c'est-à-dire en ayant dans l'un des canaux de la microélectrode multiple, un courant égal au courant microiontophorétique mais de polarité opposée.

Dans le cas où l'électrode d'enregistrement fait saillie, des effets du courant sont plus rarement observés. Cependant, puisque la relation spatiale entre un neurone testé et l'extrémité des électrodes ne peut pas être évaluée, il convient d'effectuer systématiquement un contrôle des courants avant et après les tests concernant les substances. Ce contrôle est réalisé à travers un canal rempli de NaCl 2M.

Nous utilisons soit des courants balancés avec des électrodes ne présentant pas de saillie (étude de la noradrénaline) soit des courants balancés et/ou de contrôle avec des électrodes présentant une saillie du canal d'enregistrement.

## 7/ Appareil utilisé pour l'éjection iontophorétique (figure 8)

Chaque canal d'une microélectrode multiple est relié par l'intermédiaire d'un fil d'argent et d'un câble flexible blindé à un circuit permettant d'appliquer des tensions de 0 à 90 volts réglables grâce à un potentiomètre. Dans le circuit, sont incorporées des résistances de 100 M $\Omega$ . Ainsi sont constituées des sources de courant constant. Les courants utilisés pour l'éjection iontophorétique s'expriment en nanoampères (1 nA = 10<sup>-9</sup> A), leur intensité est contrôlée continuellement sur un galvanomètre avec une précision de  $\pm$  1 nA.

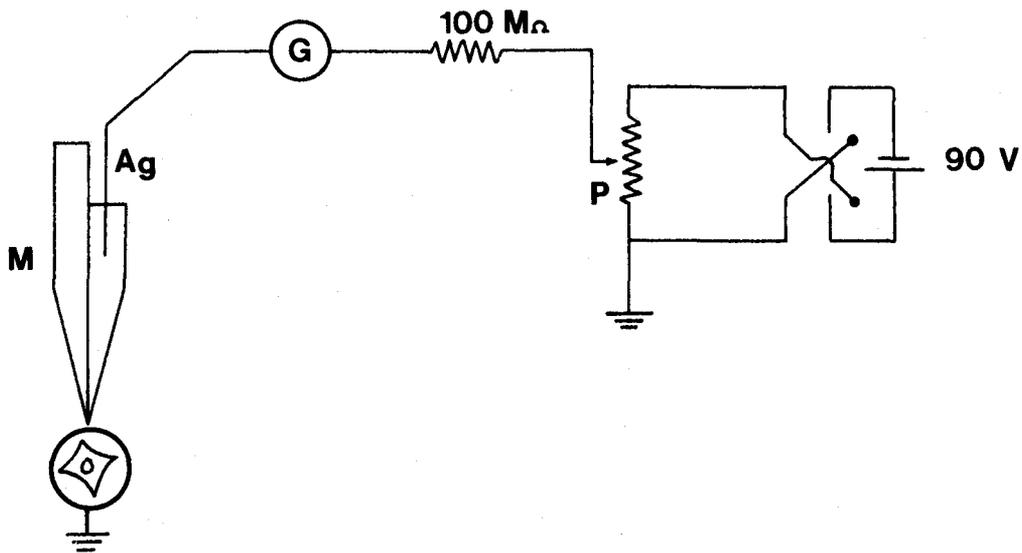


Figure 8 : Schéma du circuit électrique pour la microiontophorèse.

Abréviations : Ag : fil d'argent ; G : galvanomètre ;  
M : micropipette ; P : potentiomètre.

Il est possible que des particules obstruent la pointe des micropipettes au cours de leur pénétration dans le cerveau, surtout lorsqu'une électrode est descendue plusieurs fois. Il en résulte des fluctuations importantes de la résistance des électrodes. Des oscillations des courants passant à travers les canaux, observables sur le galvanomètre, traduisent ces phénomènes. Dans ce cas, il est peu vraisemblable que des quantités consistantes de substances soient éjectées des micropipettes. Aussi, seulement les applications iontophorétiques pour lesquelles les courants sont stables, sont considérées dans nos études.

8/ Tableau résumant les caractéristiques des différentes substances éjectées par microiontophorèse.

Voir page suivante.

Substances testées	Origine	Concentration	Solvant	pH	Polarité du courant d'éjection	Courants balancés et/ou de contrôle
L-glutamate monosodique	SIGMA	1M	Eau distillée	7-8	Courants anioniques (-)	les deux
L-noradrénaline HCl	SIGMA	0,5M	Eau distillée	5	Courants cationiques (+)	Courants balancés
Histamine-dihydrochlorure	MERCK	0,5M	Eau distillée	4	+	les deux
Méthionine-enképhaline Leucine-enképhaline	SERVA	8mM	NaCl 200 mM	5	+	les deux
Naloxone hydrochlorure	Laboratoires ENDO	100mM	NaCl 200 mM	5	+	Courants de contrôle
Magnésium chlorure	PROLABO	1 M	Eau distillée	5	+	Courants de contrôle
Oestradiol 7 $\alpha$ acide butyrique	Laboratoire du Professeur BAULIEU	10 <sup>-5</sup> M 10 <sup>-6</sup> M	Eau distillée	7,2	-	Courants de contrôle
11-désoxycorticostérone 7 $\alpha$ /7 $\beta$ acétique	"	10 <sup>-6</sup> M	Eau distillée	7,2	-	Courants de contrôle
Androsta-4-ène-3, 17-dione- 7 $\alpha$ acétique	"	10 <sup>-6</sup> M	Eau distillée	7,2	-	Courants de contrôle
20-carboxy-pregna-1,4-diène-3 one	"	10 <sup>-6</sup> M	Eau distillée	7,2	-	Courants de contrôle

Tableau 1



## B - LA PRESSION

### 1/ Principe

La substance à tester est éjectée à partir d'une micro-pipette, dans un volume de solvant, sous l'effet d'une pression.

### 2/ Facteurs intervenant dans l'éjection par pression

#### a) Le diamètre interne de la pointe d'électrode

C'est sans aucun doute, le facteur le plus important. Des changements minimes dans le diamètre interne peuvent entraîner des variations importantes dans les volumes éjectés pour une pression donnée (SAKAI et coll., 1979 ; PALMER et coll., 1980). Par conséquent, la moindre particule dans les solutions remplissant les différents canaux d'une électrode et surtout l'obstruction partielle ou totale des pointes par des éléments du tissu nerveux, entraînent une variabilité des volumes éjectés à partir d'une pipette. C'est sans doute ce qui explique pourquoi cette méthode, apparue dès 1963 (KRNJEVIC et PHILLIS, 1963), n'est pas utilisée d'une façon intense depuis. Ces auteurs l'ont d'ailleurs employée pour contrôler la possibilité que les changements de l'activité nerveuse ne soient pas dus à des effets des courants iontophorétiques.

#### b) La viscosité du solvant

SAKAI et coll. (1979) montrent l'influence de ce facteur en observant des éjections de solutions éthanoliques plus importantes que celles des solutions aqueuses pour une pression donnée.

### 3/ Diffusion spontanée de substances à partir de micropipettes multiples

Lorsqu'une pression n'est pas appliquée, il se produit une diffusion spontanée de la substance dont les causes sont indiquées dans le paragraphe consacré à l'iontophorèse. L'utilisation d'une pression négative permet de réduire la libération des substances non ionisables. Cependant, l'application de cette pression négative peut entraîner une diminution ou même un arrêt de la sortie des substances lorsqu'une pression positive est appliquée (KELLY, 1975).

### 4/ Relation entre les quantités éjectées et les pressions appliquées

Les quantités éjectées à partir de micropipettes, par application de différentes pressions, sont mesurées de deux façons :

#### a) Mesure des dimensions de la goutte formée à l'extrémité de la pointe des électrodes

Les gouttes sont éjectées dans de l'huile et la mesure du diamètre des gouttes sphériques formées à différentes pressions est effectuée sous microscope, à l'aide d'un oculaire micrométrique. Les volumes obtenus présentent une relation linéaire avec les paramètres pression et durée d'application de la pression (Mc CAMAN et coll., 1977 ; SAKAI et coll., 1979). Cependant, selon SAKAI et coll. (1979), cette relation linéaire n'existe que pour des microélectrodes dont le diamètre à la pointe est compris entre 0,6 et 1,2 micron.

#### b) Mesure à l'aide de radioisotopes

Les volumes éjectés par pression peuvent être mesurés à l'aide de solutions radioactives. La même relation linéaire est obtenue avec cette méthode (Mc CAMAN et coll., 1977 ; SAKAI et coll., 1979 ; PALMER et coll., 1980).

### c) Comparaison des deux méthodes

En raison de l'imprécision possible de la mesure du diamètre des gouttes, certains auteurs (Mc CAMAN et coll., 1977 ; SAKAI et coll., 1979) comparent les résultats obtenus par les deux méthodes. Leurs données acquises avec des mesures radioisotopiques sont en accord avec les estimations faites en mesurant le diamètre des gouttes sphériques, indiquant la validité de cette dernière méthode pour une quantification des volumes éjectés.

## 5/ Résultats obtenus avec nos électrodes

### a) Description des électrodes utilisées

Pour des raisons précédemment exposées dans le paragraphe iontophorèse, nos électrodes présentent une saillie du canal d'enregistrement, et sont fabriquées d'une manière similaire à celle décrite auparavant. Quelques modifications sont apportées à la construction de ces électrodes. Les tubes destinés à l'application par pression sont courbés afin de recevoir les supports pour électrodes (modèle EH-2S, W.P. Instruments). En raison des variations de diamètre externe des tubes de verres ( $2 \text{ mm} \pm 0,1$ ), les deux canaux utilisés pour l'application par pression sont issus du même tube de longueur 15 cm, coupé en deux parties égales qui sont courbées puis assemblées aux autres tubes. Dans le cas où trois canaux sont destinés à l'application par pression, les tubes choisis ont un diamètre externe sensiblement identique. Les électrodes étirées sont remplies, leurs pointes sont siliconisées par immersion, durant quelques secondes, dans du SURFACIL non dilué (PIERCE). Ce traitement facilite la formation d'une goutte sphérique à la pointe de l'électrode, empêchant la solution éjectée par pression de remonter le long de la pointe. Quelques minutes plus tard, les 5 pointes groupées sont brisées sous microscope, de façon que la pointe du 6ème canal fasse saillie.

b) Système d'éjection par pression (figure 10)

Des supports EH-2S sont fermement attachés aux extrémités supérieures des tubes courbés, ce système pouvant supporter une pression maximum de 7 bars (1 bar = 14,50 psi). Par l'intermédiaire de raccords OMNIFIT et de tubes plastiques rigides, les supports sont reliés à 2 voies d'un robinet à 3 voies (0,30 Bot, OMNIFIT). La 3ème est connectée à une valve, contrôlée manuellement, qui permet d'appliquer la pression aux deux canaux. Dans le cas où trois canaux sont nécessaires pour l'application par pression, ce robinet à 3 voies est remplacé par un robinet à 8 voies (0,80 Bot, OMNIFIT). La source de pression est une bouteille d'azote comprimé, associée à un manomètre (0,1 à 6 bars).

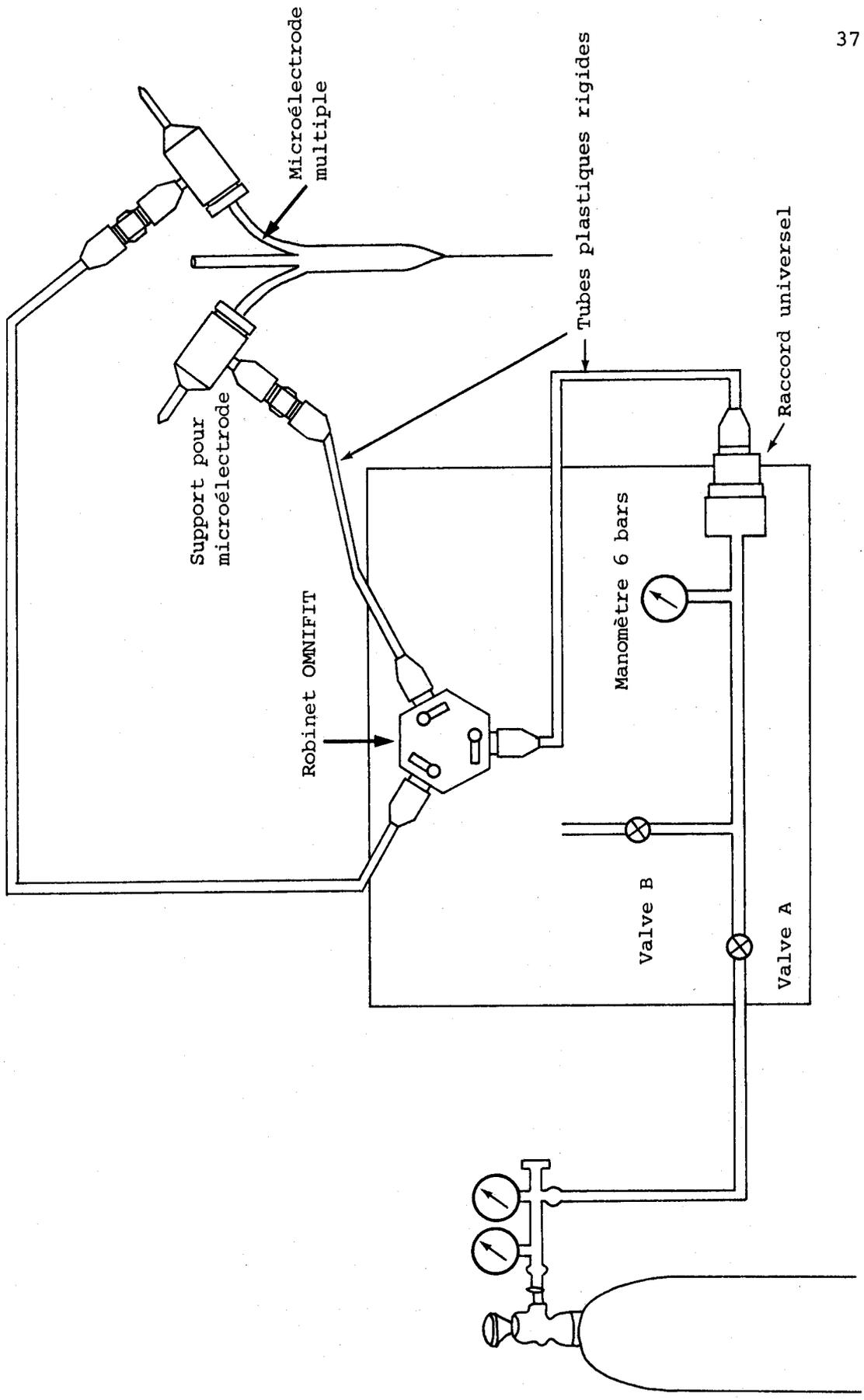
c) Quantification des volumes éjectés

Cette quantification est réalisée en mesurant, sous microscope, à l'aide d'un oculaire micrométrique, le diamètre des gouttes sphériques formées à la pointe des microélectrodes (figure 11), à la suite de l'application d'une pression (0,1 à 6 bars) pendant un temps donné (5 ou 10 secondes). Les volumes éjectés s'expriment en picolitres par secondes ( $10^{-12}$ /sec.).

La mesure des volumes éjectés par pression est effectuée pour différentes valeurs de la saillie du canal d'enregistrement. Avec des électrodes dont la saillie est égale à 20 microns, des pressions allant jusque 6 bars sont parfois inefficaces pour l'éjection d'une solution. Ou bien, il y a une latence importante avant que l'éjection ne se produise (jusque 5 secondes, selon la valeur de la pression appliquée) et dans ce cas, il n'y a pas de relation linéaire entre les volumes éjectés et les pressions appliquées (figure 12).

Lorsque la séparation entre les pointes des canaux atteint 80 microns, de faibles pressions (0,2 à 0,3 bar) entraînent des éjections trop importantes de solutions (figure 12) qui peuvent être à l'origine d'artéfacts.

Figure 10 : Dispositif expérimental pour l'application par compression, à partir de micropipettes multiples, de substances.



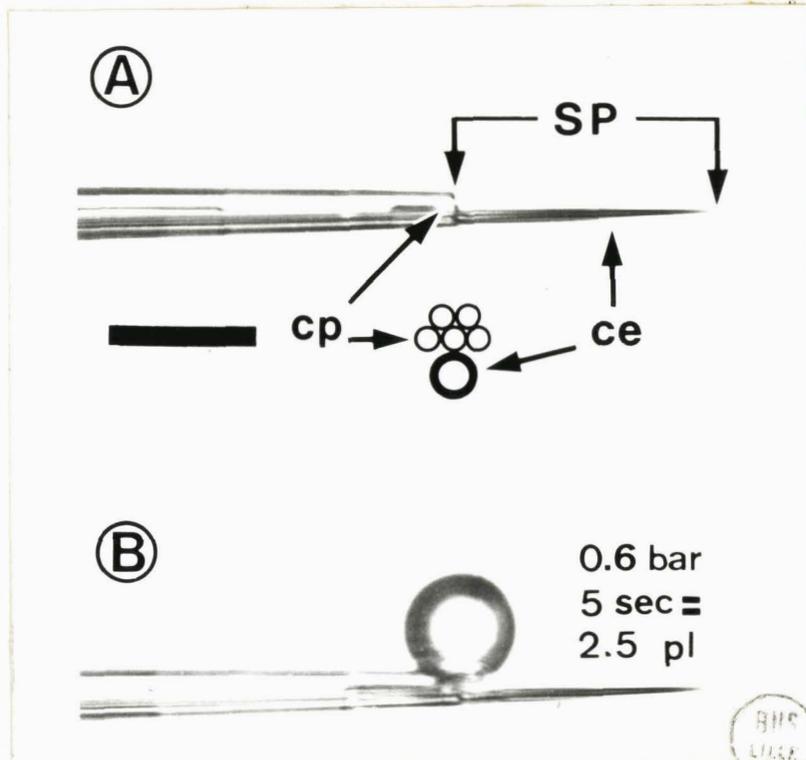


Figure 11 : A : Photographie d'une pointe de microélectrode présentant une saillie de 40 microns. En-dessous, assemblage des tubes de verre montrés; en section transversale.

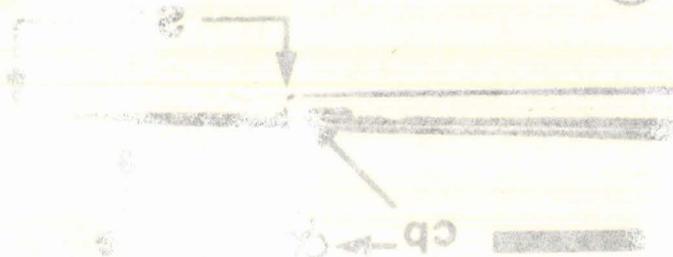
Calibration : 20 microns pour la photographie, 12 mm pour le schéma.

B : Calibration in vitro : une goutte de solution est éjectée avec une pression de 0,6 bar pendant 5 secondes dans de l'huile.

Abréviations : ce, canal d'enregistrement ; cp, canaux pour la pression ; SP, séparation des pointes.

Les microélectrodes présentant une saillie de 40 microns apparaissent les mieux adaptés pour obtenir une bonne relation linéaire entre les volumes éjectés et les pressions appliquées dans une gamme de valeurs utilisables.

Ⓐ



Ⓑ



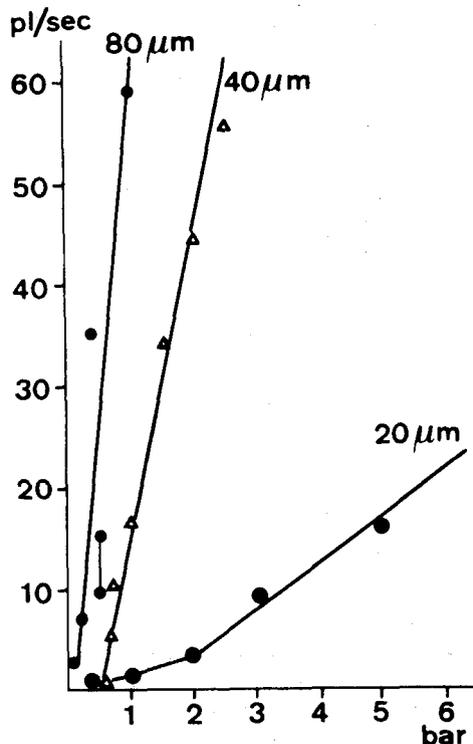


Figure 12 : Effets de pressions variées sur les éjections (exprimées en picolitre par seconde : pl/sec.) de solutions à partir de microélectrodes ayant des saillies de 20, 40 et 80 microns. La reproductibilité des éjections est testée en appliquant chaque pression deux fois : les volumes sont identiques, sauf dans le cas indiqué par une ligne verticale pour l'électrode dont la saillie est égale à 80 microns.

d) Application in vivo avec le glutamate

α) Calibration in vitro

Par les mesures effectuées au préalable, il apparaît indispensable de réaliser systématiquement, pour chaque électrode utilisée, une calibration afin de déterminer dans quelle gamme de pression il convient d'expérimenter. Une électrode ne sera utilisée que dans la mesure où les 2 ou 3 canaux montrent des éjections analogues pour une pression donnée et si une reproductibilité des volumes éjectés par une même pression est obtenue.

β) Effets du glutamate appliqué par pression

Le glutamate a été choisi parce que c'est une substance connue pour avoir un effet excitateur sur la plupart des neurones du système nerveux central. Comme montré dans la figure 13 A, l'effet du glutamate appliqué par pression se manifeste rapidement. Il est confiné à la période d'application et son amplitude est fonction de la valeur de la pression appliquée. L'éjection, sur un même neurone, du glutamate par pression ou par iontophorèse ne révèle pratiquement aucune différence dans les effets obtenus (figure 13 A). Il peut simplement être noté que la libération par pression conduit à un effet dont la latence est un peu plus grande. Une observation similaire est rapportée par KRNJEVIC et PHILLIS (1963).

γ) Application du solvant du glutamate

A partir d'un canal adjacent, le solvant (eau distillée) du glutamate est appliqué par pression afin de déterminer s'il peut être à l'origine d'artéfacts sur l'activité unitaire des neurones étudiés. Dans certains cas, l'application du solvant entraîne une inhibition instantanée de l'activité spontanée. L'amplitude et le décours de cette action inhibitrice sont en relation avec le débit du solvant (figure 13 B).

δ) Application d'une solution saline physiologique

La modification de l'environnement ionique du neurone par le volume d'eau distillée peut être à l'origine de l'inhibition de l'activité électrique. Aussi, quelques expériences sont-elles effectuées avec des électrodes contenant une solution saline physiologique dont la composition est la suivante : NaCl, 137 ; KCl, 2,49 ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.30 ; CaCl, 2 ;  $\text{MgCl}_2$ , 1 ;  $\text{NaHCO}_3$ , 12 (en millimoles par litre). De nouveau, des résultats similaires à ceux précédemment décrits pour l'eau distillée sont obtenus (figure 13 C). En raison d'une interaction possible entre le volume de solution saline éjecté par pression et la libération spontanée de glutamate qui pourrait expliquer les effets observés, des électrodes n'ayant pas de canal rempli de la substance excitatrice sont utilisées et conduisent aux mêmes observations.

FIGURE 13 : A : Enregistrement graphique de l'activité unitaire d'un neurone. L'activité est intégrée sur des périodes fixes. Le glutamate (G) est appliqué par pression. Les barres horizontales sous l'enregistrement montrent la durée d'application. Les nombres indiquent les valeurs de pression. Les lignes pointillées au-dessus de l'enregistrement indiquent l'éjection iontophorétique de glutamate exprimée en nanoampères. La valeur de la séparation des pointes de la microélectrode (SP) est de 40 microns. L'effet du glutamate, éjecté par iontophorèse (33 nA) est comparable, en amplitude, à l'application de la substance à l'aide d'une pression de 1 bar.

B.F. : Effets bloquants d'une solution appliquée par pression (eau distillée : ED ou solution saline physiologique : P) sur une activité spontanée ou une activité induite par le glutamate.

B : Effets inhibiteurs de l'eau distillée sur une activité spontanée.

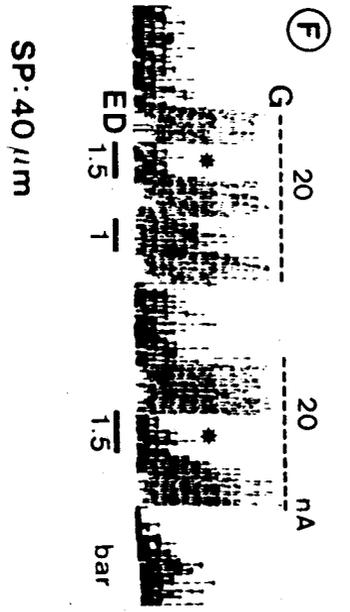
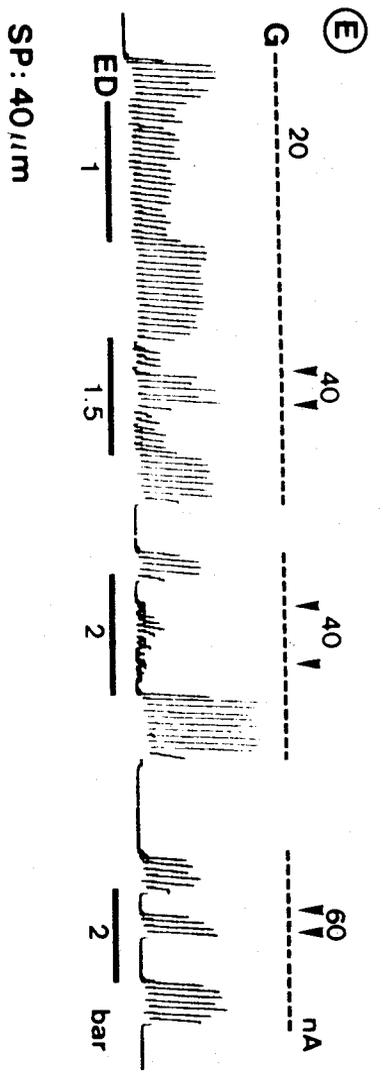
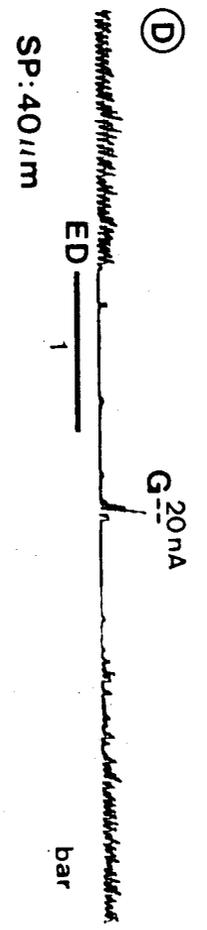
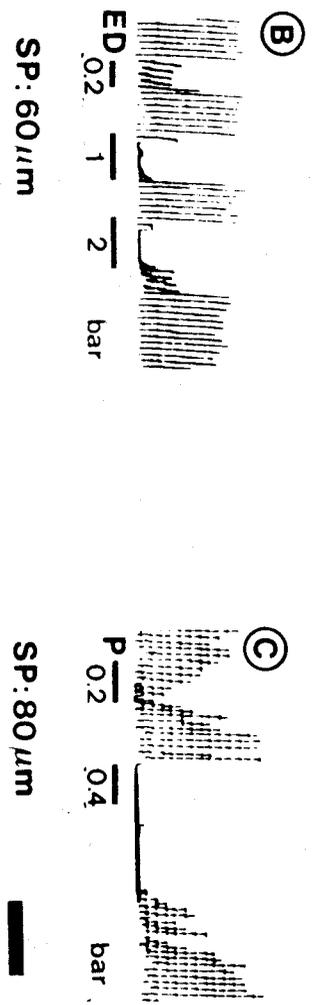
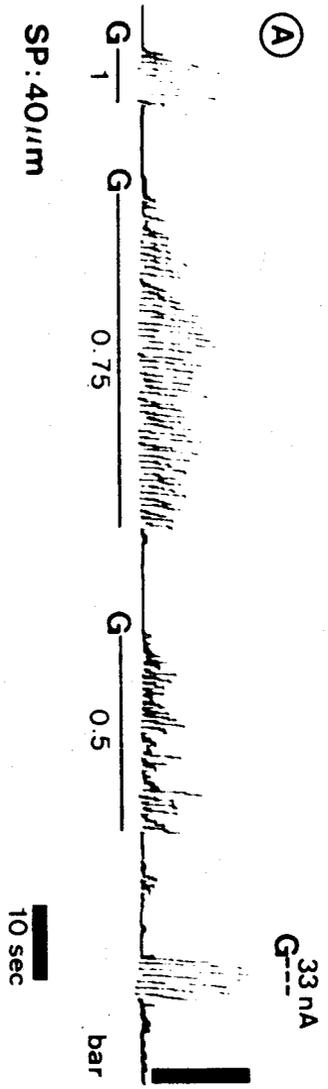
C : Inhibition d'une activité spontanée par une solution saline physiologique.

D : Inhibition de longue durée d'une activité spontanée par de l'eau distillée. L'application iontophorétique de glutamate durant la période d'inhibition provoque une excitation.

E : L'eau distillée inhibe une activité induite par le glutamate. Cette inhibition est contrecarrée par l'application iontophorétique de glutamate.

F : Inhibition par l'eau distillée d'une activité induite par le glutamate. La réponse au glutamate du neurone actif spontanément est totalement bloquée tandis que l'activité spontanée (astérisque) n'est pas modifiée.

Calibration : barre verticale : 10 potentiels d'action. Ces potentiels sont intégrés pendant 1 seconde (A, B, C, D, E) ou 500 msec (F).



8115  
L114E

Les inhibitions sur l'activité spontanée peuvent s'expliquer par un effet mécanique provoqué par le volume de solution éjecté poussant, éloignant le neurone de la pointe d'électrode d'enregistrement. En fait, dans très peu de cas, il y a diminution d'amplitude des potentiels d'action, sans modification de la fréquence de décharge. L'effet solvant habituellement observé est caractérisé par une diminution progressive de l'activité unitaire jusqu'au blocage complet sans diminution notable de l'amplitude des potentiels d'action. Le glutamate, appliqué par iontophorèse, est d'ailleurs capable d'exciter le neurone dont l'activité est complètement bloquée par le solvant (figure 13 D). Ceci prouve que le neurone, bien que silencieux, est encore présent sous la pointe de la microélectrode et que les mécanismes post-synaptiques ne sont pas altérés durant cette période d'inhibition. L'effet observé peut donc résulter d'un blocage de la transmission synaptique, provoqué par le volume de solution éjecté.

Certains auteurs (LENG, 1980 ; PALMER et coll., 1980) indiquent que l'activité unitaire de neurones testés avec des applications de quelques picolitres de solutions salines n'est pas affectée. Par contre, PALMER et coll. (1980) observent des modifications de l'activité neuronale en éjectant par pression de l'eau distillée et indiquent l'importance d'utiliser du NaCl 165 mM comme solvant des substances éjectées par pression. Dans le cas des travaux de LENG (1980), les volumes de NaCl 0,15 M sont sans doute éjectés avec un débit trop faible (inférieur à 2 pl/sec.) pour modifier l'activité des neurones. La discordance entre les observations de PALMER et coll. (1980) et les nôtres est difficilement explicable. Il est à noter que d'autres auteurs (GORDON et coll., 1979 ; MALPELI et coll., 1979) ont également observé une perte transitoire de l'activité unitaire de neurones in vivo, par l'application juxtacellulaire de volumes de solution saline isotonique.

6/ Caractéristiques des substances éjectées par pression (tableau 2)

Substances testées	Origine	Concentration	Solvant	pH
L-glutamate monosodique	SIGMA	1M	Eau distillée	7
17 $\beta$ -oestradiol	CALBIOCHEM	$2 \times 10^{-5}$ M	Ethanol + Eau distillée (Concentration finale d'éthanol: 2 %)	7
Cortisol	CALBIOCHEM	$2 \times 10^{-5}$ M	Ethanol + Eau distillée (Concentration finale d'éthanol: 2 %).	7



### C - EJECTIONS PAR PRESSION ET PAR IONTOPHORESE SIMULTANEMENT

Les neurones hypothalamiques, surtout les neurones endocrines, présentent souvent une activité unitaire spontanée faible ou nulle (RICHARD et coll., 1978). Ainsi bien souvent, il est nécessaire de tester des substances sur des activités induites par le glutamate. Dans le cas de la microiontophorèse, l'application de plusieurs courants pour l'éjection simultanée de différentes substances est possible. Nous avons voulu déterminer dans quelles conditions une éjection simultanée de glutamate par iontophorèse et d'une substance par pression est possible.

Une activité induite par le glutamate peut être plus ou moins inhibée, selon le débit de la solution d'eau distillée appliquée par pression (figure 13 E). L'effet bloquant s'établit rapidement, est réversible immédiatement ou en quelques secondes. Dans tous les cas, cet effet bloquant peut être surmonté en augmentant l'intensité du courant iontophorétique pour l'éjection du glutamate (figure 13 E). Ces observations suggèrent que la période d'inhibition est due à une dilution des ions glutamate par le solvant, qui ne sont donc plus capables d'atteindre la membrane postsynaptique en quantités suffisantes. Cette interprétation est d'ailleurs fortement appuyée par l'observation illustrée par la figure 13 F. Une nette inhibition de la réponse induite par le glutamate est obtenue sans réduction de l'activité spontanée du neurone. Ceci exclut la possibilité que l'inhibition par l'eau distillée de l'activité induite par le glutamate soit attribuable à un effet direct sur le neurone. Ceci suggère également que l'effet bloquant est obtenu sur l'activité spontanée avec des volumes éjectés plus élevés que ceux nécessaires pour inhiber l'activité induite par le glutamate.

### D - PROTOCOLE EXPERIMENTAL A SUIVRE DANS LE CAS D'UNE EJECTION PAR PRESSION

En raison de l'importance du diamètre de la pointe des électrodes pour l'éjection par pression, il est indispensable d'effectuer une calibration in vitro, sous microscope, de chaque microélectrode avant son utilisation in vivo.

Lorsque la pipette est descendue dans le cerveau, un effet solvant sur l'activité unitaire des neurones peut survenir avec des éjections de solutions de volumes bien différents d'un neurone à l'autre. Ceci indique l'importance dans les effets solvants de la relation spatiale entre la pointe de la microélectrode et le corps cellulaire du neurone enregistré. Dans la pratique, lorsqu'un effet solvant est obtenu, des éjections graduelles sont effectuées afin de déterminer la valeur de pression pour laquelle aucun effet solvant n'est obtenu. Ensuite, la substance à tester est éjectée avec une pression de valeur inférieure à celle trouvée précédemment. Cette façon de procéder est illustrée par la figure 14.

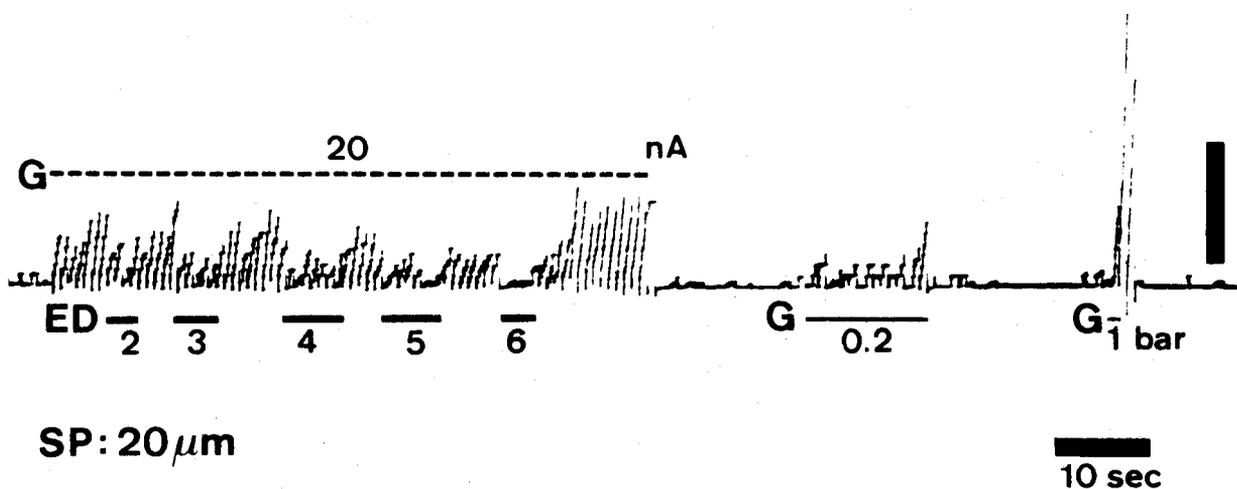


Figure 14 : Enregistrement graphique de l'activité unitaire d'un neurone hypothalamique. L'eau distillée (ED) a des effets solvants sur une activité induite par le glutamate pour des pressions supérieures à 2 bars. Le glutamate (G) est testé avec des valeurs inférieures à cette pression et produit une excitation.

En raison du fait que les pointes des électrodes peuvent s'obstruer plus ou moins dans le tissu nerveux, il nous apparaît indispensable de bien vérifier que les éjections à partir des deux canaux sont identiques pour une pression donnée, sous microscope, après l'expérimentation, afin de valider les observations effectuées.

Dans les études utilisant la pression pour éjecter des substances, à partir de micropipettes in vivo (KRJENIC et PHILLIS, 1963 ; BEN BARAK et coll., 1977 ; ZIEGLGANSBERGER et coll., 1979 ; MARWAHA et coll., 1980 ; PALMER et coll., 1980), aucun protocole expérimental précis n'est décrit. Seuls, BEN BARAK et coll. (1977) indiquent une calibration in vitro, sous microscope, en mesurant le diamètre des gouttes formées. Cependant, il n'y a aucune indication d'une calibration systématique pour chaque électrode utilisée in vivo, ni d'une calibration effectuée après utilisation de l'électrode dans le cerveau.

## VI - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Au cours de l'expérimentation, certains sites d'enregistrement sont repérés grâce au dépôt d'un colorant contenu dans la microélectrode d'enregistrement. Le colorant est éjecté de la pipette grâce à un courant (5 à 6  $\mu$ A pendant 5 à 10 minutes pour le vert rapide, 1  $\mu$ A pendant quelques minutes pour le bleu Alcian).

### 1/ Prélèvement et fixation du cerveau

En fin d'expérience, une lame de scalpel est fixée sur le support d'implantation stéréotaxique pour l'électrode d'enregistrement. Le cerveau est alors coupé transversalement dans un plan parallèle à celui des traces de microélectrodes. L'animal est enlevé de l'appareil stéréotaxique, sacrifié, le cerveau prélevé puis fixé pour repérage histologique. La fixation est réalisée dans du formol 10 %, pendant au moins 48 heures.

### 2/ Confection des coupes

Des coupes frontales (parallèles au plan des traces des microélectrodes), d'une épaisseur de 100 microns, sont obtenues par la technique de congélation, grâce à un microtome à glissières horizontales (LEITZ), muni d'un porte-objet permettant de congeler le bloc de tissu nerveux (dispositif

de type PELCOOL MSE). Les coupes sont recueillies dans une solution contenant de la gélatine et de l'alcool à 80°, placées sur des lames et séchées dans une étuve à 37°C. Les coupes sont colorées par la thionine ou le crésyl-violet.

### 3/ Examen des coupes

L'examen histologique permet de localiser dans le tissu nerveux, les dépôts de colorant, les traces laissées par les microélectrodes et l'extrémité des électrodes de stimulation.

A partir de ces observations, les sites d'enregistrement et de stimulation sont replacés sur des schémas de coupes frontales d'hypothalamus.

CHAPITRE I

---

IDENTIFICATION ET LOCALISATION DE NEURONES  
ENDOCRINES PARVOCELLULAIRES

---

---

## I - PRINCIPE DE L'IDENTIFICATION ANTIDROMIQUE

La technique de l'identification antidromique permet de reconnaître, dans le système nerveux central, les corps cellulaires de neurones dont les terminaisons axoniques sont bien localisées. Au niveau de l'hypothalamus, cette technique a d'abord été utilisée pour s'assurer que l'activité unitaire, enregistrée dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires, provenait de neurones dont les terminaisons axoniques se situaient dans la neurohypophyse (YAGI et coll., 1966), puis reprise pour identifier les neurones endocrines parvocellulaires (YAGI et SAWAKI, 1970 ; MAKARA et coll., 1972).

Dans notre étude électrophysiologique pour identifier, étudier puis localiser des neurones endocrines parvocellulaires chez le cobaye, une électrode de stimulation est placée, par voie dorsale, dans la région de l'éminence médiane, des chocs de stimulation étant délivrés toutes les 750 msec. Une électrode d'enregistrement explore l'ensemble de l'hypothalamus ainsi que le septum et les noyaux de la bande diagonale de BROCA selon des coordonnées stéréotaxiques fournies par l'atlas de POULAIN (1974).

La stimulation électrique d'une terminaison axonique provoque la naissance d'un potentiel d'action qui se propage ensuite dans une direction antidromique, le long de l'axone et envahit, plusieurs milli-secondes plus tard, le corps cellulaire du neurone. Le potentiel d'action ainsi évoqué possède plusieurs caractéristiques :

- il survient avec une latence constante après chaque stimulation (figure 15 B1). La valeur de ces latences varie de 2 msec à 30 msec (figure 15 A1, B1, C),
- il suit des stimulations répétitives dont la fréquence est égale au moins à 100 Hz (figure 15 A2). La forme des potentiels d'action, à la suite d'une stimulation de fréquence élevée, est modifiée, attribuable sans doute à la période réfractaire relative de l'ensemble soma-dendrites (SAWAKI et YAGI, 1973),
- il entre en collision avec un potentiel d'action orthodromique, preuve que le potentiel d'action évoqué n'est pas d'origine trans-synaptique.

Le principe du test de collision repose sur l'observation que deux potentiels d'action se déplaçant le long d'un axone, l'un dans le sens antérograde, l'autre dans le sens rétrograde, s'annulent l'un l'autre. Ce test est illustré par les figures 15 A3, B5, C et 16 C ; il est représenté schématiquement par la figure 17. Un stimulus est appliqué au niveau de la terminaison axonique d'un neurone peu après qu'un potentiel d'action spontané soit enregistré au niveau de son corps cellulaire.

Le potentiel d'action évoqué par la stimulation n'atteint pas le corps cellulaire du neurone. La collision aboutit à une période après un potentiel d'action spontané, durant laquelle aucune réponse à la stimulation n'est observable. Cette période est appelée l'intervalle de collision  $c$  entre le potentiel d'action spontané et le stimulus qui est égal au temps que met le potentiel pour aller du corps cellulaire jusqu'à l'aire de stimulation (c'est-à-dire la latence  $l$ ) plus la période réfractaire ( $r$ ) de l'axone au niveau de la terminaison.

$$c = l + r$$

Un exemple de la détermination de l'intervalle de collision est donné par la figure 16.

En pratique, le test de collision est réalisé en déclenchant automatiquement par un potentiel d'action spontané, le stimulus à des intervalles de temps variables. De nombreux neurones endocrines sont sans activité spontanée. Dans ce cas, le test de collision est effectué à l'aide de potentiels d'action induits par le glutamate. Dans les études concernant les effets des neurorégulateurs sur des neurones endocrines, les microélectrodes multiples utilisées comportent presque toujours un canal rempli d'un amino-acide excitateur, le glutamate. Outre la réalisation du test de collision, cette substance permet de faire la discrimination entre les potentiels d'action à partir d'un corps cellulaire et ceux à partir d'un axone (FRIES et ZIEGLANSBERGER, 1974) et ainsi d'avoir la certitude que les substances sont testées sur des corps cellulaires.

FIGURE 15 : Réponses antidromiques à la stimulation de l'éminence médiane.

A1 : Neurone activé antidromiquement ; latence fixe du potentiel d'action : 27 msec.

A2 : Réponses à 3 stimuli (fréquence : 166 Hz).

A3 : Absence de réponse antidromique (astérisque). Le stimulus est déclenché par un potentiel d'action spontané.

B1 : Potentiel d'action antidromique présentant un décrochement dans sa phase ascendante (composantes a et b).

B2 : Latence fixe de la composante a ; latence variable de la composante b (superposition de trois clichés).

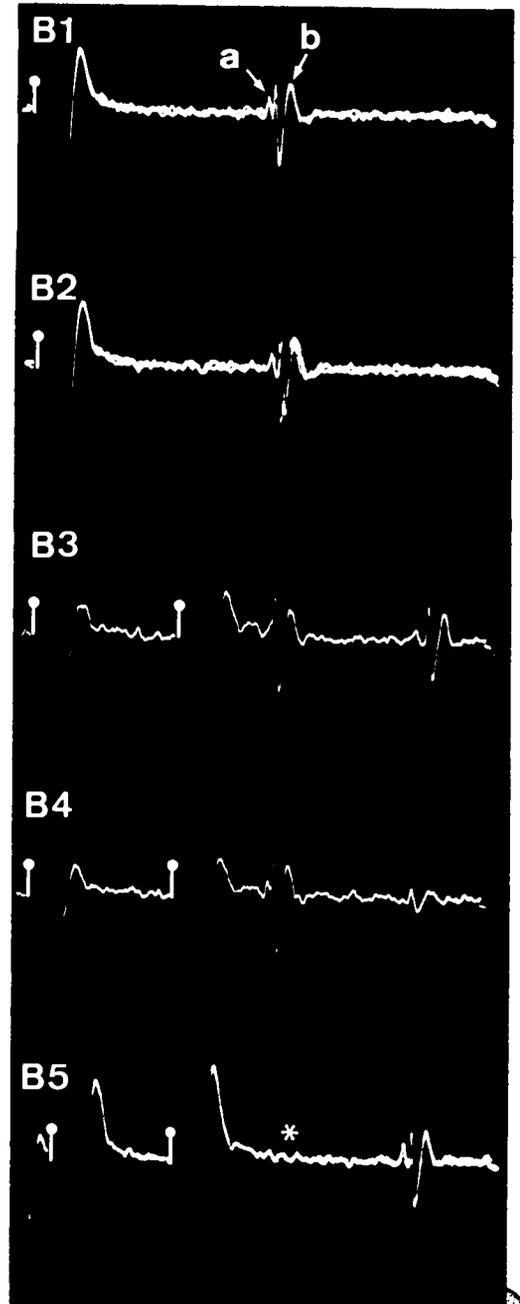
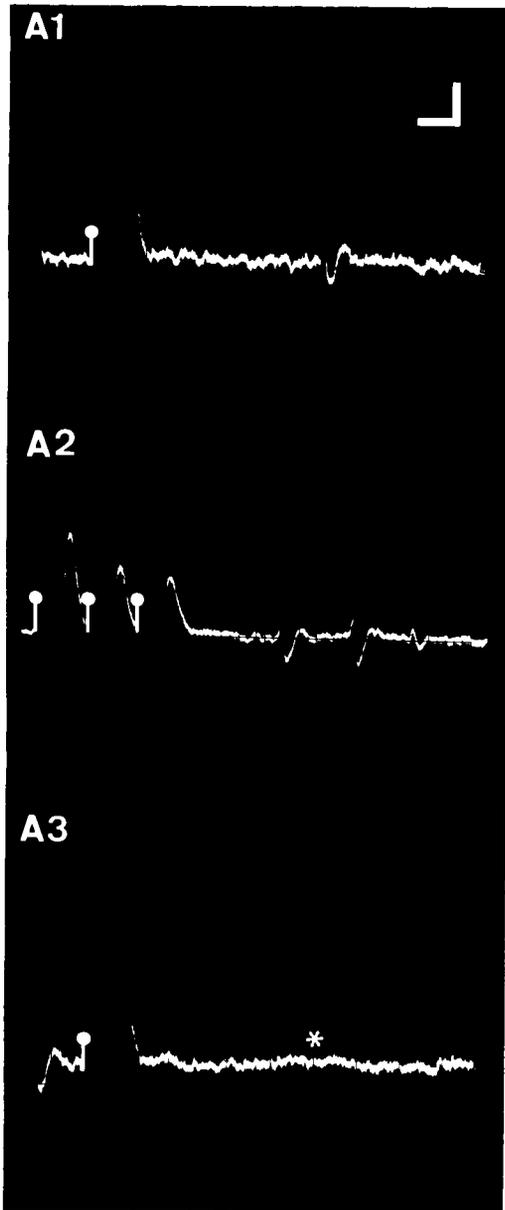
B3 : Fractionnement des deux composantes par 2 stimuli.

B4 : En réponse au 2ème stimulus, seule la composante a apparaît.

B5 : Il y a collision entre le potentiel d'action spontané et le potentiel évoqué par le 1er stimulus (astérisque).

C : Réponse antidromique d'un neurone préoptique ; latence : 6 msec. ; phénomène de collision (astérisque).

Calibration : 5 msec, 0,2 mV ; I : artéfact de stimulation ; positivité vers le haut.



HHS  
L111E

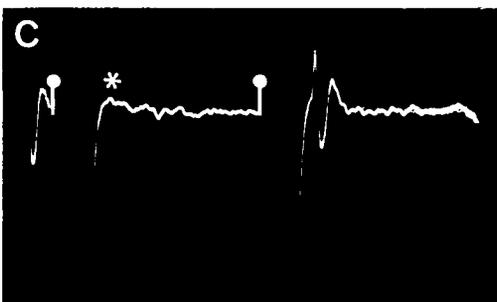


FIGURE 16 : Potentiels d'action antidromiques d'un neurone préoptique en réponse à la stimulation de l'éminence médiane.

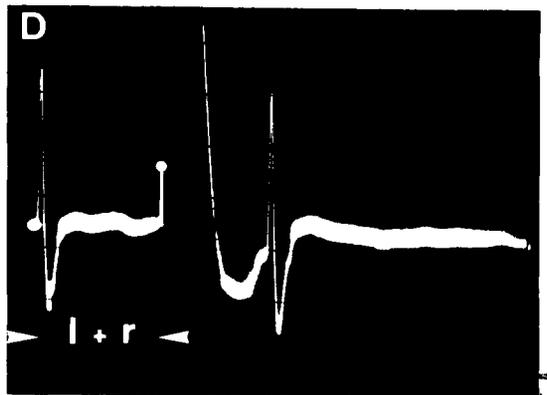
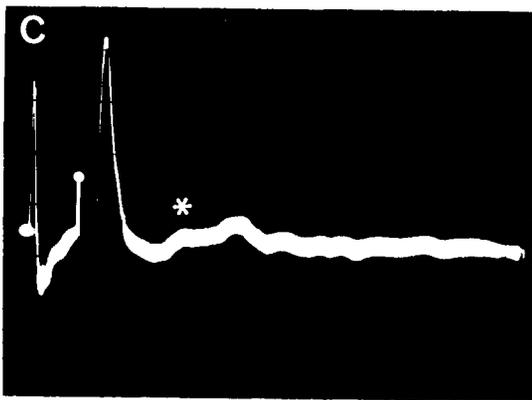
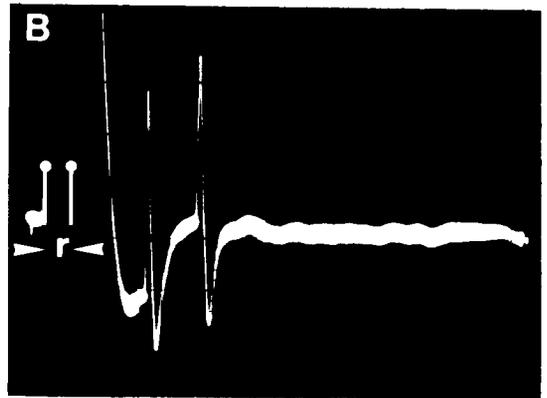
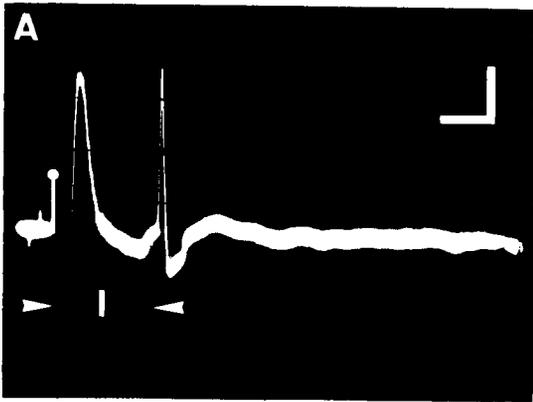
A : Ce neurone a une latence (l) égale à 9 msec.

B : Pour déterminer la période réfractaire absolue (r) du neurone, deux stimuli sont appliqués à différents intervalles de temps. Le plus petit intervalle de temps déclenchant 2 potentiels d'action est égal à 2 msec, soit la période réfractaire absolue du neurone. Noter que le deuxième potentiel d'action antidromique a une latence plus longue.

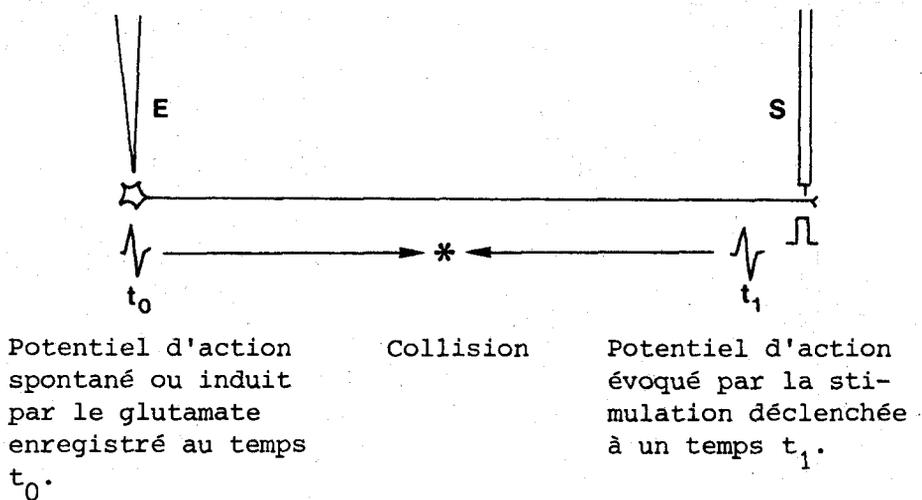
C : Un potentiel d'action spontané (à la partie gauche de l'enregistrement) est utilisé pour déclencher la stimulation. Il y a phénomène de collision (astérisque) puisque la stimulation survient 5 msec après le potentiel d'action spontané, valeur inférieure à l'intervalle de collision obtenu en additionnant l et c, soit 11 msec.

D : 11 msec séparent le choc de stimulation du potentiel d'action spontané, c'est-à-dire la valeur de l'intervalle de collision. Dans ce cas, un potentiel d'action antidromique apparaît.

Calibrations : 5 msec, 0,2 mV ; † : artéfact de stimulation ; positivité vers le haut.



HTS  
LILL



**FIGURE 17** : Représentation schématique de la collision entre potentiel d'action spontané ou induit par le glutamate et potentiel d'action antidromique.

E : électrode d'enregistrement ; S : électrode de stimulation.

## II - REPOSSES ORTHODROMIQUES

Certaines réponses à la stimulation de l'éminence médiane ne remplissent pas les critères précédemment décrits. Elles apparaissent de nature trans-synaptique. Deux ou trois potentiels d'action sont déclenchés en réponse à un seul choc de stimulation (figure 18 A1, A2). Une absence de collision est démontrée (figure 18 B1, B2, B3). La latence des potentiels d'action obtenus n'est pas fixe (figure 18). Certains neurones occasionnellement, ne répondent pas consécutivement à des stimuli répétés.

L'activation orthodromique de neurones hypothalamiques en réponse à la stimulation de l'éminence médiane provient vraisemblablement de l'activation de collatérales axoniques de neurones endocrines. La projection de ces collatérales dans l'hypothalamus médio-basal et l'aire préoptique est déterminée par des techniques électrophysiologiques (SAWAKI et YAGI, 1976 ; YAGI et SAWAKI, 1977).

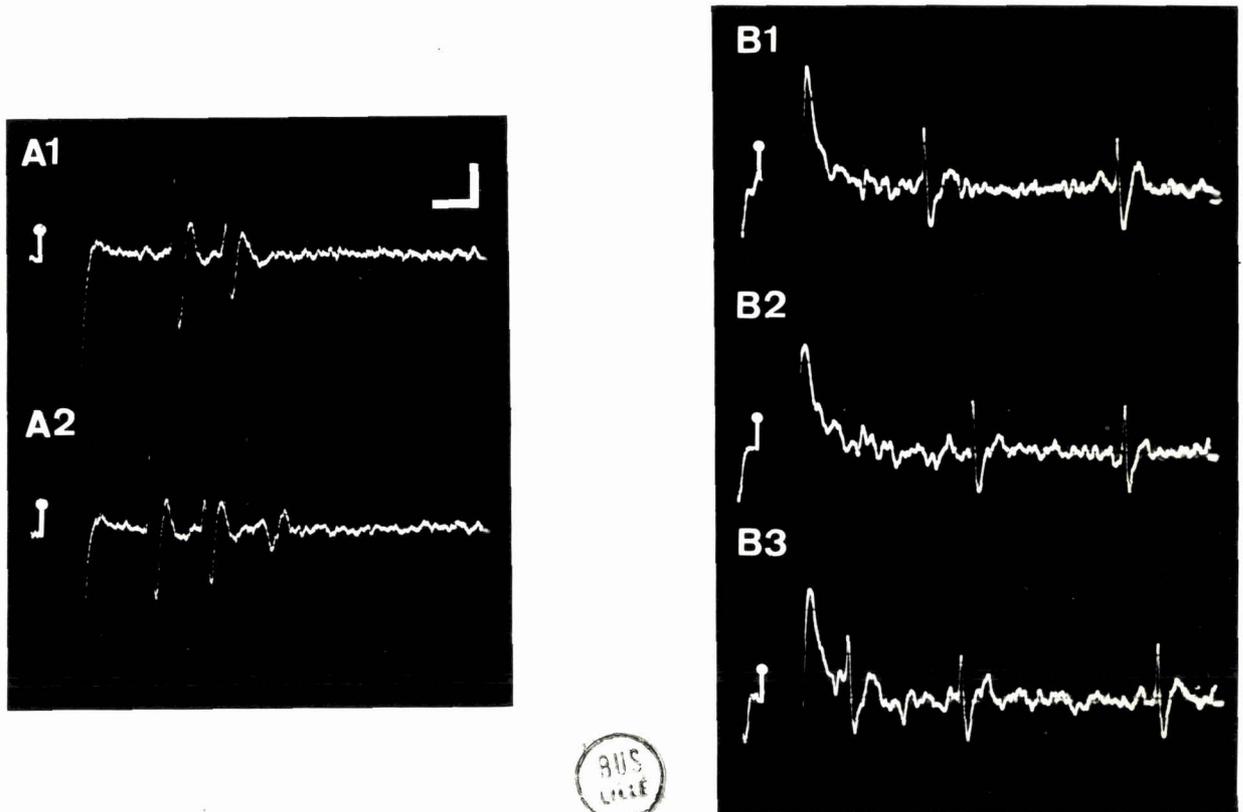


FIGURE 18 : Caractéristiques des réponses orthodromiques.

A1 : En réponse à un choc de stimulation, deux potentiels d'action sont évoqués.

A2 : En augmentant l'intensité de stimulation, le nombre de potentiels d'action s'accroît.

B1, B2, B3 : Absence de collision dans le cas d'une réponse orthodromique. La stimulation est déclenchée par un potentiel d'action spontané. B2 et B3 montrent la latence variable de ce type de réponse.

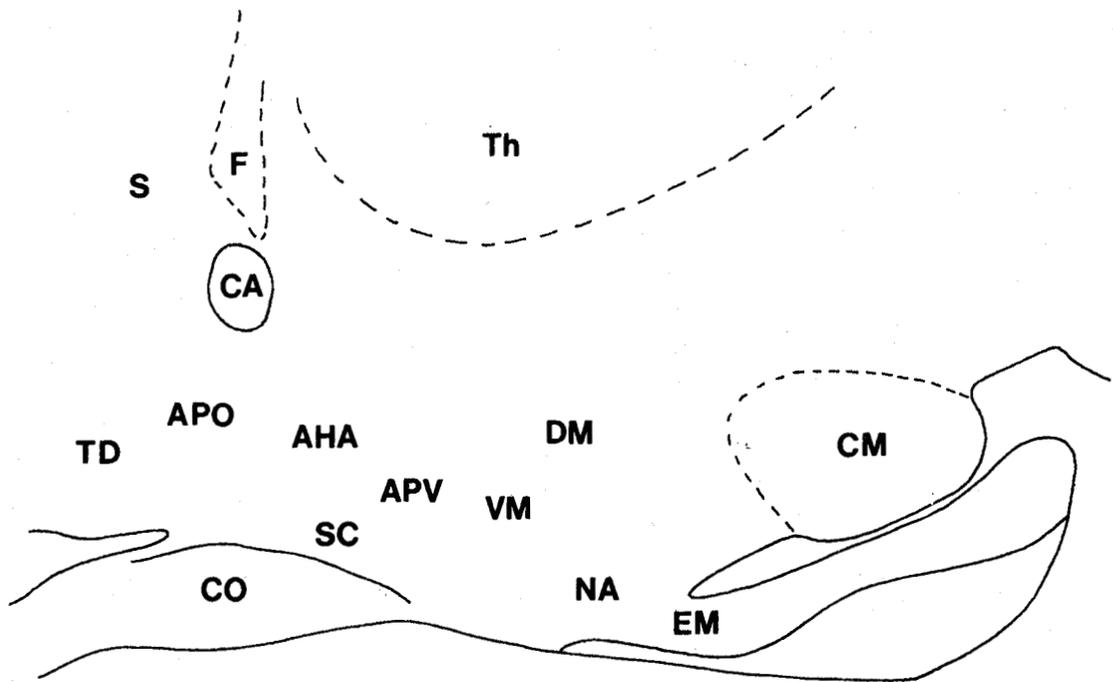
Calibrations : 5 msec, 0,2 mV ; J : artéfact de stimulation ; positivité vers le haut.

Ou bien, dans le cas d'une intensité de stimulation élevée, l'aire de stimulation peut atteindre des corps cellulaires de neurones du noyau arqué, ce qui déclenche des réponses orthodromiques, en particulier dans les aires préoptique et septale. Des techniques électrophysiologiques comportant une stimulation de l'aire préoptique, démontrent que des neurones de l'hypothalamus médio-basal s'y projettent (HARRIS et SANGHERA, 1974 ; MAKARA et HODACS, 1975).

### III - LOCALISATION DES CORPS CELLULAIRES DES NEURONES ACTIVES ANTIDROMIQUEMENT

Notre localisation anatomique des neurones dont les axones se projettent directement dans l'éminence médiane est montrée sur la figure 19. Ces neurones sont situés dans de nombreux noyaux et aires de l'hypothalamus ainsi que dans le septum et les noyaux de la bandelette diagonale de BROCA.

Une localisation plus précise des corps cellulaires de ces neurones sera donnée pour chaque étude de neurorégulateur, grâce à des schémas d'hypothalamus en coupe transversale, à différentes coordonnées antéro-postérieures. La figure 20 montre le repérage sur coupes transversales d'hypothalamus, des traces de microélectrodes d'enregistrement et d'électrodes de stimulation ainsi que des dépôts de colorants effectués près des neurones étudiés.



**FIGURE 19** : Schéma de l'hypothalamus de cobaye en coupe parasagittale indiquant les différents noyaux et aires où sont localisés des corps cellulaires de neurones se projetant vers l'éminence médiane : AHA : aire hypothalamique antérieure ; APO : aire préoptique ; APV : aire périventriculaire ; DM : noyau dorso-médian ; NA : noyau arqué ; S : septum ; SC : noyau supra-chiasmatique ; TD : tractus diagonal de BROCA ; VM : noyau ventro-médian.

Autres abréviations : CA : commissure antérieure ; CM : corps mamillaire ; CO : chiasma optique ; EM : éminence médiane ; F : fornix, Th : thalamus.



FIGURE 20 : Coupes frontales d'hypothalamus montrant les sites de stimulation de l'éminence médiane et d'enregistrement de neurones endocrines.

a-b : sites de stimulation (indiqués par une flèche) dans l'éminence médiane ; cas d'une électrode concentrique bipolaire.

c : stimulation de l'éminence médiane par une électrode bipolaire dont l'extrémité est constituée de 2 fils métalliques parallèles (flèches).

d-e : coupes frontales adjacentes à travers l'aire préoptique montrant les traces laissées dans le tissu nerveux par les microélectrodes d'enregistrement à deux coordonnées latérales.

f : au sein de la même coupe frontale, 2 traces parallèles de microélectrodes d'enregistrement.

g : dépôt de vert rapide dans le noyau ventro-médian.

h : dépôt de bleu Alcian dans le noyau septal médian (calibration : 50  $\mu$ m)

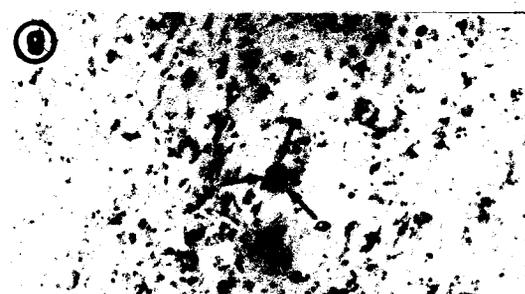
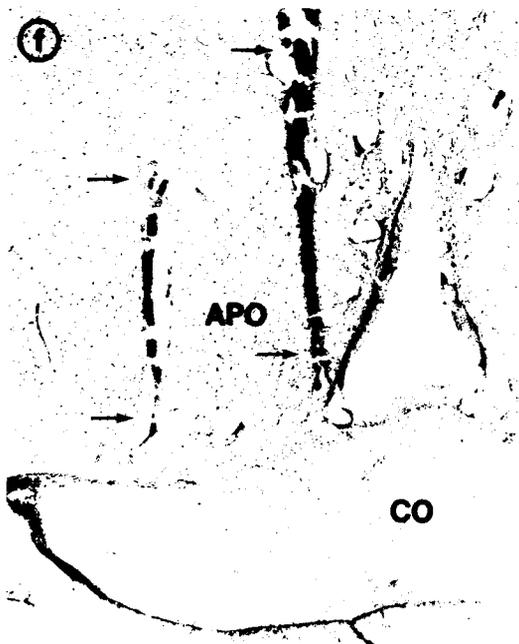
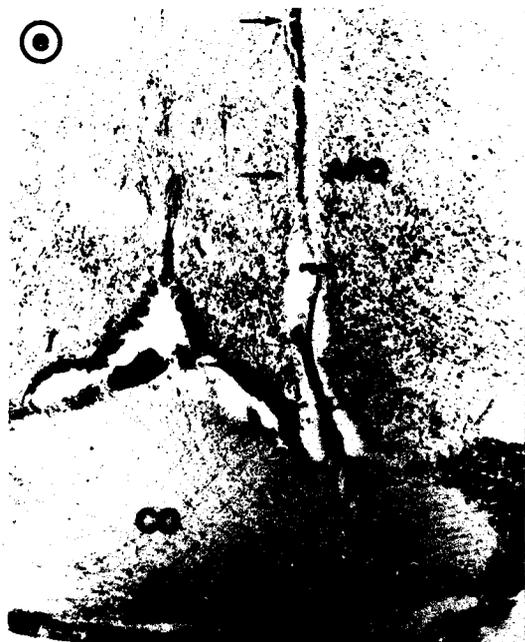
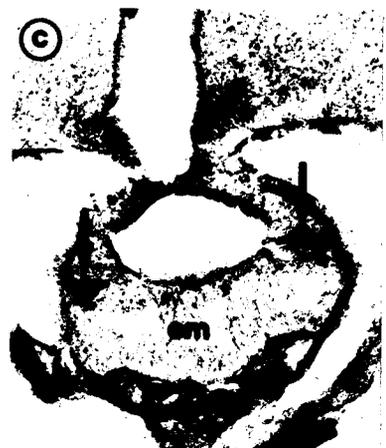
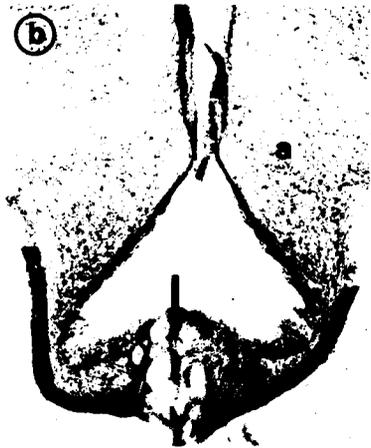
a et f : coloration au crésyl violet.

b, c, d, e, g, h : coloration à la thionine.

Abréviations : a : noyau arqué ; APO : aire préoptique ;

CO : chiasma optique ; em : éminence médiane.





HUS  
LILLE

#### IV - PROPRIETES ELECTRIQUES DES NEURONES ENDOCRINES

##### A - CARACTERISTIQUES DES POTENTIELS D'ACTION ANTIDROMIQUES

###### 1/ Forme

Les potentiels d'action antidromiques sont la plupart du temps biphasiques avec une phase initiale positive suivie d'une phase négative. Sur la phase ascendante du potentiel d'action, existe le plus souvent un décrochement plus ou moins prononcé qui traduit la difficulté de passage des potentiels d'action à partir de l'axone vers le corps cellulaire à travers le segment initial de l'axone (figure 15 B1). La première phase positive du potentiel d'action représente l'activité électrique du segment initial (potentiel a) tandis que la phase tardive correspond à celle de l'ensemble soma-dendrites (potentiel b) (réf. dans RICHARD et coll., 1978).

###### 2/ Période réfractaire absolue

Comme indiqué figure 16 B, la période réfractaire absolue correspond au plus petit intervalle de temps entre deux stimuli, permettant l'apparition de deux potentiels d'action antidromiques. La période réfractaire absolue des neurones endocrines parvocellulaires apparaît très variable : elle dure de 1,4 à 100 msec (RICHARD et coll., 1978).

###### 3/ Latences et vitesses de conduction

La latence des potentiels d'action antidromiques correspond au temps que met le potentiel d'action évoqué par stimulation de la terminaison axonique, pour atteindre le corps cellulaire du neurone. C'est la composante a du potentiel qui est prise en considération puisqu'elle survient avec une latence fixe tandis que la composante b peut apparaître avec une latence variable (figure 15 B1, B2). Les latences des potentiels d'action antidromiques des neurones parvocellulaires se situent le plus souvent entre 5 et 30 msec.

La vitesse de conduction des potentiels d'action est calculée à partir des valeurs de latence et de distance entre électrodes d'enregistrement et de stimulation. Dans l'exemple de la figure 16, le neurone préoptique a une longueur d'axone estimée à 3 mm. La latence du potentiel d'action antidromique est égale à 9 msec. La vitesse de conduction est de 0,33 m/sec. Des valeurs de 0,3 m/sec sont obtenues par KAWAKAMI et SAKUMA (1976) pour des neurones des aires préoptique et hypothalamique antérieure.

#### B - ACTIVITE UNITAIRE SPONTANEE

Pour l'ensemble des neurones endocrines parvocellulaires localisés dans l'hypothalamus et le septum, le pourcentage de neurones sans activité spontanée s'élève à environ 45 %. Des valeurs supérieures sont données par de nombreux auteurs (références dans RICHARD et coll., 1978), tandis que KAWAKAMI et SAKUMA (1976) obtiennent des valeurs inférieures (12 %). Nous n'avons pas effectué de mesures de l'activité moyenne des neurones endocrines parvocellulaires, mais le plus souvent, elle apparaît faible, inférieure à 1 potentiel d'action par seconde.

#### V - DISCUSSION

##### A - APPROCHES POUR LA STIMULATION DE L'EMINENCE MEDIANE

###### 1/ Résultats obtenus avec une approche trans-pharyngée

La jonction éminence médiane-tige hypophysaire et l'hypophyse sont exposées. L'approche du cerveau est ventrale et dans ce cas, l'électrode de stimulation est guidée visuellement, à l'aide d'une loupe binoculaire, à la jonction éminence médiane-tige hypophysaire. L'électrode est placée en surface. Cette façon de stimuler l'éminence médiane est effectuée uniquement chez le rat.

Les corps cellulaires des neurones endocrines identifiés par cette technique de stimulation de l'éminence médiane, sont localisés dans le noyau arqué (MAKARA et coll., 1972 ; SAWAKI et YAGI, 1973 ; MOSS et coll., 1975), les noyaux ventro-médian, suprachiasmatique, préamillaire dorsal, périventriculaire antérieur (MAKARA et coll., 1972 ; SAWAKI et YAGI, 1973). Par contre, selon YAGI et SAWAKI (1978), la stimulation de la surface de l'éminence médiane n'évoque pas de potentiel d'action antidromique sur des neurones des aires préoptique et hypothalamique antérieure.

## 2/ Résultats obtenus avec une approche par voie dorsale

Nos résultats montrent qu'avec cette technique, des corps cellulaires sont localisés dans les différents noyaux cités dans le paragraphe précédent, ainsi que dans les aires septale, préoptique et hypothalamique antérieure. POULAIN et PARTOUCHE (1973), POULAIN (1977), en stimulant la région noyau arqué- éminence médiane, identifient des neurones dans les aires septale et préoptique. MOSS et coll. (1978), dans leur étude sur la sensibilité des neurones endocrines aux amines biogènes appliquées par iontophorèse, utilisent les deux approches pour la stimulation de l'éminence médiane et localisent des corps cellulaires de neurones se projetant vers l'éminence médiane aussi bien dans le noyau arqué que dans l'aire préoptique.

Selon RENAUD (1981), la seule méthode valable pour stimuler l'éminence médiane est celle par approche trans-pharyngée. L'éminence médiane apparaît comme une longue et mince bande de tissu et seulement un faible nombre de terminaisons nerveuses peut être excité par une électrode de stimulation placée en surface. Ceci peut expliquer l'échec de YAGI et SAWAKI (1978) pour détecter des neurones activés antidromiquement dans les aires préoptique et hypothalamique antérieure, et le fait que bien souvent moins d'un neurone antidromique par descente de microélectrode est enregistré. MOSS et coll. (1975) indiquent d'ailleurs que pour détecter des neurones endocrines dans le noyau arqué, des courants très importants (jusque 6 mA) sont utilisés initialement, afin d'assurer une stimulation complète de l'éminence médiane.

Le risque avec une approche par voie dorsale est que la stimulation implique l'activation de neurones dont les axones se terminent dans un noyau adjacent à l'éminence médiane, le noyau arqué. Si en fait, avec l'approche dorsale, on perd le bénéfice d'une visualisation de la mise en place de l'électrode, la vérification histologique de la position de l'extrémité de l'électrode de stimulation dans l'éminence médiane permet de s'assurer que les neurones endocrines étudiés se projettent bien dans cette région. En outre, la zone stimulée à partir de l'éminence médiane est réduite en utilisant de fines électrodes bipolaires et des courants d'intensité faibles. PERKINS et WHITEHEAD (1978) montrent d'ailleurs qu'un déplacement vertical de 0,2 mm d'une électrode de stimulation de même type que celle que nous employons, entraîne une perte de la réponse du neurone à un stimulus de 0,2 mA. La réponse peut à nouveau être obtenue quand l'électrode est remplacée dans sa position initiale. L'effet du stimulus apparaît ainsi être restreint à une aire du cerveau relativement petite, réduisant la possibilité d'une stimulation en dehors de l'éminence médiane. Dans certains cas, l'approche par voie dorsale est contrôlée radiographiquement, chez des espèces comme le lapin (DUFY et coll., 1976).

Dans certains chapitres (ceux concernant la noradrénaline, l'histamine et les stéroïdes acides), nous considérons trois catégories de neurones : ceux activés antidromiquement, ceux mis en jeu synaptiquement (neurones orthodromiques) et ceux non influencés par la stimulation, et nous indiquons que la région noyau arqué-éminence médiane est stimulée. Nous supposons que le noyau arqué est atteint par la stimulation lorsque des réponses orthodromiques sont obtenues avec des intensités de courant élevées (supérieures à 1 mA).

#### B - SUPPORTS ANATOMIQUES DES DONNEES OBTENUES AVEC L'ELECTROPHYSIOLOGIE

Des expériences combinant lésions et/ou déafférentation avec des observations en microscopie électronique (DAIKOKU et coll., 1976 ; NOJYO et coll., 1976 ; IBATA et coll., 1977), des études autoradiographiques (GARRIS, 1979 ; ANDERSON et SHEN, 1980 ; SHEN et ANDERSON, 1980), des injections de peroxydase dans l'éminence médiane (POULAIN, 1977 ; LECHAN et coll., 1980 ; WIEGAND et PRICE, 1980) chez différentes espèces dont le cobaye,

confirment la distribution, au sein de l'hypothalamus et du septum, des corps cellulaires de neurones dont les axones se projettent vers l'éminence médiane.

Il y a cependant des résultats contradictoires pour deux aires. Selon KORITSANSZKY et KOVES (1976), les neurones de l'aire préoptique ne se projettent pas directement vers l'éminence médiane. D'autre part, il n'y aurait pas de connexions entre le noyau ventro-médian et l'éminence médiane comme démontré par l'injection de peroxydase dans l'éminence médiane (LECHAN et coll., 1980 ; WIEGAND et coll., 1980).

Des études autoradiographiques chez le cobaye (ANDERSON et SHEN, 1980) montrent que les efférences préoptiques médianes se projettent directement vers l'éminence médiane par l'intermédiaire de fibres qui traversent l'aire rétrochiasmatic. Ces résultats confirment nos données électrophysiologiques (CARETTE, 1975) obtenues en plaçant l'électrode de stimulation dans l'aire rétrochiasmatic et en enregistrant des potentiels d'action antidromiques dans les aires préoptique et hypothalamique antérieure.

#### C - LOCALISATION DES CORPS CELLULAIRES DE NEURONES ENDOCRINES PAR LES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

Les techniques immunocytochimiques permettent de localiser les corps cellulaires, les fibres et les terminaisons axoniques des neurones qui élaborent des facteurs hypophysiotropes dont la structure chimique est établie : la thyrolibérine, la lulibérine et la somatostatine.

##### 1/ Localisation des corps cellulaires des neurones à TRH

Les corps cellulaires des neurones de ce type sont situés dans l'aire périventriculaire, l'aire périfornicale, les noyaux dorso-médian et ventro-médian (JOHANSSON et HOKFELT, 1980).

## 2/ Localisation des corps cellulaires des neurones à LHRH

BARRY et coll. (1973), en bloquant le transport axonique par de la colchicine, localisent chez le cobaye, les corps cellulaires des neurones à l'olibérine principalement dans les aires préoptique et septale. L'injection de mélatonine chez des cobayes castrés (BARRY et coll., 1974) tend à augmenter le nombre de péricaryons immunoréactifs et confirme la localisation des neurones à LHRH. Le nombre de corps cellulaires immunoréactifs diminue caudalement, surtout au-delà de l'aire rétrochiasmatic.

Chez la même espèce, KREY et SILVERMAN (1978) localisent les corps cellulaires des neurones à LHRH dans les aires préoptique et septale ainsi que dans le noyau arqué. C'est ce dernier noyau qui constitue la source principale des terminaisons axoniques à LHRH dans l'émittance médiane, l'aire préoptique médiane y participant pour une faible part. Par contre, par des expériences de lésions, ces auteurs indiquent que les neurones à LHRH de l'aire septale et des bandelettes diagonales de BROCA ne se projettent pas vers l'émittance médiane.

KAWANO et DAIKOKU (1981), chez le rat, par l'administration de colchicine et par des déafférentations, localisent les corps cellulaires à LHRH dans les aires préoptique et septale et dans les bandelettes diagonales de BROCA, et affirment l'absence de ces corps cellulaires dans le noyau arqué. Les fibres immunoréactives ayant pour origine la région préoptico-septale prennent une direction caudale et se divisent en 2 groupes : l'un forme le tractus médio-basal et a pour origine l'aire préoptique médiane, l'autre forme le tractus latéro-basal et a pour origine les péricaryons localisés dans l'aire préoptique latérale, les bandelettes diagonales de BROCA et les aires septales latérales et médianes. Une grande partie des fibres de ces deux tractus se termine dans l'émittance médiane.

### 3/ Localisation des corps cellulaires des neurones à somatostatine

Les corps cellulaires contenant la somatostatine sont situés dans l'aire périventriculaire antérieure et le noyau arqué (JOHANSSON et HOKFELT, 1980).

Toutes les régions où nous avons détecté des neurones activés antidromiquement par stimulation de l'éminence médiane contiennent les corps cellulaires de neurones endocrines mis en évidence par les techniques immunocytochimiques. Etant donné une localisation rostrale unique des neurones à LHRH, il est possible de présumer que les neurones identifiés électrophysiologiquement dans les aires septale et préoptique sont vraisemblablement des neurones à lulibérine.

CHAPITRE II

---

---

NORADRENALINE

---

---

## I - INTRODUCTION

La noradrénaline apparaît bien impliquée dans la régulation de la sécrétion des hormones adénohypophysaires, en particulier celle des hormones gonadotropes. Des substances antinoradrénergiques, telles que inhibiteurs de la synthèse de noradrénaline, agents bloquants des alpha-récepteurs et dépléteurs du stockage noradrénergique bloquent la décharge préovulatoire de LH et l'ovulation. A l'inverse, des injections intraventriculaires de noradrénaline induisent la libération de LH et l'ovulation (WEINER et coll., 1978). L'innervation noradrénergique de l'aire préoptique et de l'hypothalamus antérieur apparaît importante dans cette régulation puisque c'est à ce niveau que KALRA et Mc CANN (1973) localisent la synapse noradrénergique, à la suite d'expériences combinant un pré-traitement avec un dépléteur de la noradrénaline et une stimulation de l'aire préoptique. LEONARDELLI et DUBOIS (1974) étudient l'effet du diéthylldithiocarbamate de sodium, qui entraîne une déplétion spécifique de la noradrénaline, sur les neurones élaborateurs de LHRH, chez le cobaye. Ces auteurs observent une augmentation du matériel LHRH à la suite de ce traitement. La noradrénaline peut donc avoir un rôle stimulant sur la cession de LHRH et/ou inhibiteur de sa synthèse. Cet ensemble de résultats permet de penser qu'une synapse noradrénergique excitatrice est impliquée dans le contrôle de la sécrétion de LH.

Des fibres noradrénergiques se projettent, à travers le faisceau médian du télencéphale vers l'hypothalamus, les régions préoptique et suprachiasmatique et vers le septum (UNGERSTEDT, 1971). Dans certaines de ces régions, en particulier l'aire hypothalamique antérieure, les aires préoptique et septale médianes, sont localisés des péricaryons spécifiquement immuno-réactifs des neurones à LHRH (BARRY et coll., 1973). C'est sur des neurones de ces différentes aires, activés antidromiquement ou non par stimulation de la région noyau arqué-éminence médiane que nous étudierons les effets de la noradrénaline, appliquée par microiontophorèse.

## II - RESULTATS

Les expériences sont réalisées sur 8 cobayes tricolores ou albinos, mâles ou femelles. La noradrénaline, appliquée par iontophorèse, est testée sur 63 neurones des aires septale, préoptique et hypothalamique antérieure. En fonction de leur réponse à la stimulation de la région noyau arqué-éminence médiane, les 63 neurones analysés sont classés en trois catégories : neurones antidromiques (11), neurones mis en jeu synaptiquement (9), neurones non influencés par la stimulation (43).

Quelle que soit la catégorie considérée, l'effet de la noradrénaline sur l'activité unitaire des neurones peut être une excitation (figure 21 A), une inhibition (figure 21 B) ou être nul. La latence de l'action excitatrice comme de l'action inhibitrice de la noradrénaline se situe entre 1 et 5 secondes. L'effet de la substance peut s'observer durant une période similaire, après l'arrêt des courants iontophorétiques.

La répartition des réponses à la noradrénaline, dans les trois catégories de neurones est présentée dans le tableau ci-dessous :

	Neurones activés antidromiquement	Neurones mis en jeu synaptique- ment	Neurones non influencés par la stimulation
Excitation	5	2	7
Inhibition	2	1	4
Sans effet	4	6	32

Tableau 3 : Réponses de 63 neurones des aires septale, préoptique et hypothalamique antérieure à l'application iontophorétique de la noradrénaline.

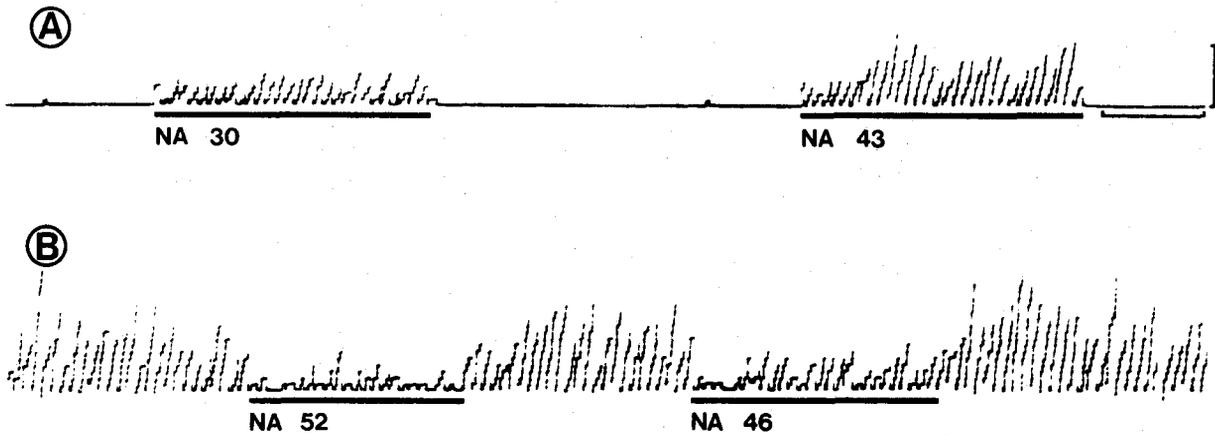


Figure 21 : Enregistrements graphiques du taux de décharge de 2 neurones endocrines :

A : effet activateur de la noradrénaline (NA),

B : inhibition par l'amine de l'activité spontanée.

Calibrations : barre verticale : 10 PA/sec ;

barre horizontale : 12 sec.

Les barres sous les enregistrements indiquent la durée d'application de la substance. Les nombres expriment l'intensité des courants appliqués en nanoampères.

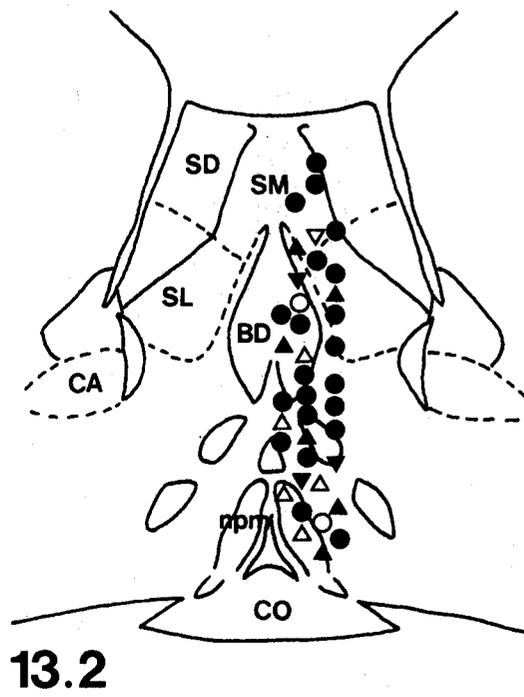
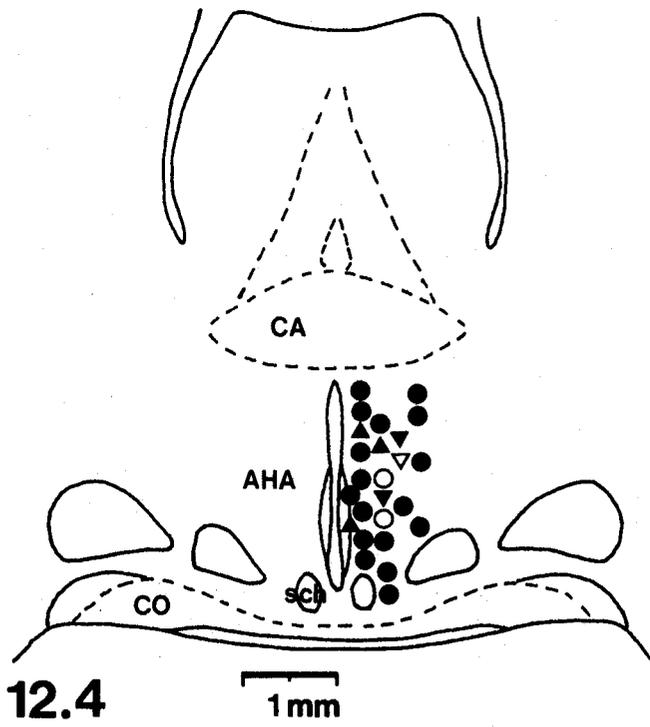
La localisation des réponses à la noradrénaline est indiquée sur les schémas de la figure 22.

Figure 22 : Schémas de coupes transversales de l'hypothalamus de cobaye selon POULAIN (1974) montrant la localisation des réponses des neurones à l'iontophorèse de noradrénaline.

12,4 et 13,2 représentent les coordonnées antéro-postérieures.

Les symboles vides correspondent aux neurones identifiés antidromiquement. Les symboles noirs regroupent les neurones mis en jeu synaptiquement et les neurones non influencés par la stimulation. Ronds : absence d'effet de la noradrénaline ; triangles pointe vers le haut : excitations ; triangles pointe vers le bas : inhibitions.

Abréviations : AHA : aire hypothalamique antérieure ; BD : bande diagonale de BROCA ; CA : commissure antérieure ; CO : chiasma optique ; npm : noyau préoptique médian ; sch : noyau suprachiasmatic ; SD : noyau septal dorsal ; SL : noyau septal latéral ; SM : noyau septal médian.



### III - DISCUSSION

#### A - EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR DES NEURONES DES AIRES SEPTALE, PREOPTIQUE ET HYPOTHALAMIQUE ANTERIEURE

Nos résultats indiquent que des neurones endocrines ou non endocrines de l'aire septo-préoptique et de l'hypothalamus antérieur sont sensibles à l'application, par iontophorèse, de noradrénaline, dans le sens d'une excitation de leur activité unitaire comme dans le sens d'une inhibition (CARETTE, 1976).

Des études diverses, appliquant l'amine par la même technique, conduisent à des résultats contradictoires. Dans le septum, la noradrénaline a un effet uniquement inhibiteur (SEGAL, 1974). Dans les aires préoptique et hypothalamique antérieure, les neurones activés antidromiquement par stimulation de l'hypothalamus médio-basal (DYBALL et coll., 1974 ; WHITEHEAD et RUF, 1974) sont le plus souvent insensibles à la noradrénaline et les quelques réponses observées sont exclusivement inhibitrices. Par contre, MOSS et coll. (1978) confirment nos résultats en indiquant que des neurones endocrines de l'aire préoptique peuvent être excités ou inhibés par la noradrénaline. Des réponses des deux types à l'amine sont également décrites sur des neurones des aires septale et préoptique, thermosensibles ou non (JELL, 1974).

#### B - EFFETS DE LA NORADRENALINE SUR D'AUTRES NEURONES HYPOTHALAMIQUES ET DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Des neurones du noyau arqué activés antidromiquement par stimulation de l'éminence médiane répondent par une excitation ou par une inhibition de leur activité unitaire à l'application de noradrénaline (MOSS et coll., 1975, 1978).

Dans la plupart des régions du cerveau, des réponses excitatrices et inhibitrices à l'amine sont décrites (SZABADI, 1979).

C - TYPES DE RECEPTEUR NORADRENERGIQUE IMPLIQUES DANS LES REponses A LA NORADRENALINE

Des expériences impliquant l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes noradrénergiques spécifiques suggèrent que les réponses des neurones à la noradrénaline se font à travers des récepteurs pharmacologiquement distincts : les excitations par l'intermédiaire de récepteurs alpha-noradrénergiques, les inhibitions par l'intermédiaire de récepteurs bêta-noradrénergiques (SZABADI, 1979).

Il y a peu d'études concernant l'hypothalamus, dans lesquelles la nature des récepteurs impliqués dans les réponses observées est déterminée par l'utilisation d'antagonistes spécifiques. BARKER et coll. (1971) observent uniquement des réponses inhibitrices à la noradrénaline sur des neurones endocrines et non endocrines du noyau supraoptique, réversées par des agents bloquant les récepteurs bêta-noradrénergiques. La noradrénaline évoque des réponses excitatrices et inhibitrices sur des neurones du noyau arqué, in vitro (GELLER, 1976). Les réponses inhibitrices sont bloquées par des antagonistes des récepteurs bêta-noradrénergiques (GELLER et HOFFER, 1977).

Des récepteurs alpha et bêta-noradrénergiques sont localisés dans l'hypothalamus (YOUNG et KUCHAR, 1980 ; PALACIOS et KUCHAR, 1980). Aucune donnée n'est utilisable concernant l'aire septo-préoptique. N'ayant pas employé d'antagonistes des récepteurs noradrénergiques dans notre étude iontophorétique sur la noradrénaline, nous pouvons seulement supposer à partir d'autres observations, que les réponses excitatrices de l'amine mettent en jeu des récepteurs alpha-noradrénergiques tandis que les réponses inhibitrices impliquent des récepteurs bêta-noradrénergiques.

D - CONTROLE DE LA SECRETION DE LH PAR LA NORADRENALINE

1/ Adénohypophyse et éminence médiane : sites d'action peu probables de la noradrénaline

Des infusions de l'amine directement dans l'adénohypophyse, ne provoquent pas l'ovulation (DONOVAN et HARRIS, 1956). Ainsi, une action directe sur les cellules hypophysaires à LH apparaît peu probable.

Au niveau de l'éminence médiane, se situe un grand nombre de terminaisons nerveuses noradrénergiques (UNGERSTEDT, 1971). Cependant, ces terminaisons sont localisées principalement dans les couches sous-épendymaires tandis que les terminaisons à LHRH se situent essentiellement dans la zone palissadique latérale de l'éminence médiane (LEONARDELLI et coll., 1973). Ainsi, une interaction axo-axonique entre terminaisons à LHRH et terminaisons à noradrénaline n'est guère envisageable au niveau de l'éminence médiane. De plus, une injection de 6-hydroxydopamine dans l'éminence médiane, qui détruit sélectivement les terminaisons noradrénergiques mais laisse intacte le système tubéro-infundibulaire dopaminergique (UNGERSTEDT, 1968), n'a pas d'effet sur la libération de LH (SIMPKINS et coll., 1979). La noradrénaline n'induit pas la libération in vitro de LHRH à partir de fragments de l'hypothalamus médio-basal (ROTSZTEJN et coll., 1977). Seuls NEGRO-VILAR et coll. (1979) indiquent une action modulatrice excitatrice de la noradrénaline dans la libération de LHRH à partir de l'éminence médiane.

2/ Aires préoptique et hypothalamique antérieure : site possible pour l'action de la noradrénaline

Différentes études indiquent que le site d'action de la noradrénaline dans le contrôle de LH peut se situer au niveau des aires préoptique et hypothalamique antérieure (KALRA et Mc CANN, 1973 ; SIMPKINS et coll., 1979 ; HANCKE et WUTTKE, 1979).

La noradrénaline est susceptible d'avoir un rôle stimulant sur la cession de LHRH et/ou inhibiteur de sa synthèse (LEONARDELLI et DUBOIS, 1974). La mesure de la libération de LHRH dans le système porte hypophysaire

indique que la noradrénaline contrôle la libération de LH à travers une modulation de la cession de LHRH, probablement par l'intermédiaire de récepteurs alpha-noradrénergiques (SARKAR et FINK, 1981). Chez la rate, WEINER et coll. (1971) montrent que des doses intraventriculaires de noradrénaline qui induisent l'ovulation augmentent rapidement l'activité électrique multiunitaire dans l'éminence médiane. La localisation dans cette aire de ce changement d'activité électrique suggère que la réponse observée est en corrélation avec une modification de la cession du facteur hypophysiotrope correspondant. Cette série de résultats est donc en faveur d'un effet de la noradrénaline sur la libération de LHRH. Cet amine peut exercer cet effet en agissant comme un neurotransmetteur, en modifiant l'excitabilité électrique de neurones de l'aire préoptique, hypothalamique antérieure avec pour conséquence, un changement de libération de LHRH.

En raison des résultats contradictoires obtenus avec la noradrénaline (réponses uniquement inhibitrices et réponses à la fois inhibitrices et excitatrices sur l'activité unitaire de neurones hypothalamiques), deux hypothèses sont possibles. Dans la première hypothèse, considérant que la noradrénaline n'a qu'un effet inhibiteur sur l'activité unitaire, la terminaison noradrénergique fait synapse avec un interneurone inhibiteur qui lui-même innerve le neurone à LHRH. L'inhibition par la noradrénaline de l'activité de l'interneurone inhibiteur entraîne une désinhibition du neurone à LHRH avec augmentation secondaire de la libération de LHRH (HOKFELT et coll., 1979) (figure 23 A). Cette hypothèse suppose également que la noradrénaline peut induire une inhibition de l'activité unitaire à travers des récepteurs alpha-adrénergiques. La deuxième hypothèse s'appuie sur le fait que des neurones endocrines des aires préoptique et hypothalamique antérieure ont leur activité unitaire augmentée par l'application iontophorétique de noradrénaline. Dans ce cas, les récepteurs alpha-adrénergiques excitateurs de la libération de LHRH sont localisés directement sur les neurones à LHRH ou sur des interneurones excitateurs en contact synaptique avec des neurones à LHRH (figure 23 B).

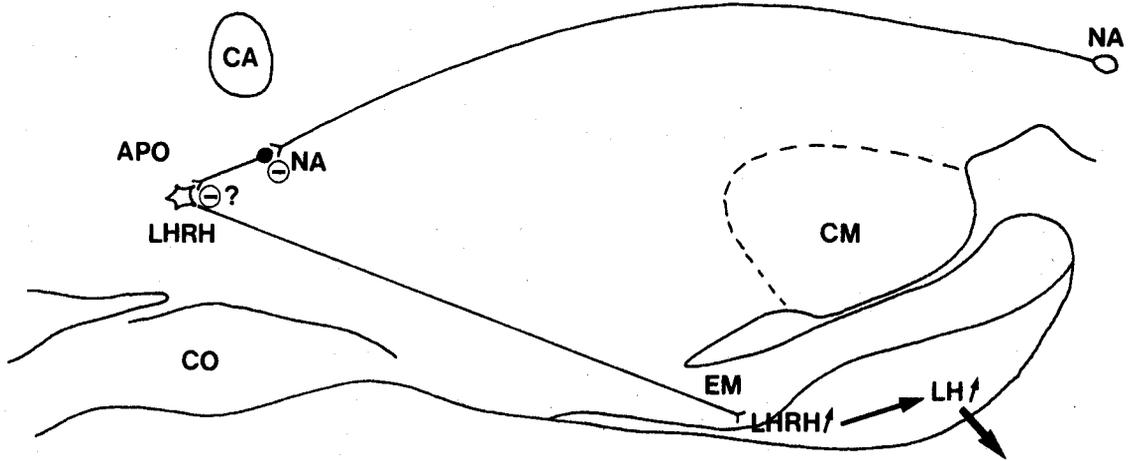
Figure 23 : Schémas illustrant l'implication de la noradrénaline (NA) dans la libération de LHRH.

A : Première hypothèse : la NA a uniquement un effet inhibiteur sur l'activité unitaire, et contrôle l'activité des neurones LHRH par l'intermédiaire d'un interneurone inhibiteur (GABA ou enképhaline ?).

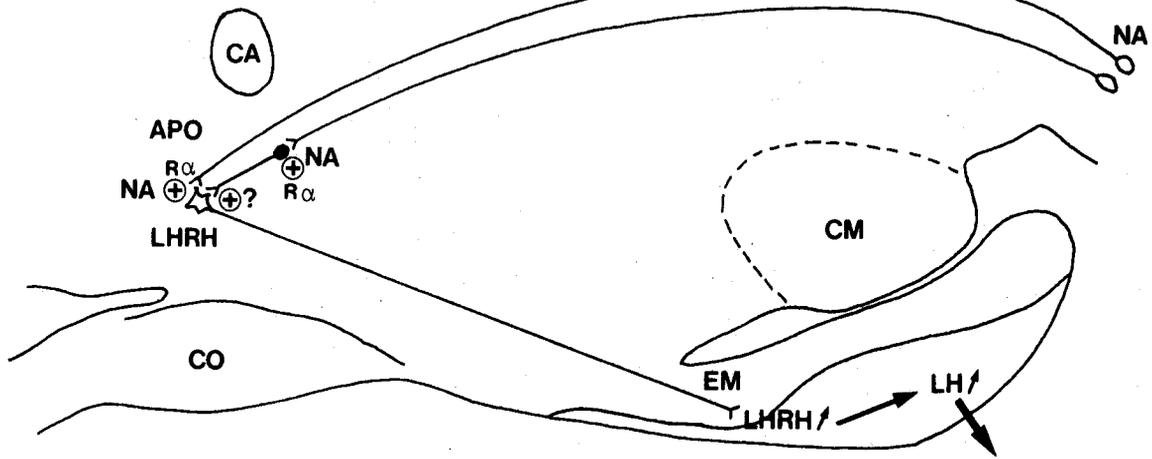
B : Deuxième hypothèse : la NA a un effet excitateur et dans ce cas, peut contrôler la sécrétion de LHRH directement ou par l'intermédiaire d'un interneurone excitateur, à travers des récepteurs alpha-adrénergiques ( $R_{\alpha}$ ).

Abréviations : APO, aire préoptique ; CA, commissure antérieure ; CM, corps mamillaire ; CO, chiasma optique ; EM, éminence médiane ; LH, hormone lutéotrope.

A



B



CHAPITRE III  
=====

HISTAMINE  
-----  
-----

## I - INTRODUCTION

L'histamine, bien que ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, est présente dans le cerveau des mammifères, où elle est localisée à la fois dans des cellules non nerveuses et dans des neurones. Une partie de cette amine cérébrale, celle localisée dans les neurones, a vraisemblablement une fonction de neurotransmetteur. L'histamine est identifiée dans des synaptosomes ; la L-histidine décarboxylase, son enzyme spécifique de synthèse, est présente dans des terminaisons nerveuses ; des voies histaminergiques sont décrites dans le cerveau grâce à des études de lésion ; l'amine peut être libérée par dépolarisation à partir de coupes de cerveau ; des récepteurs histaminergiques et une adénylate-cyclase sensible à l'histamine sont caractérisés dans le système nerveux central ; l'inactivation de l'histamine libérée est assurée par un processus enzymatique (revues de SCHWARTZ, 1975, 1979). Le critère d'identité d'action n'est pas encore démontrée dans le cerveau des mammifères. Chez l'Aplysie, l'histamine, appliquée d'une façon exogène, mime l'activité du neurotransmetteur naturel libéré au niveau de synapses définies (GRUOL et WEINREICH, 1979).

Des preuves pharmacologiques indiquent que l'histamine intervient dans le contrôle des différentes sécrétions adénohypophysaires (WEINER et GANONG, 1978). L'injection intraventriculaire d'histamine stimule l'ovulation chez des lapines légèrement anesthésiées à l'aide de pentobarbital (SAWYER, 1955). Chez des rattes ovariectomisées ayant reçu des injections de benzoate d'oestradiol, l'histamine provoque une augmentation significative de la LH plasmatique (LIBERTUN et Mc CANN, 1976). Des injections intraventriculaires d'histamine à des rattes en pro-oestrus augmentent les taux de LH plasmatique, mais n'ont aucun effet aux autres phases du cycle (DONOSO, 1978). L'histamine n'apparaît pas avoir d'action au niveau de l'hypophyse (LIBERTUN et Mc CANN, 1976). Si l'histamine agit comme transmetteur neuroendocrine contrôlant la libération de LH, cela implique l'existence de sites sensibles à l'histamine quelque part dans le cerveau. Pour tester cette possibilité, nous appliquons, par iontophorèse, cette amine sur des neurones de l'aire septo-préoptique, connue pour être responsable de la libération de LH, se projetant vers la région de l'éminence médiane.

## II - RESULTATS

Les expériences sont réalisées sur 24 cobayes femelles. L'histamine est testée sur 215 neurones de l'aire septo-préoptique.

- 23 sont activés antidromiquement en réponse à la stimulation de la région noyau arqué-éminence médiane,
- 24 autres neurones sont classés comme orthodromique, répondant à la stimulation par 1, 2 ou 3 potentiels d'action qui, en outre, présentent une latence variable,
- les neurones restants (168) ne sont pas influencés par la stimulation.

Des 215 neurones étudiés, 78 soit 36 % répondent à l'application iontophorétique de l'histamine : 34 sont excités soit 43 % des neurones sensibles, 44 sont inhibés soit 57 %. Sur l'ensemble des neurones soumis à l'action de l'histamine, les neurones excités représentent 15,8 %, ceux inhibés 20,4 %.

Les réponses excitatrices comme les réponses inhibitrices présentent 2 aspects.

### A - REPONSES EXCITATRICES A L'HISTAMINE

#### 1/ Réponses rapides

Ces réponses sont peu nombreuses (5). L'effet apparaît rapidement et cesse dès la fin de l'application iontophorétique (figure 24 A).

#### 2/ Réponses lentes

Ce sont les plus nombreuses (29). L'effet s'observe habituellement après une latence de 3 à 30 secondes. L'excitation se prolonge au-delà de l'interruption de l'application des courants (50 à 120 sec.) (figures 24 B, C ; 25 A). La latence de l'effet et le retour à l'activité initiale dépendent des doses appliquées, c'est-à-dire à la fois de l'intensité des courants et de leur durée d'application.

Figure 24 : Réponses excitatrices à l'application iontophorétique d'histamine.

A : Excitations rapides par l'histamine.

B : Excitations lentes. Un phénomène de désensibilisation est observable avec les deuxième et troisième essais histamine. La substance est appliquée avec des intensités et des durées égales. La latence de l'effet est augmentée (de 1,5 à 4 sec.), tandis que la durée de l'excitation diminue (82,5 à 70 sec.).

C : Excitations lentes avec également désensibilisation :  
premier essai : latence : 7 sec. : excitation durant 93 sec.  
deuxième essai: latence : 15 sec. : excitation durant 69 sec.  
troisième essai :  
latence : 42 sec.

Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde  
10 sec.

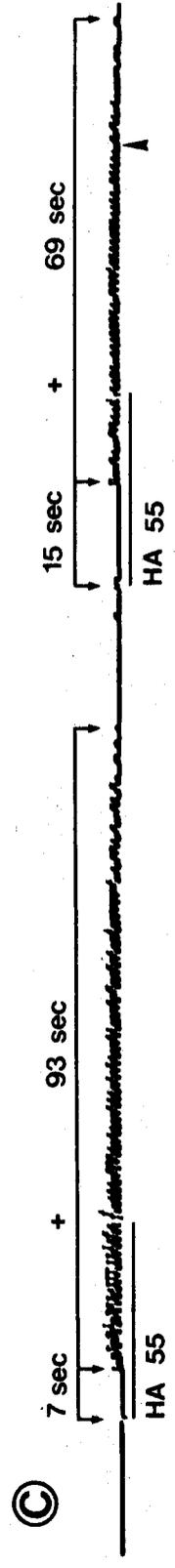
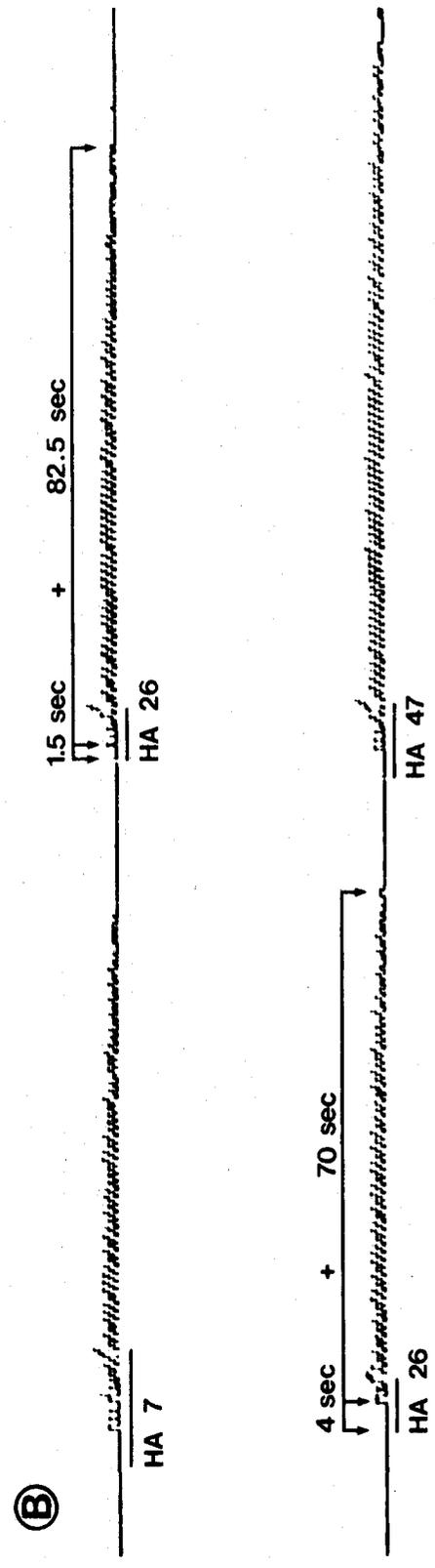
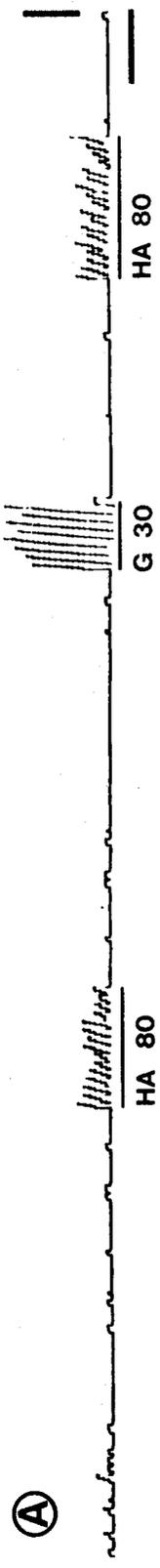


Figure 25 : A : Effet excitateur lent de l'histamine.

La désensibilisation se traduit à la fois par une augmentation de la latence de l'effet, et une diminution de l'amplitude et de la durée de l'excitation, bien que la durée des essais histamine (50 nA) passe de 20 à 23 puis 29 secondes.

B : Excitations de plus en plus prononcées, non réversibles de l'histamine.

C : Inhibitions rapides, fonction de l'intensité des courants appliqués.

D : Effets inhibiteurs répétés de l'histamine.  
Absence de désensibilisation.

Calibrations : A & D : 15 potentiels d'action/sec.  
10 sec.

B & C : 12 potentiels d'action/sec.  
10 sec.

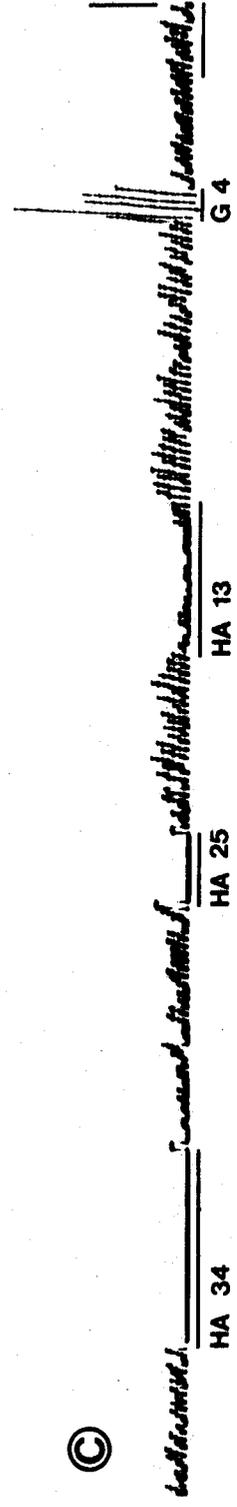
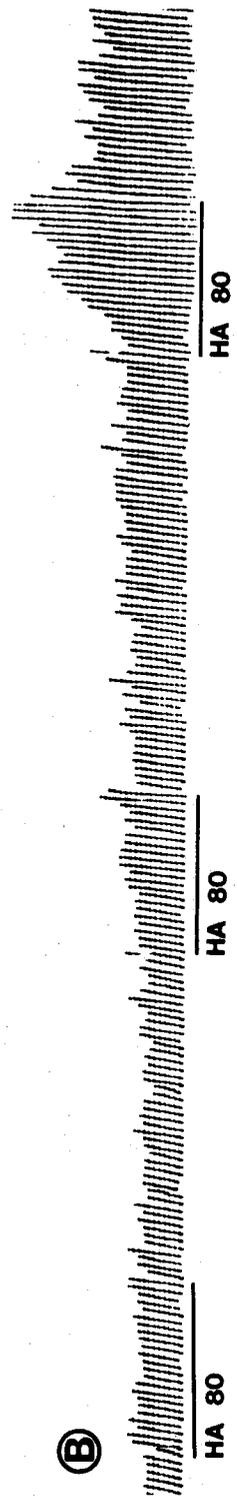
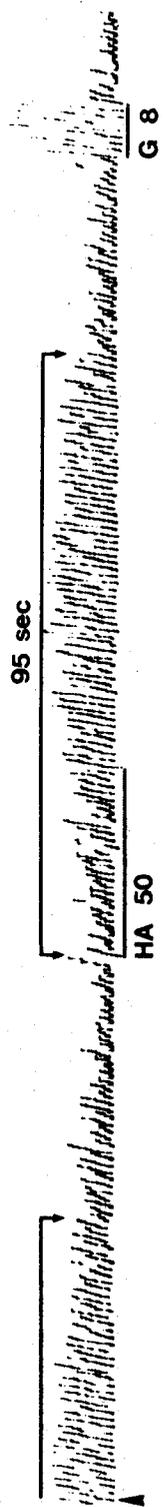


Figure 26 : A et B : Inhibitions lentes par l'histamine.

Latence et durée de l'effet sont fonction de la dose d'histamine. En A, durant la période d'inhibition de l'activité unitaire du neurone par l'histamine, le glutamate est capable d'induire une activité.

Calibrations : 12 potentiels d'action/sec.

10 sec.

Les réponses peuvent être obtenues avec de faibles courants, inférieurs à 10 nA (figure 24 B). Il est souvent observé une désensibilisation du neurone à l'application répétée d'histamine (figures 24 B, C ; 25 A). Dans quelques rares cas, à la suite de plusieurs applications d'histamine, certains neurones ne retrouvent pas le niveau initial de leur activité spontanée et maintiennent une activité élevée durant toute la période d'enregistrement (figure 25 B).

## B - REPNSES INHIBITRICES A L'HISTAMINE

### 1/ Réponses rapides

Ce type de réponses concerne 33 neurones. Les inhibitions d'activité unitaire sont limitées aux temps d'application de l'histamine. Elles sont obtenues avec de faibles courants et sont fonction de l'intensité de ces courants (figure 25 C). Des applications répétées n'entraînent pas de phénomène de désensibilisation (figure 25 D).

### 2/ Réponses lentes

Onze neurones présentent des réponses inhibitrices de ce type. L'effet de l'histamine survient après une latence de 20 à 30 secondes. L'effet peut durer jusque 60 secondes au-delà de la fin d'application de la substance (figure 26 A, B). Une désensibilisation ne semble pas survenir (figure 26 A, B).

Dans la plupart des expériences, les excitations déclenchées par l'histamine sont obtenues avec les mêmes micropipettes à partir desquelles des inhibitions sont observées. Le tableau 4 indique la répartition des effets de l'histamine selon la nature de la réponse à la stimulation de la région noyau arqué-éminence médiane.

Figure 26 : A et B : Inhibitions lentes par l'histamine.

Latence et durée de l'effet sont fonction de la dose d'histamine. En A, durant la période d'inhibition de l'activité unitaire du neurone par l'histamine, le glutamate est capable d'induire une activité.

Calibrations : 12 potentiels d'action/sec.  
10 sec.

Ⓐ



HA 30

HA 70



HA 70

G 20



HA 70

Ⓑ



HA 55

HA 55



Réponses à la stimulation à l'histamine à NA-EM	Neurones antidromiques	Neurones orthodromiques	Neurones non influencés
Excitations rapides			5
Excitations lentes	5	6	18
Inhibitions rapides	3	2	28
Inhibitions lentes	1	3	7
Absence d'effet	14	13	110
TOTAL	23	24	168

Tableau 4 : Réponses à l'histamine dans les trois catégories de neurones.

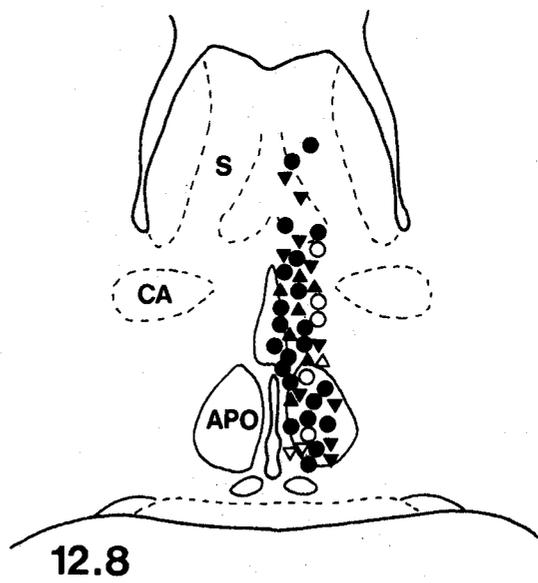
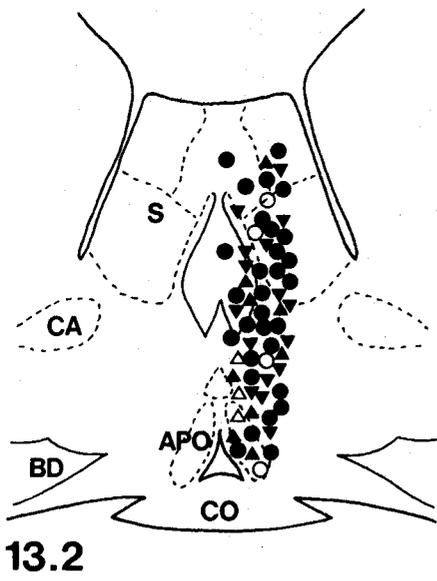
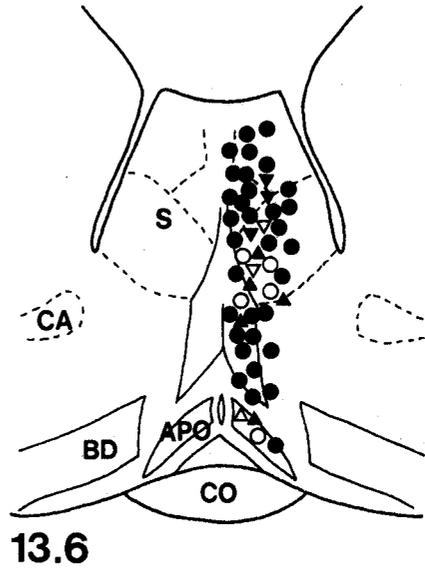
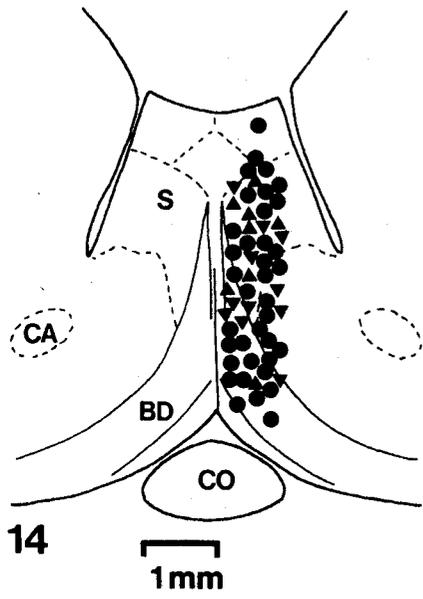
L'identification histologique des neurones sensibles à l'histamine montre que les différents types de réponse sont distribués dans les aires préoptique et septale, et les bandelettes diagonales de BROCA (figure 27)



FIGURE 27 : Localisation des effets de l'histamine sur des neurones de l'aire préoptico-septale dans 4 plans antéro-postérieurs (d'après l'atlas de POULAIN, 1974).

Les symboles vides représentent les neurones se projetant vers l'éminence médiane, les symboles noirs les neurones non identifiés. Les triangles pointés vers le haut indiquent les excitations par l'histamine, les triangles pointés vers le bas les inhibitions.

Abréviations : APO : aire préoptique ; BD : bande diagonale de BROCA ; CA : commissure antérieure ; CO : chiasma optique ; S : septum.



### III - DISCUSSION

#### A - ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

##### 1/ Effets de l'histamine dans les aires préoptique et septale

Nos résultats, acquis chez le cobaye, indiquent que des neurones situés dans l'aire préoptico-septale sont sensibles à l'application iontophorétique d'histamine (CARETTE, 1978b). Les réponses sont soit excitatrices soit inhibitrices ; elles sont soit rapides, soit lentes. Ces effets de l'histamine s'observent sur les trois catégories de neurones déterminées par la stimulation de la région infundibulaire, sauf pour les réponses excitatrices rapides obtenues uniquement sur des neurones non affectés par la stimulation (tableau 4).

Nos résultats sont en accord avec ceux de SWEATMAN et JELL (1977) qui trouvent des neurones sensibles à l'histamine dans l'hypothalamus rostral. Ces auteurs décrivent des réponses excitatrices et des réponses inhibitrices à la suite d'une application iontophorétique d'histamine, sur des neurones thermosensibles ou non.

##### 2/ Effets de l'histamine sur d'autres neurones hypothalamiques

Au niveau de l'hypothalamus, des réponses doubles (excitatrices ou inhibitrices) à l'histamine sont également observées (HAAS et coll., 1975, 1977, 1978 ; RENAUD, 1976 ; GELLER, 1981). Sur des neurones endocrines du noyau supraoptique activés antidromiquement par stimulation de la neurohypophyse, HAAS et coll. (1975) observent des excitations lentes en réponse à l'iontophorèse d'histamine. Nous avons également observé des réponses de ce type sur des neurones endocrines de l'aire septo-préoptique chez le cobaye.

RENAUD (1976), et HAAS et WOLF (1977) indiquent clairement que les réponses inhibitrices des neurones hypothalamiques à l'histamine sont essentiellement rapides tandis que les effets excitateurs sont le plus souvent lents, et plus rarement rapides.

### 3/ Effets de l'histamine sur des neurones d'autres aires du système nerveux central

L'histamine produit généralement des effets inhibiteurs sur l'activité unitaire de neurones du système nerveux central (SCHWARTZ, 1979 ; GELLER, 1981). HAAS et WOLF (1977) rapportent que dans la plupart des aires du cerveau, peu de neurones peuvent être excités par l'histamine. De ce point de vue, l'aire septo-préoptique et l'hypothalamus constituent une exception.

La seule région du système nerveux central, en dehors de ces deux aires, où le pourcentage d'excitations par l'histamine est relativement élevé est constituée par les noyaux vestibulaires (KIRSTEN et SHARMA, 1976 ; SATAYAVIDAD et KIRSTEN, 1977). Les excitations sont de type lent, uniquement. Par contre, les réponses inhibitrices présentent deux aspects : elles sont soit rapides, soit lentes.

L'aire septo-préoptique apparaît donc comme la seule région du cerveau où l'histamine, appliquée par iontophorèse, provoque un double effet excitateur ou inhibiteur. Pour chacun de ces effets, le décours peut être lent ou rapide. Un phénomène de désensibilisation est observé dans le cas des réponses excitatrices lentes sur des neurones septo-préoptiques. Une observation similaire n'est pas rapportée jusqu'à présent. SATAYAVIDAD et KIRSTEN (1977) réalisent des applications multiples d'histamine sur un même neurone qui n'ont pas pour résultat une désensibilisation des réponses inhibitrices comme des réponses excitatrices.

### B - VOIES HISTAMINERGIQUES

Les voies histaminergiques, à l'inverse des voies catécholaminergiques et sérotoninergiques, ne peuvent pas être tracées à l'aide de techniques histo-chimiques de fluorescence ou immunohisto-chimiques. Des lésions sélectives du cerveau, avec estimation des taux d'histamine d'abord, puis de l'activité de l'histidine décarboxylase, enzyme de synthèse de l'histamine dans les neurones, permettent de tracer les voies correspondantes (SCHWARTZ, 1975). L'existence d'une voie ascendante histaminergique est ainsi démontrée

dans le faisceau médian du télencéphale, à travers l'hypothalamus latéral avec projection, en particulier, vers l'hypothalamus antérieur. Cette projection, d'abord observée chez le rat (GARBARG et coll. 1976) est confirmée chez le cobaye (HAAS et coll., 1978). Les études électrophysiologiques confirment l'existence d'une voie ascendante histaminergique à travers le faisceau médian du télencéphale. Ainsi, une stimulation de ce faisceau inhibe l'activité de neurones corticaux. La métiamide, antagoniste des récepteurs  $H_2$ , supprime cette inhibition et l'histamine, sur ces neurones, a une action inhibitrice (SASTRY et PHILLIS, 1976). Des neurones de l'hypothalamus, excités par la stimulation du faisceau médian du télencéphale, ont leur activité unitaire augmentée par l'application iontophorétique d'histamine (HAAS et WOLF, 1977). Ces résultats suggèrent l'existence d'une voie histaminergique ascendante à la fois excitatrice et inhibitrice. Nos résultats, montrant l'existence de neurones sensibles à l'histamine dans les aires préoptique et septale, supportent l'idée d'un système histaminergique se terminant dans ces aires, à la fois inhibiteur et excitateur, probablement à travers le faisceau médian du télencéphale.

#### C - CORRELATIONS ENTRE LES EFFETS ELECTROPHYSIOLOGIQUES DE L'HISTAMINE ET SES RECEPTEURS

L'existence de 2 types de récepteurs  $H_1$  et  $H_2$  de l'histamine dans le cerveau est maintenant bien établie (SCHWARTZ, 1979). Des études portant sur leur localisation indiquent que les récepteurs  $H_1$  et  $H_2$  sont présents dans l'hypothalamus avec une prépondérance des récepteurs  $H_2$  (PORTALEONE et coll., 1978). Des études autoradiographiques prouvent que des récepteurs  $H_1$  sont distribués dans les noyaux des bandelettes diagonales de BROCA, le noyau préoptique médian, le noyau préoptique périventriculaire (PALACIOS et coll., 1981).

Beaucoup d'études électrophysiologiques établissent que les réponses à l'histamine sont spécifiques à travers les différentes aires du système nerveux central, en appliquant par iontophorèse des antagonistes et des agonistes de chaque type de récepteurs. D'une manière générale, les actions excitatrices de l'histamine apparaissent impliquées des récepteurs  $H_1$

tandis que les réponses inhibitrices rapides s'effectuent à travers des récepteurs  $H_2$  (SCHWARTZ, 1979). Les effets d'antagonistes des récepteurs  $H_1$  ne sont pas faciles à interpréter car leur application iontophorétique peut entraîner des effets anesthésiques locaux ayant pour conséquence un blocage non spécifique des réponses à l'histamine. Cependant, dans des études sur des neurones hypothalamiques en culture (GELLER, 1976), où les substances sont appliquées dans le milieu de perfusion à des concentrations connues, un antagoniste des récepteurs  $H_1$  bloque spécifiquement les réponses excitatrices. L'application iontophorétique d'antagonistes des récepteurs  $H_2$  provoque le blocage des inhibitions rapides par l'histamine de l'activité unitaire de neurones hypothalamiques (HAAS et WOLF, 1977 ; GELLER, 1979). Si les antagonistes des récepteurs  $H_2$ , appliqués iontophorétiquement, ne provoquent pas d'effet anesthésique local, par contre ils ont des effets non spécifiques puisqu'ils bloquent les effets de différents neurotransmetteurs (SCHWARTZ, 1979). De plus, RENAUD (1976) ne réussit pas à bloquer les réponses inhibitrices de l'histamine, sur des neurones du noyau ventro-médian, par un antagoniste  $H_2$ . Ou bien ce type d'antagonistes bloque les excitations par l'amine de neurones hypothalamiques (HAAS et coll., 1975).

La dualité des réponses des neurones septo-préoptiques à l'iontophorèse de l'histamine permet de supposer la présence des 2 types de récepteurs de l'histamine dans cette aire du système nerveux central. Dans l'avenir, la possibilité d'utiliser des antagonistes beaucoup plus spécifiques de chaque type de récepteur permettra de mieux déterminer quel récepteur est impliqué dans les effets de l'histamine.

L'hypothèse de l'existence, dans le cerveau, d'un type de récepteurs de l'histamine distinct des récepteurs  $H_1$  et  $H_2$  est émise depuis peu (SCHWARTZ, 1979). Certains effets de l'histamine ne peuvent pas être bloqués par des antagonistes des récepteurs  $H_1$  et  $H_2$  (BERTACCINI et CORUZZI, 1981). GRUOL et WEINREICH (1979) observent 2 réponses hyperpolarisantes sur des neurones d'Aplysie, à l'application d'histamine qui ne semblent pas impliquées strictement des récepteurs  $H_1$  et  $H_2$ . L'observation dans certaines régions du cerveau, de différents types de réponses à l'histamine sur l'activité unitaire (3 pour le noyau vestibulaire (SATAYAVIDAD et KIRSTEN, 1977), 3 pour le noyau ventro-médian (RENAUD, 1976), 4 pour l'aire septo-préoptique (CARETTE, 1978 b)), supporte également, dans l'hypothèse où ces effets sont spécifiques, l'existence de plus de 2 types de récepteurs à l'histamine.

D - IMPLICATION DE L'HISTAMINE DANS LE CONTROLE DES SECRETIONS HYPOPHYSAIRES

1/ Site d'action de l'histamine : l'adénohypophyse ?

L'histamine n'apparaît pas avoir d'action directe sur l'hypophyse (LIBERTUN et Mc CANN, 1976). Cependant, des expériences récentes (DEVOTO et coll., 1980) établissent la présence de récepteurs  $H_2$  de l'histamine dans l'adénohypophyse de rats, supportant la possibilité d'une interaction directe entre l'amine et des cellules pituitaires.

2/ Site d'action de l'histamine : l'éminence médiane

L'histamine est localisée au niveau de l'éminence médiane (BROWNSTEIN et coll., 1974). Cependant, l'activité de l'histidine décarboxylase n'est pas détectable à ce niveau, ce qui suggère que l'histamine, dans cette région, est localisée dans des mastocytes (POLLARD et coll., 1976). Une déafférentation chirurgicale complète de l'hypothalamus médio-basal n'a d'ailleurs pas d'effet sur le taux de l'amine dans l'éminence médiane (BROWNSTEIN et coll., 1976). DONOSO et BANZAN (1979) testent la possibilité que l'histamine des mastocytes de l'éminence médiane soit impliquée dans le contrôle des sécrétions adénohypophysaires, en utilisant un composé qui libère l'amine uniquement à partir de ce type cellulaire. Ces auteurs observent dans ces conditions expérimentales, une augmentation des taux plasmatiques de LH et prolactine. Un rôle de l'histamine des mastocytes de l'éminence médiane peut donc être supposé dans le contrôle des sécrétions adénohypophysaires.

3/ Site d'action de l'histamine : l'hypothalamus et le septum

Nos résultats indiquent que des neurones endocrines, situés dans les aires septale et préoptique ainsi que dans les bandelettes diagonales de BROCA, sont sensibles à l'application iontophorétique de l'histamine. Ces neurones, présumés à l'ulibérine, en raison de leur

localisation dans une aire où ils sont détectés immunocytochimiquement, peuvent donc être impliqués dans la libération de LH par l'histamine. Cet effet direct de l'amine sur des neurones endocrines à gonadolibérine est supporté par la démonstration que la libération de LH par l'histamine ne se fait pas par l'intermédiaire de mécanismes cholinergiques, sérotoninergiques ou noradrénergiques (DONOSO, 1978).

D'autres types de neurones endocrines sont également sensibles à l'histamine. Ainsi, des cellules neurosécrétrices du noyau supra-optique, identifiées par stimulation de la neurohypophyse, sont excitées par l'application iontophorétique de l'histamine (HAAS et coll., 1975). Selon ces auteurs, cette action peut expliquer l'antidiurèse produite par l'histamine injectée intraventriculairement ou localement dans le noyau supraoptique.

Des sites histaminergiques, localisés dans plusieurs régions du cerveau dont les aires préoptique et hypothalamique antérieure, apparaissent impliqués dans les mécanismes contrôlant la sécrétion de prolactine (ALVAREZ et DONOSO, 1981). A la fois, des récepteurs  $H_1$  et  $H_2$  semblent mis en jeu dans la régulation de la sécrétion de prolactine (ARAKELIAN et LIBERTUN, 1977). Les neurones préoptiques qui répondent à l'histamine par une excitation ou une inhibition, peuvent représenter les sites d'action de l'amine dans le contrôle de cette hormone hypophysaire.

#### E - HISTAMINE : NEUROTRANSMETTEUR ET/OU NEUROMODULATEUR

L'histamine satisfait un certain nombre des critères qui permettent d'affirmer qu'une substance agit comme neurotransmetteur au niveau du système nerveux central (SCHWARTZ, 1979). L'histamine est également capable d'agir sur la réception et la libération des monoamines dans des synaptosomes (TUOMISTO et TUOMISTO, 1980), de diminuer les taux de noradrénaline dans l'hypothalamus (NOWAK et PILC, 1979). Ces effets suggèrent que l'histamine peut aussi agir en tant que neuromodulateur. Des études électrophysiologiques impliquant des enregistrements intracellulaires de cellules de l'hippocampe sont en accord avec ce rôle de l'histamine (HAAS, 1981). Comparée à l'action des acides aminés GABA et glutamate, l'action de l'histamine apparaît après une certaine latence et dure plus longtemps. A partir des enregistrements extra-

cellulaires des neurones septo-préoptiques, le déroulement des effets de l'histamine sur l'activité unitaire permet également de supposer un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur par l'histamine.

CHAPITRE IV

---

---

ENKEPHALINES

---

---

## I - INTRODUCTION

Depuis leur isolement à partir du cerveau (HUGHES et coll. 1975 b) et leur identification (HUGHES et coll. 1975 a), méthionine-enképhaline et leucine-enképhaline, deux pentapeptides avec activité morphinomimétique, encore appelées peptides opioïdes sont étudiées d'une façon extensive. Leur distribution à travers le système nerveux central peut être précisée grâce à des dosages radioimmunologiques ou des techniques immunohistochimiques (ROSSIER et coll. 1977, YANG et coll. 1977, ELDE et coll., 1976, HOKFELT et coll. 1977). En raison d'une localisation des enképhalines dans des aires du cerveau non impliquées dans l'analgésie, il est suggéré que ces peptides opioïdes interviennent dans différentes fonctions. Diverses études (BRUNI et coll. 1977 ; COCCHI et coll. 1977 ; SHAAR et coll. 1977) indiquent que les enképhalines influencent les sécrétions adénohypophysaires. L'hypothalamus tubéral, considéré comme impliqué directement dans les sécrétions adénohypophysaires (BLACKWELL et GUILLEMIN, 1973), apparaît comme un site vraisemblable de l'action des enképhalines puisque cette structure possède à la fois des corps cellulaires et des terminaisons axoniques de neurones contenant les peptides opioïdes (ELDE et coll. 1976 ; HOKFELT et coll. 1977). Dans un premier temps, nous testons cette possibilité, en appliquant par iontophorèse, mét-enképhaline et leu-enképhaline sur des neurones de l'hypothalamus tubéral dont on enregistre l'activité unitaire.

La plupart des études montrent que les effets des enképhalines sur les sécrétions adénohypophysaires s'exercent à travers des récepteurs morphiniques puisque la naloxone, antagoniste de ces récepteurs, bloque les effets obtenus par les enképhalines (MEITES et coll. 1979). En nous appuyant sur nos résultats préliminaires, nous avons pu obtenir des laboratoires ENDO (New York) de la naloxone hydrochlorure, produit non commercialisé. Nous testons, en appliquant la naloxone par iontophorèse, la possibilité que les effets des enképhalines observés s'exercent à travers des récepteurs morphiniques. Dans cette deuxième série d'expériences, les substances sont appliquées sur des neurones endocrines de l'hypothalamus tubéral et sur des neurones adjacents.

Les enképhalines agissent dans le système nerveux central, aussi bien au niveau présynaptique qu'au niveau postsynaptique (NICOLL et coll. 1980). Le magnésium, dans des études électrophysiologiques in vitro comme in vivo (GAHWILER 1980 ; ZIEGLGANSBERGER et coll. 1979) est un cation divalent qui permet de bloquer toute activité synaptique et ainsi de faire la discrimination entre les deux niveaux d'action. Dans une troisième série d'expériences, enképhalines, naloxone et magnésium, appliqués par iontophorèse, sont testés sur des neurones endocrines situés plus rostralement, dans les aires préoptique et septale et sur des neurones adjacents.

## II - RESULTATS

### A - EFFETS DE LA LEUCINE-ENKEPHALINE ET DE LA METHIONINE-ENKEPHALINE SUR DES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS TUBERAL

Les expériences sont réalisées sur 10 cobayes femelles. Les enképhalines sont appliquées sur 111 neurones, à l'aide de courants cationiques. La présence de neurones silencieux ou ayant une faible activité spontanée est révélée par l'iontophorèse continue de glutamate (2 à 20 nA). Dans le cas de ces neurones, les effets des enképhalines sont étudiés sur l'activité induite par le glutamate.

Les enképhalines inhibent l'activité unitaire de 40 des 111 neurones testés, soit 36 %. Aucune réponse excitatrice n'est obtenue.

#### 1/ Neurones sensibles aux deux enképhalines

Sur ces 40 neurones, 17 sont sensibles aux deux enképhalines. Les réponses sont soit limitées au temps d'application des substances, soit le dépassent (figure 28). Dans le cas de neurones sans activité spontanée, une inhibition complète par les enképhalines de leur activité induite par le glutamate est souvent obtenue (figure 28 C et D). Les réponses inhibitrices observées sont fonction des doses appliquées, c'est-à-dire de l'intensité des courants utilisés (figure 28). Les applications multiples des peptides opioïdes au même neurone n'ont pas pour résultat une désensibilisation (figure 28 A,B,C).

FIGURE 28 : Effets des enképhalines sur l'activité neuronale de l'hypothalamus tubéral.

- A : Effets de 2 enképhalines limités aux temps d'application.
  - B : Effet prolongé de la leu-enképhaline (Leu).
  - C : Sur une activité induite par le glutamate (G), inhibition par les 2 enképhalines
  - D : Effet inhibiteur uniquement par la leu-enképhaline. La mét-enképhaline (Met), appliquée avec des courants cinq fois supérieurs à ceux de la leu-enképhaline, est sans effet.
  - E : A l'inverse, mét-enképhaline est seule inhibitrice.
- Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde.  
10 secondes.

(A)

Leu 52 Met 30 Met 30 Na 64

(B)

Leu 66 Leu 50 Met 53

(C)

Met 55 Leu 55 Met 55 14

(D)

Leu 55 Met 52 Met 67 Na 88 A

15

A Leu 37 Leu 25 Leu 11 Met 55

(E)

Met 52 Met 36 Leu 64



## 2/ Neurones sensibles à une enképhaline mais non à l'autre

L'activité unitaire de certains neurones est déprimée par une enképhaline et non par l'autre. Ainsi la leu-enképhaline a un effet inhibiteur sur 12 neurones, mais la mét-enképhaline est sans effet. Dans l'exemple figure 28 D, à la fin de l'enregistrement, la leu-enképhaline, appliquée avec 11 nA, est efficace tandis que l'application de la mét-enképhaline avec des courants 5 fois plus élevés est inefficace. Inversement, 11 neurones répondent à la mét-enképhaline seule (figure 28 E). Dans chaque cas, l'enképhaline inefficace est testée avec des courants égaux ou supérieurs à ceux pour lesquels l'autre enképhaline est efficace.

L'absence de réponse à une enképhaline n'est pas due à une désensibilisation développée par les neurones après application de l'enképhaline efficace. Ceci est démontré en appliquant à nouveau, l'enképhaline efficace après l'application inefficace de l'autre enképhaline (figure 28 D).

## 3/ Localisation des neurones étudiés

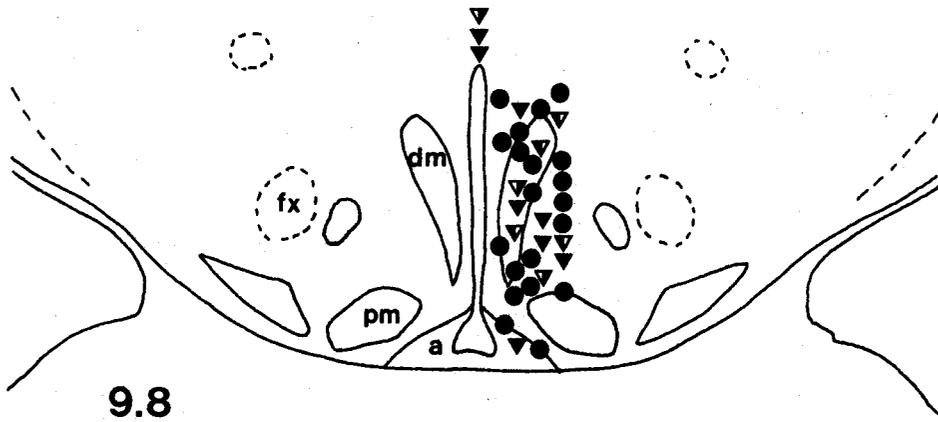
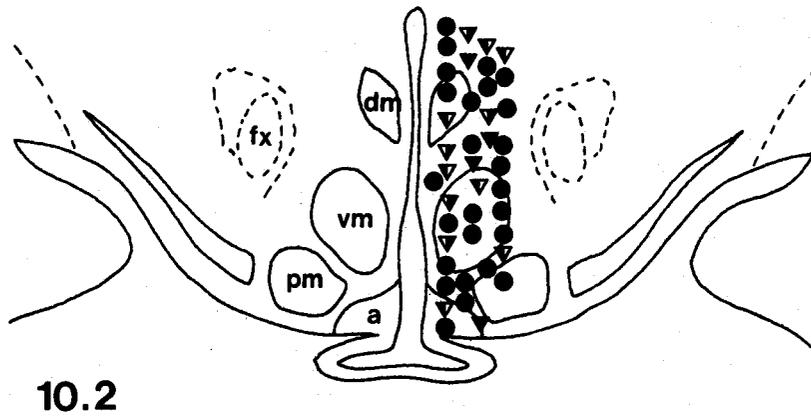
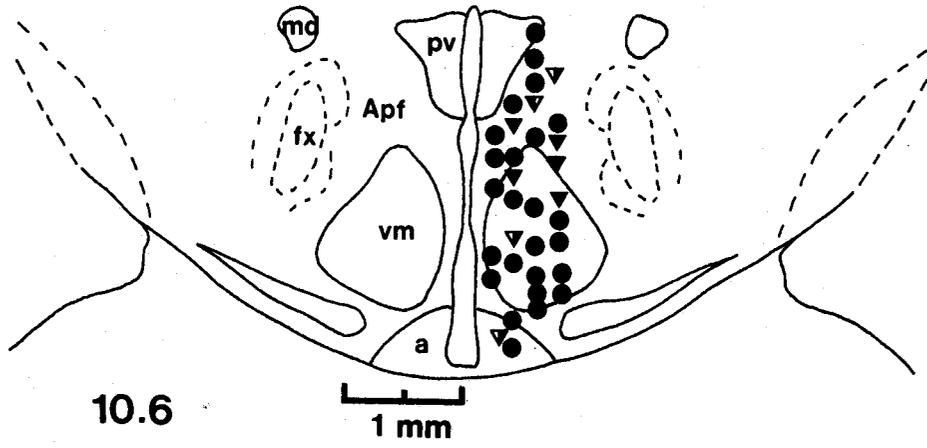
Les études histologiques montrent que les neurones testés sont localisés dans les différentes aires et noyaux de l'hypothalamus tubéral : aires périfornicale et périventriculaire, noyaux ventro-médian, arqué et dorso-médian (figure 29). Les réponses inhibitrices surviennent indépendamment de la localisation des neurones testés.

## B - EFFETS DES ENKEPHALINES ET DE LA NALOXONE SUR DES NEURONES ENDOCRINES ET ADJACENTS DE L'HYPOTHALAMUS TUBERAL

Quinze cobayes femelles tricolores sont utilisés dans cette étude. L'action des enképhalines est testée sur 94 neurones hypothalamiques qui, tous sont activés par l'application iontophorétique du glutamate (2-40 nA).

FIGURE 29 : Schémas de différentes coupes frontales de l'hypothalamus de cobaye (d'après l'atlas de POULAIN, 1974), montrant la localisation des effets des enképhalines. Les triangles noirs représentent les inhibitions par les 2 enképhalines, ceux côté gauche noir les inhibitions par la leu-enképhaline seule, ceux côté droit noir les inhibitions par la mét-enképhaline seule. Les ronds indiquent les absences d'effet.

Abréviations : a : noyau arqué ; Apf : aire inter-paraventricularo-fornicale ; dm : noyau dorso-médian ; fx : fornix ; md : noyau magnocellulaire dorsal ; pm : noyau prémamillaire ; pv : noyau paraventriculaire ; vm : noyau ventro-médian.



1/ Neurones endocrines

La stimulation de l'éminence médiane a évoqué des potentiels d'action antidromiques dans 22 des 94 neurones étudiés.

De ces 22 neurones tubéroinfundibulaires, 8 sont inhibés par les deux enképhalines. La mét-enképhaline seule inhibe un neurone antidromique tandis que la leu-enképhaline est seule efficace vis-à-vis de 2 neurones endocrines. Les effets inhibiteurs des enképhalines ont les mêmes caractéristiques que celles indiquées dans le paragraphe précédent.

L'antagonisme de ces effets inhibiteurs par la naloxone, éjectée simultanément ou avant les enképhalines, est obtenu dans 4 des 11 neurones antidromiques sensibles aux peptides opioïdes (figures 30, 31 B, 32 A). La répartition de l'antagonisme est indiquée dans le tableau 5.

	Inhibition	Antagonisme par la naloxone
les deux enképhalines	8	3
mét-enképhaline seule	1	1
leu-enképhaline seule	2	1

TABEAU 5 : Effets inhibiteurs de la leu- et de la mét-enképhaline sur des neurones tubéroinfundibulaires. Antagonisme par la naloxone.

L'effet antagonistique de la naloxone se développe rapidement. L'effet inhibiteur par les peptides opioïdes est à nouveau obtenu, plusieurs minutes après la fin de l'éjection de l'antagoniste. Ceci dépend surtout de la durée d'application de l'antagoniste (figures 30, 31 B ; 32 A). L'absence d'antagonisme par la naloxone est illustrée par les figures 31 A, 32 B, C. La naloxone, lorsqu'elle est éjectée avec des courants iontophorétiques élevées, peut elle-même avoir un effet inhibiteur sur l'activité unitaire.

## 2/ Neurones adjacents

Les neurones restants (72) ont des axones se projetant ailleurs que dans l'émittance médiane et représentent le groupe des neurones non identifiés.

Quarante sept de ces 72 neurones sont inhibés par les 2 ou l'une ou l'autre des enképhalines. Sur les 47 réponses inhibitrices, la naloxone est testée sur 36 et l'antagonisme est observée sur 21 neurones. Le tableau 6 montre la répartition de cet antagonisme.

	Inhibition	Antagonisme par la naloxone	
les deux enképhalines	42	18	(32)
mét-enképhaline seule	3	2	( 2)
leu-enképhaline seule	2	1	( 2)

**TABLEAU 6** : Effets inhibiteurs de la leu- et de la mét-enképhaline sur des neurones non identifiés. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de neurones testés avec la naloxone.

## 3/ Localisation des neurones étudiés

La répartition des neurones étudiés est indiquée sur la figure 33. Les neurones tubéroinfundibulaires ont leur corps cellulaire situé dans les aires périfornicale et périventriculaire, et dans les noyaux arqué et ventro-médian.

FIGURE 30 : Enregistrement graphique de l'activité unitaire d'un neurone endocrine. Effets inhibiteurs des 2 enképhalines. La naloxone (Nal) bloque les inhibitions induites par la leu- et la mét-enképhaline. La durée du blocage est fonction de la dose. .. : enregistrement interrompu durant 62 secondes. Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde. 10 secondes.

Met 64

Nal 44 Met 64

Met 64

Met 64

Met 64

Leu 85

Nal 44

Leu 85

Nal 44 Leu 85

Leu 85

Leu 85

Leu 85



FIGURE 31 : A : Sur une activité induite par le glutamate, les 2  
enképhalines ont un effet inhibiteur. L'application  
iontophorétique concurrente de naloxone ne supprime  
pas les inhibitions provoquées par la mét- et la leu-  
enképhaline.

B : Exemple d'un neurone tubéroinfundibulaire dont l'activité  
spontanée est seulement inhibée par la mét-enképhaline.  
La naloxone bloque cette inhibition.

C : Absence d'antagonisme de la naloxone sur un neurone  
dont l'activité est inhibée uniquement par la mét-  
enképhaline.

Calibrations : barres verticales, 10 potentiels d'action  
par seconde ; barres horizontales : 10 secondes.

BUS  
TITLE

Met 105      NaI 100      Met 105      Leu 108

Ⓒ

Met 92

Met 91      Met 92

Na 95      NaI 46      Met 91

Met 93      Leu 95

Ⓑ

Leu 86      Met 73      NaI      Met 73      Leu 86      21

32

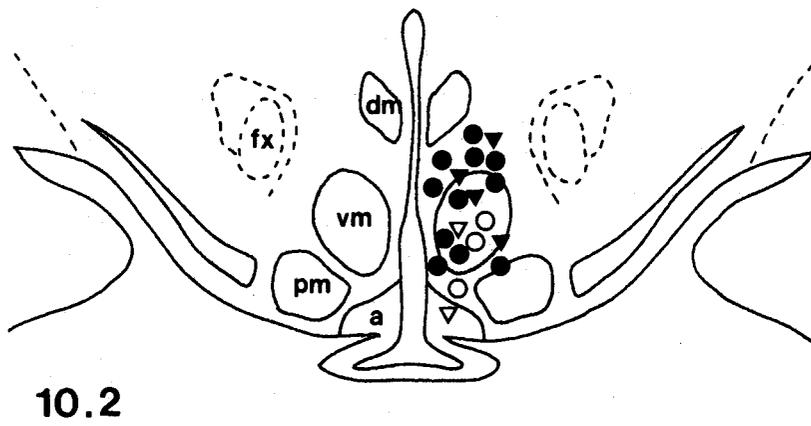
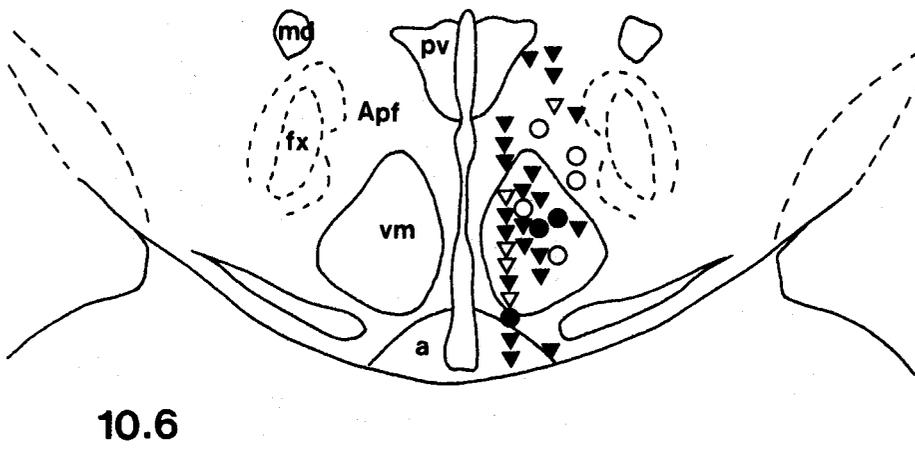
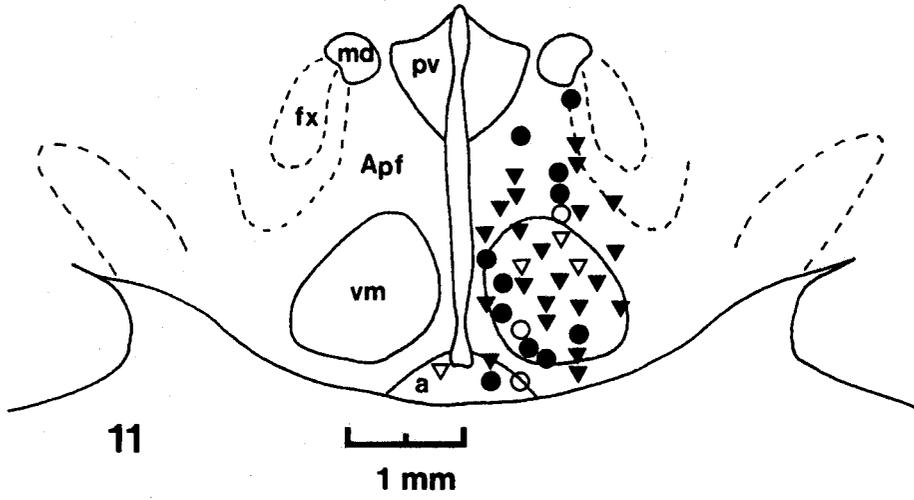
Ⓐ

FIGURE 32 : Deux exemples de neurones dont l'activité unitaire est inhibée seulement par la leu-enképhaline.  
En A : la naloxone bloque l'effet inhibiteur de l'enképhaline ; en B : la naloxone est inefficace.  
Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde,  
10 secondes.



FIGURE 33 : Localisation dans 3 plans antéro-postérieurs (d'après l'atlas de POULAIN, 1974) des effets des enképhalines sur des neurones endocrines (symboles vides) et sur des neurones adjacents (symboles noirs). Les triangles représentent les inhibitions par les 2 enképhalines ou 1 enképhaline, les ronds les absences d'effet.

Abréviations : a : noyau arqué ; Apf : aire inter-paraventricularo-fornicale ; dm : noyau dorso-médian ; fx : fornix ; md : noyau magnocellulaire dorsal ; pm : noyau pré-mamillaire ; pv : noyau paraventriculaire ; vm : noyau ventro-médian.



C - EFFETS DES ENKEPHALINES, DE LA NALOXONE ET DU MAGNESIUM SUR DES NEURONES ENDOCRINES ET ADJACENTS DE L'AIRE SEPTO-PREOPTIQUE ET DE LA BANDE DIAGONALE DE BROCA

L'étude est réalisée sur 30 cobayes femelles. Cent cinquante huit neurones sont testés. Parmi ces neurones, 19 sont activés antidromiquement par stimulation de l'éminence médiane.

1/ Effets des enképhalines

Sur les 19 neurones endocrines, 7 sont inhibés par les 2 enképhalines, 1 est inhibé par la mét-enképhaline seule. Les 2 enképhalines inhibent 31 des 139 autres neurones tandis que la mét-enképhaline seule inhibe 8 neurones. Des effets inhibiteurs complets sont obtenus, pour les neurones sans activité spontanée, sur une activité induite par le glutamate.

2/ Interactions avec la naloxone

Dans certaines expériences, concernant 74 neurones, la naloxone est testée sur 10 des 15 neurones inhibés par les deux enképhalines ou la mét-enképhaline seule. Cinq réponses inhibitrices sont bloquées par la naloxone. Elles sont réparties de la façon suivante : 1 neurone endocrine et 3 neurones non identifiés inhibés par les 2 enképhalines, et 1 neurone non identifié inhibé par la mét-enképhaline seule.

L'absence d'antagonisme par la naloxone est plus particulièrement observée dans le septum latéral.

### 3/ Interactions avec le magnésium

Dans d'autres expériences, concernant 84 neurones, le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) est testé sur 7 des 29 neurones inhibés par les 2 enképhalines. Parmi ces 7 neurones, il y a 3 neurones endocrines.

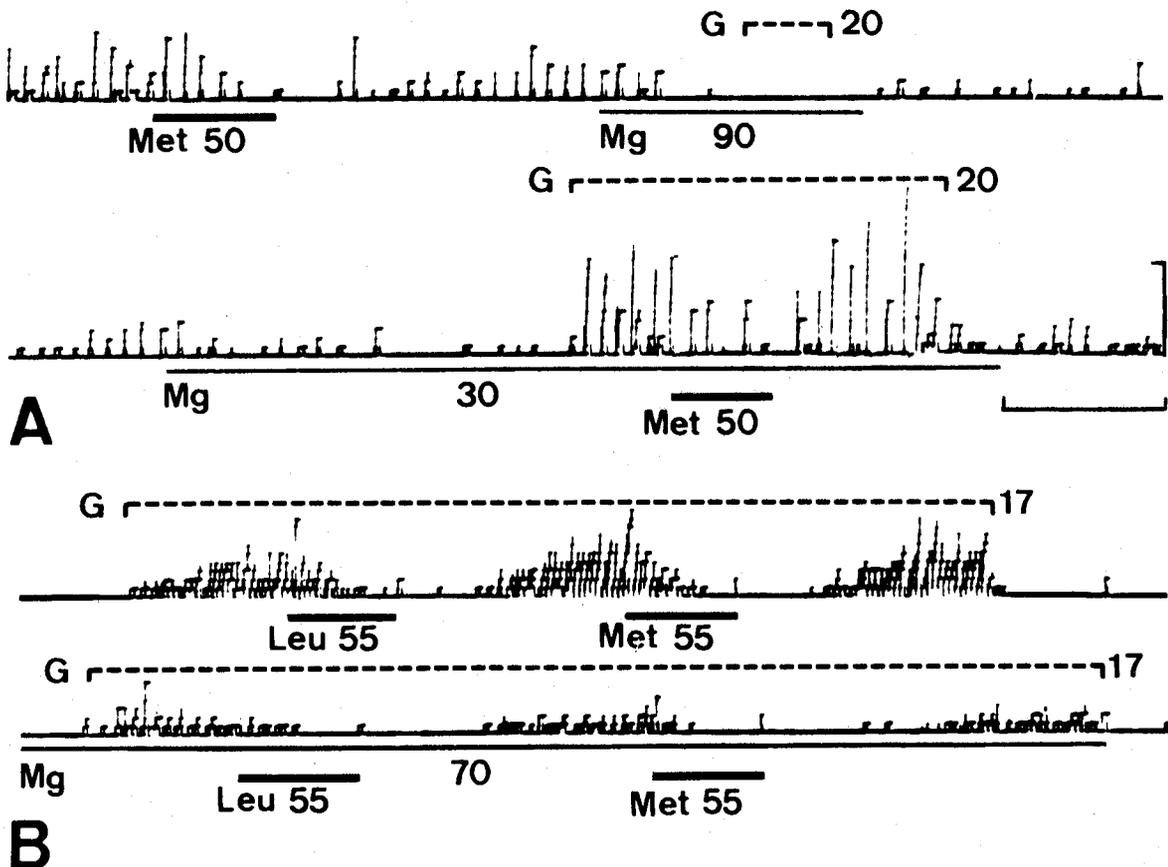
Le  $Mg^{2+}$  inhibe l'activité spontanée (figure 34 A). Avec de faibles courants pour l'éjection du  $Mg^{2+}$ , le glutamate est capable d'induire une activité sur des neurones dont l'activité spontanée est complètement inhibée, indiquant que le  $Mg^{2+}$  agit seulement au niveau présynaptique, sans interférer avec l'excitabilité du neurone enregistré (figure 34 A).

Cependant, quand le  $Mg^{2+}$  est éjecté avec des courants plus forts, le glutamate ne peut plus exciter le neurone (figure 34 A). Dans ce cas, le  $Mg^{2+}$  a une action inhibitrice postsynaptique en plus de son action présynaptique. Sur l'activité induite par le glutamate, de neurones dont l'activité spontanée est totalement inhibée par le  $Mg^{2+}$ , les enképhalines ont de nouveau un effet inhibiteur (figure 34 A). Cette observation, fournissant la preuve d'une action postsynaptique des peptides opioïdes, est faite à partir de 4 neurones dont 1 endocrine.

Dans le cas des neurones sans activité spontanée, les enképhalines sont testées en présence de glutamate, avec du  $Mg^{2+}$  appliqué en quantités suffisantes pour déprimer légèrement l'activité induite par le glutamate (figure 34 B). Dans ces conditions, les enképhalines ont un effet inhibiteur (figure 34 B). C'est le cas de 3 neurones dont 2 endocrines.

### 4/ Localisation des neurones étudiés

Les neurones endocrines sont localisés dans les aires préoptique et septale avec une localisation préférentielle dans la région préoptique médiane (figure 35). Les neurones non identifiés (139) sont dispersés à l'intérieur du septum médian, dorsal et latéral, de l'aire préoptique et de la bande diagonale de BROCA, (figure 35).



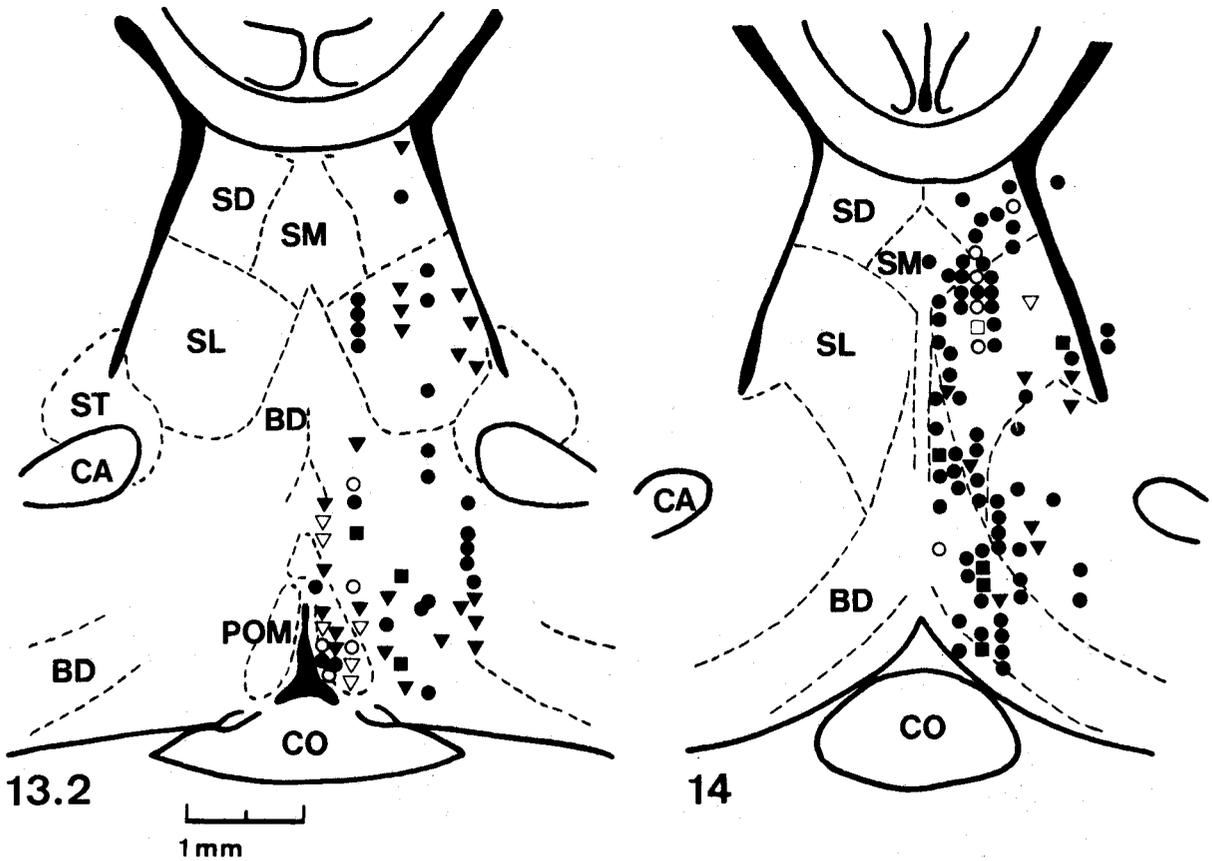
**FIGURE 34** : Enregistrements graphiques à partir de 2 neurones montrant l'absence d'effet du  $Mg^{++}$  sur des inhibitions induites par les enképhalines.

**A** : La mét-enképhaline a un effet inhibiteur. L'activité spontanée du neurone est inhibée par le  $Mg^{++}$  (Mg). Avec des doses élevées de  $Mg^{++}$  (90 nA), le glutamate est inefficace. Avec des doses plus faibles (30 nA), le glutamate induit une activité qui est inhibée par la mét-enképhaline. La leu-enképhaline a des effets similaires (non illustrés).

**B** : Les deux enképhalines inhibent complètement l'activité induite par le glutamate d'un neurone endocrine quiescent. En présence de  $Mg^{++}$ , qui déprime légèrement l'activité induite par le glutamate, les enképhalines ont le même effet inhibiteur complet.

Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde  
30 secondes.

505  
1972



**FIGURE 35** : Schémas de coupes transversales au niveau de l'aire préoptique et du septum selon l'atlas de POULAIN (1974) montrant la localisation des effets des enképhalines. Les symboles vides indiquent les neurones endocrines, les symboles pleins les neurones non identifiés. Les triangles représentent les inhibitions par les 2 enképhalines, les carrés les réponses inhibitrices par la mét-enképhaline seule, et les cercles les absences d'effet.

Abréviations : BD : bande diagonale de BROCA ; CA : commissure antérieure ; CO : chiasma optique ; POM : aire préoptique médiane ; SD : noyau septal dorsal ; SL : noyau septal latéral ; SM : noyau septal médian ; ST : noyau du lit de la strie terminale.

### III - DISCUSSION

#### A - EFFETS ELECTROPHYSIOLOGIQUES DES ENKEPHALINES SUR LES NEURONES

##### 1/ Types d'effets des enképhalines sur les neurones du système nerveux central

###### a) Neurones de l'hypothalamus et du septum

Les enképhalines ont un effet uniquement inhibiteur sur l'activité unitaire des neurones hypothalamiques ou septaux, qu'ils répondent ou non à la stimulation de la région de l'éminence médiane (CARETTE et POULAIN, 1978 ; CARETTE, 1981 ; CARETTE et POULAIN, 1981). Dans des études électrophysiologiques in vitro, les enképhalines ont également des effets inhibiteurs sur des neurones endocrines et non endocrines du noyau paraventriculaire (MUEHLETHALER et coll., 1980 ; PITTMAN et coll. 1980). Sur des neurones du noyau ventro-médian et de l'aire hypothalamique latérale, sensibles au glucose, les enképhalines provoquent des réponses excitatrices ou inhibitrices (ONO et coll. 1980).

###### b) Autres neurones du système nerveux central

L'action cellulaire des peptides opioïdes dans d'autres aires du système nerveux central est le sujet de nombreux travaux et typiquement, une inhibition de l'activité unitaire des neurones survient durant l'application iontophorétique (NORTH, 1979). Cependant, dans certaines régions du cerveau, des effets excitateurs par les enképhalines sont observés en majorité, en particulier dans l'hippocampe (NICOLL et coll. 1977) et sur les cellules de RENSHAW (DAVIES et DRAY, 1976).

## 2/ Effets des enképhalines sur l'activité évoquée par le glutamate

La pratique est largement répandue d'appliquer par iontophorèse, du glutamate sur des neurones "silencieux" ou faiblement actifs spontanément afin de les exciter et de tester ainsi des substances susceptibles d'être inhibitrices. Comme indiqué précédemment, dans l'hypothalamus, le pourcentage de neurones se révélant spontanément actifs est faible, surtout en ce qui concerne les neurones endocrines. Par conséquent, les enképhalines dans notre étude, sont souvent testées sur des activités induites par le glutamate sur lesquelles elles sont inhibitrices. De plus, nous n'avons pas observé d'effet antiglutamate sélectif des peptides opioïdes, autrement dit les excitations par le glutamate sont inhibées de la même manière que l'activité spontanée du neurone. NICOLL et coll. (1977) rapportent des observations similaires.

Le glutamate est une substance connue pour agir postsynaptiquement en déclenchant une dépolarisation qui est associée à une augmentation de la perméabilité membranaire au sodium (CURTIS et JOHNSON, 1974). Ces enképhalines inhibant totalement l'activité induite par le glutamate de neurones silencieux, il semble donc que les peptides opioïdes agissent à des sites postsynaptiques.

## 3/ Phénomène de désensibilisation

Que ce soit sur des activités spontanées ou induites par le glutamate, nous n'observons pas de phénomène de désensibilisation à la suite de l'application répétée d'enképhalines. Des résultats similaires sont également obtenus par NICOLL et coll. (1977) dans des expériences in vivo, par PITTMAN et coll. (1980) dans des expériences in vitro.

A l'inverse, il y a des preuves à partir d'études iontophorétiques, que des neurones du système nerveux central montrent une désensibilisation à l'application répétée d'enképhalines et de morphine (FRY et coll., 1978 ; SATOH et coll. 1974).

#### 4/ Neurones sensibles à une enképhaline et non à l'autre

Dès leur découverte et leur identification, méthionine-enképhaline et leucine-enképhaline font l'objet de nombreuses études électrophysiologiques. Cependant, les effets des 2 enképhalines sont rarement étudiés simultanément sur un même neurone, et ce sont surtout les effets de la mét-enképhaline qui sont rapportés. Ceci peut simplement être dû au fait que cette enképhaline est plus facilement disponible ou bien qu'elle se révèle plus active (HUGHES et coll. 1975 a).

Au niveau de l'hypothalamus et de la région rostrale de l'hypothalamus, où systématiquement nous avons testé les deux enképhalines sur un même neurone, il apparaît que certaines cellules nerveuses sont sensibles à une enképhaline mais non à l'autre.

##### a) Nos résultats ne sont pas dus à la technique utilisée

Nos observations peuvent être dues à des variations dans la quantité de substance libérée à partir des micropipettes. Le nombre transport d'un composé varie en effet d'une pipette à l'autre. Ainsi, il est possible que certaines différences de sensibilité à la leu-enképhaline et à la mét-enképhaline puissent être dues à des différences dans les nombres transport des 2 substances contenues dans 2 pipettes. Cependant, des études montrent que la leu-enképhaline, même avec de faibles nombres transport pour certaines pipettes, est efficace in vivo (BRADLEY et coll., 1978).

Une autre explication est possible en se basant sur les variations de distance entre pointe de microélectrode et corps cellulaire du neurone étudié. Dans le cas des neurones répondant aux deux enképhalines, la distance pointe de pipette, corps cellulaire est si faible que la diffusion et/ou la dégradation enzymatique n'empêchent pas l'une ou l'autre substance d'atteindre le site d'action à des concentrations efficaces. Dans le cas des neurones répondant à une enképhaline mais non à l'autre, si la distance pointe de pipette, corps cellulaire est plus grande, la diffusion et/ou la dégradation enzymatique peuvent empêcher l'une des substances d'atteindre à des concentrations suffisantes le site d'action. La dégradation enzymatique apparaît similaire pour les deux enképhalines, une aminopeptidase libérant la tyrosine,

l'acide aminé N terminal de la molécule (SCHWARTZ et ROQUES, 1980). Si la diffusion empêche l'une des enképhalines de bloquer l'activité, elle aurait également empêché l'autre d'agir. La diffusion des deux peptides à travers l'espace extracellulaire doit être similaire pour les deux substances qui ont des structures proches l'une de l'autre. De plus, les deux enképhalines sont toujours placées dans deux canaux adjacents de la micropipette multiple et ainsi sont pratiquement éjectées à partir du même site par rapport au corps cellulaire.

En conclusion, il apparaît difficile de rendre compte des effets différents de la mét-enképhaline et de la leu-enképhaline sur certains neurones en se basant sur les variations de la quantité de substance éjectée et sur les variations de distance entre pointe d'électrode et corps cellulaire. D'ailleurs, au cours d'une expérience, la même micropipette permet de déceler des neurones sensibles aux deux enképhalines et des neurones sensibles à une seule enképhaline, et en présence d'un neurone répondant à un seul peptide opioïde, le déplacement de l'électrode par rapport au corps cellulaire n'altère pas la réponse obtenue.



b) Etudes électrophysiologiques à l'appui de nos observations

Des études sur des neurones du tronc cérébral indiquent que sur certaines cellules nerveuses, la mét-enképhaline est efficace, tandis que la leu-enképhaline ne l'est pas (BRADLEY et coll., 1978).

De même, en dépit du fait que des substances opioïdes endogènes et exogènes apparaissent agir de façon similaire sur le même neurone (NORTH, 1979), d'autres études iontophorétiques montrent une sensibilité différentielle de neurones centraux envers ces substances. Ainsi, mét-enképhaline et morphine ont des effets différents sur l'activité unitaire de neurones de la formation réticulaire mésencéphalique, en ce sens que certains neurones répondent aux deux substances tandis que d'autres sont sensibles à l'une mais non à l'autre (HOSFORD et HAIGLER, 1980). Ces auteurs valident d'ailleurs leurs résultats en effectuant des mesures, *in vitro*, des quantités éjectées microiontophorétiquement pour chaque substance (HOSFORD et coll., 1981). Ils observent que l'une des substances, bien qu'éjectée en quantités nettement

supérieures à celles de l'autre substance active, demeure sans effet.

Sur des neurones du ganglion isolé du plexus myentérique de l'iléon de cobaye, sont appliqués la dihydromorphine (10 nM) et un analogue de la leu-enképhaline (1 nM) par perfusion (EGAN et NORTH, 1981). Tandis que certains neurones répondent aux deux substances, d'autres sont inhibés par l'une mais non par l'autre.

#### c) Observations morphologiques

Notre première observation de neurones hypothalamiques sensibles à une enképhaline mais non à l'autre nous a conduit à supposer l'existence d'une distribution différente de neurones contenant soit la leu-enképhaline, soit la mét-enképhaline (CARETTE et POULAIN, 1978). Par la suite, cette existence est démontrée par des études immunocytochimiques (LARSSON et coll., 1979 ; MARTIN et VOIGT, 1981) ou par celles concernant l'ontogénèse des enképhalines dans le système nerveux central (PATEY et coll., 1980).

#### d) Fonctions différentielles de la leu-enképhaline et de la mét-enképhaline

La distribution différentielle des deux enképhalines suggère que des fonctions séparées existent pour chaque pentapeptide. Diverses études soutiennent cette hypothèse, en démontrant que l'interaction des deux enképhalines avec un même composé exogène est différente (COWAN et coll., 1976 ; VAUGHT et TAKEMORI, 1979 a, b).

#### e) Récepteurs pour la leu-enképhaline, récepteurs pour la mét-enképhaline

Les effets différents des deux enképhalines sur l'activité unitaire de certains neurones hypothalamiques supportent l'hypothèse qu'il y a des récepteurs distincts pour ces pentapeptides dans l'hypothalamus (CARETTE et POULAIN, 1978). Cette suggestion est confirmée par des données

qui seront développées dans le paragraphe suivant consacré à l'interaction de la naloxone avec les effets des enképhalines.

## B - EFFETS DES ENKEPHALINES : INTERACTION AVEC LA NALOXONE

### 1/ Existence de récepteurs morphiniques multiples

Des études pharmacologiques (MARTIN et coll., 1976), utilisant différentes substances morphiniques suggèrent la présence, dans le cerveau, de multiples récepteurs morphiniques : mu, sigma et kappa. La naloxone est généralement considérée comme un antagoniste spécifique de la morphine et autres substances opiacées (MARTIN, 1967).

### 2/ Etudes électrophysiologiques

Dans la plupart des études électrophysiologiques, la naloxone est appliquée soit par iontophorèse, soit par injection intraveineuse afin de déterminer la spécificité des réponses observées avec les enképhalines. Nos études montrent que des effets inhibiteurs des enképhalines sont bloqués par la naloxone, appliquée par iontophorèse, tandis que d'autres inhibitions sont résistantes à cet antagoniste. Des observations similaires sont faites dans des études iontophorétiques in vivo (HILL et coll., 1976 ; FRY et coll. 1979). Plusieurs raisons sont invoquées pour expliquer l'absence d'antagonisme par la naloxone de certains effets inhibiteurs des enképhalines : l'échec de la libération de la naloxone à partir de la micropipette (HILL et PEPPER, 1978) ou le fait que des concentrations trop élevées d'enképhalines atteignent le neurone étudié, provoquant des réponses non spécifiques. Dans le premier cas, la preuve d'une libération de la naloxone par la micropipette est obtenue en raison du fait que cette substance, éjectée avec des courants suffisamment élevés, peut elle-même avoir un effet anesthésique local entraînant une inhibition de l'activité unitaire (NICOLL et coll., 1977). Néanmoins, dans cette situation, un antagonisme n'est pas observé. Dans le deuxième cas, les concentrations des substances produites électrophorétiquement et atteignant les sites d'action ne peuvent être déterminées, ce qui peut toujours permettre d'affirmer que les réponses non bloquées ne sont pas spécifiques.

La comparaison entre les résultats obtenus grâce à l'iontophorèse et ceux obtenus à l'aide de techniques qui permettent l'application de concentrations connues et uniformes de substances autorise des conclusions différentes. Ainsi, des observations, *in vitro*, d'effets inhibiteurs des enképhalines non bloqués par la naloxone montrent que de tels effets ne sont pas nécessairement non spécifiques puisque, dans ce cas, les concentrations d'enképhalines appliquées aux neurones sont connues d'une part, l'application de naloxone est certaine, d'autre part, (PITTMAN et coll., 1980).

### 3/ Récepteurs mu et récepteurs delta

En utilisant la mesure directe de la liaison de ligands à des préparations membranaires, *in vitro*, pour étudier la sélectivité des récepteurs morphiniques, deux types de sites de liaison sont distingués dans le tissu nerveux (LORD et coll., 1977 ; CHANG et CUATRECASAS, 1979). L'un de ces sites, avec une affinité sélective pour les opiacés alcaloïdes comme la morphine, peut correspondre au récepteur mu de MARTIN et coll. (1976). L'autre montre une sélectivité pour les enképhalines, il est appelé récepteur delta par LORD et coll. (1977). Une catégorie de ces récepteurs, ceux appelés mu, est très sensible à la naloxone tandis que l'autre, correspondant aux récepteurs delta, est insensible ou nécessite une plus forte concentration de naloxone pour qu'un antagonisme se produise (CHANG et CUATRECASAS, 1979). Récemment, SNYDER et GOODMAN (1980) suggèrent que les récepteurs mu et delta sont respectivement les récepteurs physiologiques pour les actions synaptiques des neurones à mét-enképhalines et des neurones à leu-enképhaline. En outre, des différences dans les localisations des sites mu et delta qui correspondent aux différences dans les localisations des neurones à mét-enképhaline et à leu-enképhaline sont décrites (GOODMAN et coll., 1980), venant à l'appui de cette hypothèse.

Selon les effets des deux enképhalines, appliquées par iontophorèse, sur leur activité unitaire, les neurones hypothalamiques sont classés en quatre groupes. Dans le premier groupe, les 2 peptides opioïdes bloquent l'activité unitaire. Dans le second groupe, la mét-enképhaline mais non la leu-enképhaline inhibe l'activité. Dans le troisième groupe, la leu-enképhaline seule agit. Dans la quatrième, aucun des peptides opioïdes n'est actif. L'antagonisme et l'absence d'antagonisme par la naloxone sont observés

dans les trois premiers groupes de neurones, mentionnés auparavant. En fonction des observations précédentes et des données exposées au début de ce paragraphe, il peut être supposé que les neurones du premier groupe possèdent des récepteurs mu et delta, ceux du deuxième groupe des récepteurs mu, ceux du troisième groupe, des récepteurs delta. Il faut également supposer que les récepteurs mu sont plus sensibles à la mét-enképhaline qu'à la leu-enképhaline (neurones du second groupe) et qu'inversement, les récepteurs delta sont plus sensibles à la leu-enképhaline qu'à la mét-enképhaline (neurones du troisième groupe).

Ces différences de sensibilité des 2 enképhalines vis-à-vis des récepteurs mu et delta existent bien selon le schéma de HUGHES (1981) mais elles ne sont pas aussi marquées que celles existant entre morphine et peptides opioïdes vis-à-vis des mêmes récepteurs.

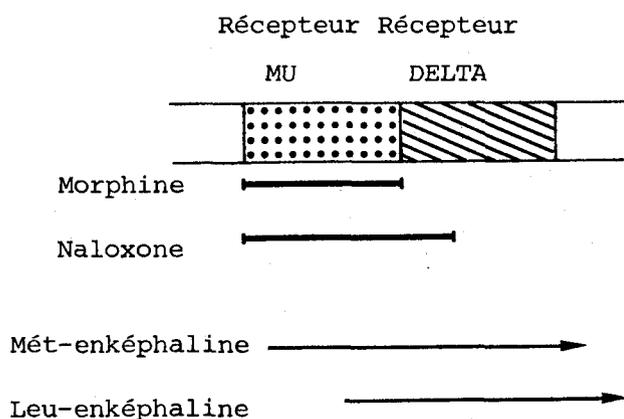


FIGURE 36 : Spectre des activités réceptrices morphiniques  
(d'après HUGHES , 1981).

Ainsi nos résultats électrophysiologiques ne peuvent s'expliquer selon l'hypothèse proposée par SNYDER et GOODMAN (1980). Un neurone ne possédant que des récepteurs delta, soumis à l'application iontophorétique des deux peptides opioïdes, répondrait à la leu-enképhaline, mais également à la mét-enképhaline en raison du fait que ce dernier peptide opioïde possède une affinité pour les récepteurs delta. A l'inverse, un neurone

ayant des récepteurs mu, aurait son activité unitaire inhibée par la mét-enképhaline mais moins sûrement par la leu-enképhaline puisque ce dernier peptide opioïde a une plus faible affinité pour les récepteurs mu.

Selon le schéma de HUGHES (1981), la naloxone, antagoniste des récepteurs mu, doit bloquer les effets de la mét-enképhaline à travers ces récepteurs, sans supprimer les effets de la leu-enképhaline à travers les récepteurs delta. Dans le cas de neurones uniquement sensibles à la mét-enképhaline, les effets de cette enképhaline ne sont pas toujours bloqués par la naloxone. Inversement, lorsque seule la leu-enképhaline a un effet inhibiteur sur un neurone, un antagonisme par la naloxone est parfois observé.

Des résultats électrophysiologiques obtenus *in vitro* supportent cette distinction récepteurs mu, récepteurs delta lorsque des agonistes et des antagonistes sélectifs de chacun de ces récepteurs sont utilisés. Parmi les neurones myentériques (EGAN et NORTH, 1981), beaucoup sont inhibés à la fois par un agoniste des récepteurs mu et un agoniste des récepteurs delta. Un plus faible pourcentage de neurones est inhibé par un agoniste mais non par l'autre. L'application d'une faible concentration de naloxone aux neurones inhibés par les 2 types d'agonistes bloque l'inhibition produite par l'agoniste des récepteurs mu mais non celle produite par des agonistes des récepteurs delta. *In vitro* donc, il est possible de distinguer sur des neurones myentériques, les deux types de récepteurs mu et delta en utilisant à la fois, des concentrations faibles de chaque agoniste et de l'antagoniste naloxone.

Certains résultats sont en contradiction avec le schéma donné par SNYDER et GOODMAN (1980) : récepteurs mu pour les neurones à mét-enképhaline, récepteurs delta pour les neurones à leu-enképhaline. Ainsi, dans le cerveau de bovins, il apparaît qu'il n'y a pas de corrélation entre la localisation des récepteurs mu et delta et celle de la mét- et de la leu-enképhaline (NINKOVIC et coll., 1981). Dans toutes les régions du cerveau, il y a une plus grande concentration de mét-enképhaline que de leu-enképhaline tandis que le rapport des concentrations des récepteurs mu sur celles des récepteurs delta est soit supérieur à 1, soit inférieur à 1 selon les aires considérées. Des études concernant l'autoalgésie (DE VRIES et coll., 1979) indiquent l'existence dans le système nerveux central, de deux classes de récepteurs pour la leu-enképhaline

dont l'une n'est pas bloquée par la naloxone tandis que l'autre l'est. OKA (1980) rapporte que les enképhalines peuvent inhiber la réponse du muscle longitudinal de l'iléon de lapin à la stimulation électrique. La morphine se révèle inefficace, bien que la naloxone bloque l'inhibition induite par les enképhalines. Il existe ainsi des exemples tant au niveau du système nerveux central qu'au niveau périphérique qui ne supportent pas l'hypothèse formulée auparavant. Pour déterminer à travers quel type de récepteur les effets des enképhalines surviennent, la naloxone n'apparaît pas comme un antagoniste très sélectif d'un récepteur donné. Actuellement, des travaux sont réalisés dans le but de synthétiser des analogues de substances opioïdes ayant une affinité très sélective pour un type de récepteur.

#### C - ACTIONS PRE ou POST-SYNAPTIQUES DES ENKEPHALINES

Lorsque des substances sont appliquées par iontophorèse, au voisinage immédiat de neurones dont on enregistre l'activité unitaire extra-cellulaire, le site d'action précis de la substance testée n'est pas déterminé. On ne peut réellement distinguer entre effets directs c'est-à-dire post-synaptiques sur le neurone étudié, effets indirects soit pré-synaptiques, soit sur un interneurone voisin.

Il y a de nombreuses preuves indiquant que morphine et peptides opioïdes peuvent agir aussi bien post- que pré-synaptiquement, ainsi que sur des interneurones voisins. Par des techniques de lésion, des récepteurs morphiniques pré- et post-synaptiques sont localisés dans des régions du cerveau comme le striatum (MURRIN et coll., 1980). Morphine et peptides opioïdes inhibent la libération de la substance P, de la dopamine, de l'acétylcholine et de la noradrénaline dans le système nerveux central (BEAUMONT et HUGHES, 1979). Cette possibilité d'action est en faveur d'un site d'action pré-synaptique. Opiates et peptides opioïdes déclenchent des réponses excitatrices sur les cellules pyramidales de l'hippocampe. Ces excitations résultent d'une inhibition d'interneurones inhibiteurs voisins sur lesquels les peptides opioïdes, appliqués par iontophorèse, ont agi (ZIEGLGANSBERGER et coll., 1979). La capacité des peptides opioïdes d'inhiber l'action excitatrice post-synaptique du glutamate est considérée comme constituant une preuve d'un site d'action post-synaptique (ZIEGLGANSBERGER et TULLOCH, 1979). De telles observations sont

faites sur des neurones endocrines comme sur des neurones non identifiés. Cependant, il y a toujours la possibilité que le glutamate provoque la libération d'un neurotransmetteur excitateur à partir d'un neurone voisin. Une action pré-synaptique peut mieux être exclue en bloquant la transmission synaptique par des ions magnésium (JENKINSON, 1957). Dans des études électrophysiologiques *in vitro*, des milieux dans lesquels la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est diminuée, celle en  $\text{Mg}^{++}$  augmentée, sont utilisés pour bloquer la transmission synaptique (GAHWILER, 1980). Dans des études électrophysiologiques *in vivo*, l'iontophorèse des ions  $\text{Mg}^{++}$  produit un blocage synaptique localisé au neurone étudié (NICOLL, 1971). C'est cette technique qui a permis à ZIEGLGANSBERGER et coll. (1979) d'affirmer que les excitations des cellules pyramidales de l'hippocampe sont dues à une inhibition par les enképhalines d'interneurones inhibiteurs. Ces excitations sont bloquées par le magnésium. Au niveau du cortex cérébral (PALMER et HOFFER, 1980), les inhibitions provoquées par un analogue des enképhalines ne sont pas supprimées par le  $\text{Mg}^{++}$  appliqué iontophorétiquement, ce qui indique une action post-synaptique des enképhalines au niveau des neurones. Nos observations au niveau de neurones septo-préoptiques permettent une conclusion similaire. Dans le cas de neurones spontanément actifs, l'activité unitaire peut être bloquée totalement par les ions  $\text{Mg}^{++}$ , ce qui laisse supposer que cette activité est synaptique. Les enképhalines sont ensuite testées sur une activité induite par le glutamate. Dans le cas de neurones quiescents, les enképhalines sont également testées en présence d'ions  $\text{Mg}^{++}$ . Comme précédemment démontré (SOMJEN et KATO, 1968), les ions  $\text{Mg}^{++}$  comme les ions  $\text{Ca}^{++}$  peuvent inhiber l'activité évoquée par le glutamate quand ils sont appliqués par iontophorèse *in vivo*. Cet effet peut être en relation avec une action des cations divalents sur le seuil pour la genèse des potentiels d'action (RICHARDS et SERCOMBE, 1970). Dans notre étude, des effets similaires du  $\text{Mg}^{++}$  sur l'activité induite par le glutamate sont observés, ces effets survenant avec des courants iontophorétiques pour l'éjection du  $\text{Mg}^{++}$  supérieurs à ceux nécessaires au blocage de l'activité synaptique. Par conséquent, dans le cas de neurones sans activité spontanée, avec des courants d'éjection du  $\text{Mg}^{++}$  qui inhibent légèrement l'activité évoquée par le glutamate, nous pouvons supposer que la transmission synaptique est également inhibée. Les effets inhibiteurs des enképhalines obtenus sur une activité induite par le glutamate légèrement inhibée par le  $\text{Mg}^{++}$ , indiquent vraisemblablement une action post-synaptique des peptides opioïdes.

Des résultats différents en ce qui concerne l'effet du magnésium sur les réponses de neurones de la moëlle épinière à des acides aminés excitateurs sont obtenus (DAVIES et WATKINS, 1977). Ces auteurs indiquent que les effets du  $Mg^{++}$  sur l'activité induite par le glutamate s'observent avec des courants relativement faibles tandis que des courants plus élevés sont nécessaires pour réduire l'activité spontanée ou l'activité induite synaptiquement des neurones. Cette discordance dans les résultats est peut-être due à la différence de conformation des électrodes multiples employées dans les deux études. Avec des électrodes présentant une saillie, comme c'est le cas dans notre étude, l'application iontophorétique de  $Mg^{++}$  est plus dendritique que somatique et peut ainsi plus facilement bloquer la transmission synaptique. Ou inversement, la source des ions  $Mg^{++}$  étant plus éloignée avec une électrode présentant une saillie, plus de courant est nécessaire pour que le  $Mg^{++}$  agisse au niveau du corps cellulaire pour inhiber l'activité induite par le glutamate.

Le fait que nous ayons observé des effets post-synaptiques des enképhalines sur des neurones du septum latéral est étayé par des observations immunocytochimiques au niveau ultrastructural, indiquant la présence de terminaisons nerveuses enképhalinerigiques faisant synapse avec des corps cellulaires de neurones dans le septum latéral du cobaye (BEAUVILLAIN, observations non publiées). Des observations similaires en microscopie optique sont également faites par SAR et coll. (1978) dans la région du septum latéral chez le rat.

## D - ENKEPHALINES ET CONTROLE NEUROENDOCRINE

### 1/ Enképhalines et contrôle de la fonction LH

Dès 1955, BARRACLOUGH et SAWYER rapportent que la morphine injectée durant la période critique du pro-oestrus empêche l'ovulation chez des rattes. Après la découverte et l'isolement en 1975 des enképhalines, un effet similaire de ces peptides opioïdes sur la fonction LH est rapportée (BRUNI et coll. 1977). Différentes études sont entreprises pour déterminer sites et mécanismes d'action des enképhalines dans le contrôle de la sécrétion hypophysaire de LH.

- Action au niveau de l'adénohypophyse  
=====

Deux séries d'étude (MAY et coll. 1979, DEMOULIN et coll., 1980) indiquent que les enképhalines n'agissent pas par elles-mêmes au niveau de l'hypophyse, mais elles modifient les réponses de LH à LHRH. Cependant, selon CICERO et coll. (1977), les opiacés n'interfèrent pas avec l'action de LHRH sur la libération hypophysaire de LH.

- Action au niveau de l'éminence médiane  
=====

Les peptides opioïdes, agissant au niveau de l'éminence médiane, n'affectent pas directement la libération spontanée de LHRH, mais bloquent l'effet stimulateur de la dopamine sur la libération de LHRH (ROTSZTEJN et coll., 1978). Les peptides opioïdes peuvent également inhiber la libération de LHRH induite par le potassium à travers des récepteurs des opiacés (DROUVA et coll., 1981).

- Action au niveau de l'hypothalamus et du septum  
=====

La présence de terminaisons à enképhaline surtout dans l'aire préoptique (TRAMU et coll., 1981) où sont localisés des corps cellulaires de neurones à lulibérine (BARRY et coll., 1973), soulève la possibilité d'une interaction fonctionnelle entre peptides opioïdes et neurones à LHRH chez le cobaye. Nos résultats apportent la preuve qu'une telle interaction est possible puisque les enképhalines inhibent l'activité unitaire de neurones endocrines présumés à LHRH en raison de leur localisation. L'effet des enképhalines est spécifique : il est bloqué par la naloxone, post-synaptique : les ions  $Mg^{++}$  sont sans effet.

D'autres études suggèrent que les aires préoptique et hypothalamique antérieure peuvent représenter le site d'action des enképhalines dans le contrôle de la sécrétion de LH puisque l'implantation de naloxone dans cette région provoque une stimulation de la libération de LH (KALRA et coll., 1981). La seule autre zone où la naloxone a le même effet est la région noyau arqué-éminence médiane (KALRA et coll., 1981). Cette dernière observation est

bien en corrélation avec les études de ROTSZTEJN et coll. (1978) et DROUVA et coll. (1981). Des expériences de déafférentation indiquent que les connexions nerveuses entre l'aire préoptique, l'hypothalamus antérieur et l'hypothalamus médio-basal sont indispensables pour une inhibition de LH par les peptides opioïdes (HIGUCHI et KAWAKAMI, 1981). Ces effets peuvent survenir à travers des récepteurs cholinergiques et/ou aminergiques. Cependant, le site de ces interactions n'est pas déterminé (HIGUCHI et KAWAKAMI, 1981).

## 2/ Enképhalines et contrôle des autres fonctions adénohypophysaires

### - Action au niveau de l'adénohypophyse

Une interaction peptide opioïde-dopamine au niveau de l'hypophyse apparaît impliquée dans la régulation de la sécrétion de prolactine (ENJALBERT et coll., 1979). Cependant, pour d'autres hormones adénohypophysaires, l'action des enképhalines ne semble pas se situer au niveau de l'hypophyse puisqu'il y a absence d'effet des enképhalines sur ces glandes in vitro (MEITES et coll., 1979).

### - Action au niveau de l'éminence médiane

Les peptides opioïdes agissent à travers des récepteurs morphiniques localisés sur des terminaisons à SRIF, pour moduler la libération de ce facteur hypophysiotrope (DROUVA et coll., 1981).

### - Action au niveau hypothalamique

Nos résultats démontrent que des neurones tubéroinfundibulaires dont les corps cellulaires sont situés dans l'hypothalamus médio-basal ont leur activité unitaire inhibée par les enképhalines. Nous postulons par conséquent que les neurones contenant des enképhalines peuvent contrôler les sécrétions adénohypophysaires à travers des connexions avec les neurones tubéroinfundibulaires. Ces derniers peuvent être des neurones élaborant des

hormones peptidiques (par exemple, des neurones TRH sont démontrés dans l'aire périfornicale (HOKFELT et coll., 1978)) ou des neurones dopaminergiques dans le noyau arqué où leur corps cellulaire est entouré de terminaisons nerveuses contenant des enképhalines (HOKFELT et coll. 1978).

En dehors de preuves morphologiques, il existe des résultats qui permettent de supposer que l'hypothalamus médio-basal est un site d'action pour les enképhalines dans la régulation des sécrétions adénohypophysaires. Ainsi l'administration systémique de morphine a pour résultat une réduction marquée de la sécrétion de dopamine hypothalamique dans le sang porte hypophysaire (GUDELSKY et PORTER, 1979). Le site d'action de la morphine est précisé par HASKINS et coll. (1981). Ces auteurs injectent la morphine dans le noyau arqué et observent une diminution de la concentration de dopamine dans le sang porte hypophysaire. Ils suggèrent que la morphine agit sur un récepteur morphinique dans le noyau arqué pour supprimer la sécrétion de dopamine à partir de neurones tubéroinfundibulaires dans le sang porte hypophysaire. Des injections intrahypothalamiques locales et des injections systémiques combinées à des déafférentations hypothalamiques démontrent que les peptides opioïdes agissent au niveau de l'hypothalamus médio-basal dans le contrôle de certaines sécrétions adénohypophysaires (GRANDISON et coll., 1980).

Récemment, différentes études (SPAMPINATO et coll. 1979 ; CASANUEVA et coll., 1980, 1981) suggèrent que les enképhalines exercent leurs effets sur certaines sécrétions hypophysaires à travers des systèmes sérotoninergiques, cholinergiques ou histaminergiques. Cependant, le site de ces différentes interactions n'est pas connu.

### 3/ Sites d'action proposés pour les effets des enképhalines sur les sécrétions neurohypophysaires

Différentes études (CLARKE et coll. 1979, IVERSEN et coll. 1980, LUTZ-BUCHER et KOCH, 1980) montrent que l'action des enképhalines sur les sécrétions neurohypophysaires se situe au niveau de la neurohypophyse, essentiellement à travers des contacts axo-axoniques.

Cependant, dans le cas des neurones à vasopressine, l'injection intraventriculaire de morphine entraîne une inhibition de la décharge phasique des neurones (CLARKE et coll. 1980). Un autre site d'action pour les opiacés et les peptides opioïdes dans le contrôle de la sécrétion de vasopressine est donc proposé, à un niveau cependant qui ne peut être précisé par ce type d'expériences. Des études électrophysiologiques in vitro indiquent que le site d'action des enképhalines peut être le corps cellulaire des neurones paraventriculaires (MUEHLETHALER et coll. 1980). De plus, PITTMAN et coll. (1980) montrent, à partir de coupes d'hypothalamus, que l'effet des enképhalines peut s'exercer sur le corps cellulaire de neurones paraventriculaires identifiés antidromiquement par stimulation de la neurohypophyse.

Un double site d'action des peptides opioïdes dans le contrôle de la vasopressine est donc proposé : au niveau de la neurohypophyse par contact axo-axonique, au niveau du noyau paraventriculaire sur les corps cellulaires de neurones à vasopressine.

De multiples sites d'action apparaissent également possible pour les enképhalines dans le contrôle des sécrétions adénohypophysaires. Outre l'adénohypophyse, il y a l'éminence médiane où l'action peut s'exercer à travers des contacts axo-axoniques entre terminaisons à enképhaline et terminaisons à dopamine ou contenant des facteurs hypophysiotropes. Nous proposons à partir d'études électrophysiologiques in vivo, un site d'action des enképhalines au niveau de corps cellulaires de neurones dopaminergiques ou de neurones élaborateurs d'hormones hypophysiotropes.

CHAPITRE V

---

---

STEROIDES

---

---

## I - INTRODUCTION

Les hormones stéroïdes, sécrétées par les gonades et le cortex surrénal, exercent des effets sur différents tissus cibles tels que tractus génital, cerveau et hypophyse. Ces effets sont nombreux sur le cerveau et se manifestent, en particulier, sur son activité électrique. BARRACLOUGH et CROSS (1963) démontrent les premiers, une modification de l'activité unitaire de neurones hypothalamiques à la suite d'injections systémiques de stéroïdes. Par la suite, de nombreux travaux indiquent que l'activité électrique de neurones hypothalamiques varie en fonction du cycle oestral. Elle est également influencée, chez des animaux ovariectomisés, par des traitements à court terme ou à long terme d'oestrogènes (références dans les revues de RICHARD et coll., 1978, DUFY et DUFY-BARBE, 1978).

Cependant, avec ces protocoles expérimentaux, il n'est pas possible de faire la distinction entre effets hormonaux directs sur le neurone étudié et effets secondaires dus à des effets hormonaux intervenant au niveau des afférences du neurone étudié. Ces problèmes peuvent être surmontés en utilisant la technique de microiontophorèse. Les stéroïdes naturels sont faiblement acides en milieu aqueux, forment difficilement des sels avec  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , et, par conséquent, ne peuvent pas être éjectés, à partir de micro-pipettes, par des courants. Des stéroïdes conjugués acides sont par conséquent utilisés. Ainsi, KELLY et coll. (1976) observent un effet direct du  $17\beta$  oestradiol-hémisuccinate sur l'activité unitaire de neurones préoptiques et septaux. D'autres auteurs (YAMADA, 1975 ; YAMADA et NISHIDA, 1978), avec des stéroïdes sulfates, font des observations similaires.

L'équipe de BAULIEU étudie des stéroïdes "acides" de synthèse dont la structure respecte les groupements chimiques favorisant l'interaction avec les récepteurs. Le Professeur BAULIEU nous a fourni d'abord le  $17\beta$ -oestradiol  $7\alpha$ -acide butyrique puis toute une série de stéroïdes "acides" afin d'en étudier les effets éventuels sur l'activité unitaire de neurones préoptiques et septaux. Parallèlement, le  $17\beta$ -oestradiol  $7\alpha$ -acide butyrique est testé sur des modèles expérimentaux sensibles aux oestrogènes conventionnels.

Avec la mise au point de l'éjection par pression de substances à partir de micropipettes multiples, il nous est possible de tester in vivo des substances non ionisables. Nous avons appliqué cette technique afin de déterminer si les stéroïdes naturels ont des effets sur l'activité unitaire de neurones hypothalamiques et du septum. Notre travail comporte une étude des effets du 17  $\beta$ -oestradiol, puis une comparaison d'une part entre ce stéroïde naturel et le 17  $\beta$ -oestradiol 7  $\alpha$ -acide butyrique, et d'autre part entre le 17  $\beta$ -oestradiol et le cortisol.

## II - RESULTATS

### A - ETUDES IONTOPHORETIQUES

#### 1/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol- 7 $\alpha$ -acide butyrique

Le stéroïde conjugué est testé sur 37 neurones des aires préoptique et septale dont 4 antidromiques, 2 orthodromiques.

Quatre activations, 2 inhibitions sont obtenues sur des neurones non influencés (figure 37 A, B). Le plus souvent, les effets surviennent après une faible latence (de l'ordre de 1 à quelques secondes) tandis que le retour au niveau initial est également rapide. Des effets gradués sont obtenus en variant l'intensité des courants d'éjection.

#### 2/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol 7 $\alpha$ -acide butyrique et des désoxycorticosté- rones 7 $\alpha$ et 7 $\beta$ -acétiques

Les trois stéroïdes conjugués sont testés sur 24 neurones dont 1 activé antidromiquement. Des réponses activatrices aux trois stéroïdes ou à un stéroïde sont obtenues sur des neurones non identifiés (figure 38 A, B).

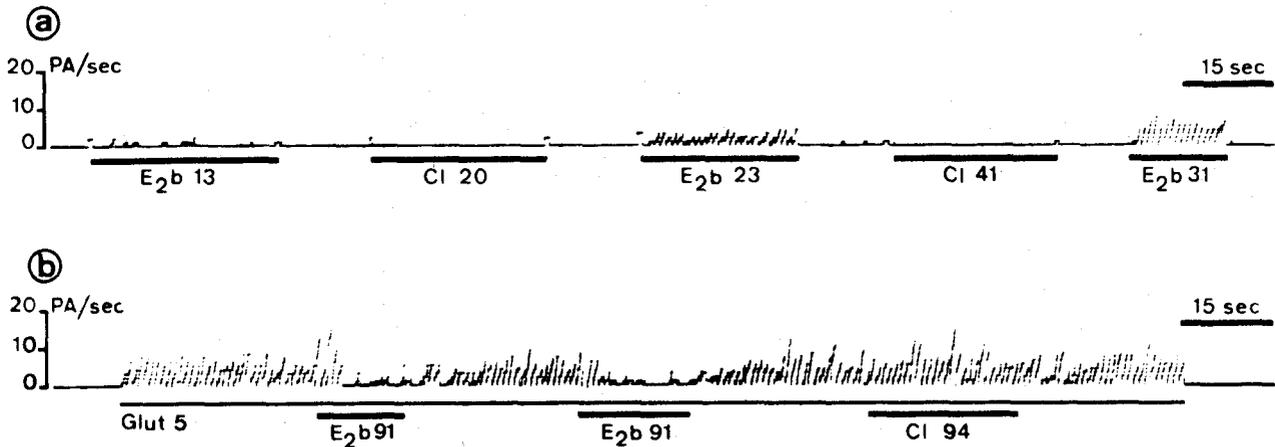


FIGURE 37 : Enregistrements graphiques de la fréquence de décharge (nombre de potentiels par seconde : PA/sec) de deux neurones à faible activité spontanée.

a : le 17  $\beta$ -oestradiol 7  $\alpha$ -acide butyrique (E<sub>2</sub>b) provoque l'augmentation de la fréquence de décharge du neurone. Les ions Cl<sup>-</sup> n'influencent pas l'activité électrique du neurone.

b : L'activité du neurone, induite par l'application du glutamate est inhibée par E<sub>2</sub>b

3/ Effets du 17  $\beta$ -oestradiol 7  $\alpha$ -acide butyrique, de l'androsta-4-ène-3, 17-dione-7  $\alpha$ -acétique et du 20 carboxy-pregna-1,4-diène-3-one.

Les tests sont effectués sur 30 neurones dont 2 antidromiques et 2 orthodromiques. Des activations par 1,2 ou 3 stéroïdes sont obtenues sur certains neurones dont 1 antidromique (figure 38 C, D). Le déroulement des effets obtenus est approximativement similaire par les trois stéroïdes.

Le tableau 7 indique le nombre d'effets obtenus par les différents stéroïdes acides dans les trois séries expérimentales.

FIGURE 38 : Effets de différents stéroïdes acides sur l'activité unitaire de neurones septo-préoptiques.

A : Réponse d'un neurone au 11-désoxycorticostérone 7  $\beta$  acétique (D2) ; l'isomère 7  $\alpha$  (D1) ainsi que le 17  $\beta$  -oestradiol 7  $\alpha$  acide butyrique ( $E_2b$ ) n'ont pas d'effet.

B : Neurone ayant une faible activité spontanée et répondant aux 3 stéroïdes sous la forme d'une excitation. Absence d'effet des ions  $Cl^-$ .

C : Excitation d'un neurone par trois stéroïdes : le 17  $\beta$  -oestradiol 7  $\alpha$  acide butyrique ( $E_2b$ ), le 20-carboxy-pregna-1,4-diène-3-one (P), l'androsta-4-ène-3,17-dione-7  $\alpha$  -acétique (A). Le glutamate (G) est également excitateur.

D : Deux stéroïdes ont un effet excitateur tandis que le 3ème appliqué avec des courants similaires, est sans effet.

Calibrations : 10 potentiels d'action par seconde,  
10 secondes.

(A) D<sub>2</sub> 14 D<sub>2</sub> 34 D<sub>2</sub> 58 D<sub>1</sub> 66 E<sub>2</sub>b 90

(B) D<sub>2</sub> 61 CI 90 E<sub>2</sub>b 48 D<sub>1</sub> 45 D<sub>2</sub> 46 G 24

(C) E<sub>2</sub>b 50 CI 75 E<sub>2</sub>b 27 E<sub>2</sub>b 16

E<sub>2</sub>b 11 P 47

A 55 G 18 CI 75 E<sub>2</sub>b 10

(D) E<sub>2</sub>b 70 CI 79 A 72 P 71 P 82

A 74 E<sub>2</sub>b 75 P 74 E<sub>2</sub>b 46



**TABLEAU 7** : Réponses électriques des neurones de la région préoptico-septale chez le cobaye femelle adulte, aux stéroïdes acides.

Série expérimentales	Total	NA	NO	Nn
$O_{II}$ -7 $\alpha$ -bu ( <sup>+</sup> )	37	4	2	31
Réponses	6	0	0	6°
$O_{II}$ -7 $\alpha$ -bu • doc-7 $\alpha$ -ac : doc-7 $\beta$ -ac :	24	1	0	23
Réponses à ...	5	0	0	5
•	4	0	0	4
$O_{II}$ -7 $\alpha$ -bu • $\Delta_4$ -7 $\alpha$ -ac : P-20-ca :	30	2	2	26
Réponses à ...	3	0	0	3
•	2	0	0	2
•	3	1	0	2
$O_{II}$ -7 $\alpha$ -bu (dans les 3 séries)	91	7	4	80
Réponses	17	1	0	16°

<sup>+</sup> 10  $\mu$ M (au lieu de 1  $\mu$ M ailleurs) ; ° dont 2 inhibitions.

doc-7  $\alpha/\beta$ -ac : 11-désoxycorticostérone-7 $\alpha/\beta$ -acétique ;  $\Delta_4$ -7 $\alpha$ -ac : androsta-4-ene-3,17-dione-7 $\alpha$ -acétique ; P-20-ca : 20-carboxy-pregna-1,4-diène-3-one.

Les réponses à 1, 2 ou 3 stéroïdes sont indiquées avec les symboles ponctués correspondants.

NA : neurones antidromiques ; NO : neurones orthodromiques ; Nn : neurones non influencés.

## B - ETUDES CONCERNANT L'EJECTION PAR PRESSION DE STEROIDES NATURELS

### 1/ Effets du 17 $\beta$ -oestradiol

Les effets du stéroïde naturel sont étudiés sur 280 neurones septo-préoptiques. Trente neuf neurones (13,93 %) ont leur activité augmentée, 11 (3,93 %) leur activité diminuée par le 17  $\beta$ -oestradiol.

#### a) Réponses excitatrices

Les excitations sont enregistrées immédiatement ou dans les 30 secondes qui suivent le début de l'application de la pression. Elles sont variables en durée. La plupart d'entre elles (29/39) sont de courte durée (inférieure à 2 minutes) (figure 39 A). Six neurones sur 39 sont excités durant une période de 4 à 9 minutes (figure 41B). Les 4 neurones restants sont excités plus longtemps, l'effet étant observé durant la période d'enregistrement (jusque 40 minutes). Excepté pour ces 4 neurones, les réponses sont reproduites par des applications successives (figures 41,42 A).

#### b) Réponses inhibitrices

Les inhibitions sont enregistrées soit sur l'activité spontanée soit sur l'activité induite par le glutamate. Cet effet n'est pas accompagné d'une modification de l'amplitude des potentiels d'action. La latence des réponses inhibitrices varie jusque 30 secondes (figure 39 B). Les effets persistent toujours après le temps d'application de l'oestradiol et durent de 1 à 3 minutes (8 neurones sur 11 ; figure 42C) ou plus (4,5 minutes et sans retour à l'activité initiale pour 3 neurones). Une reproductibilité des effets est observée, excepté pour les 3 derniers neurones.

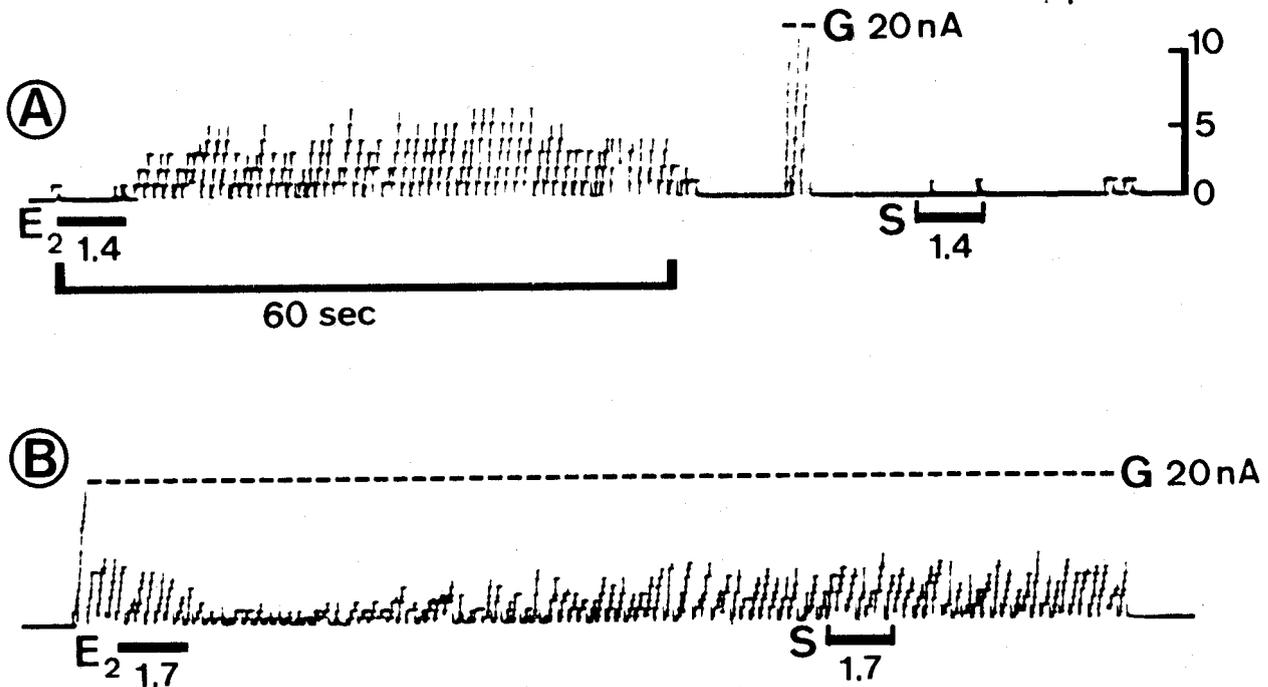
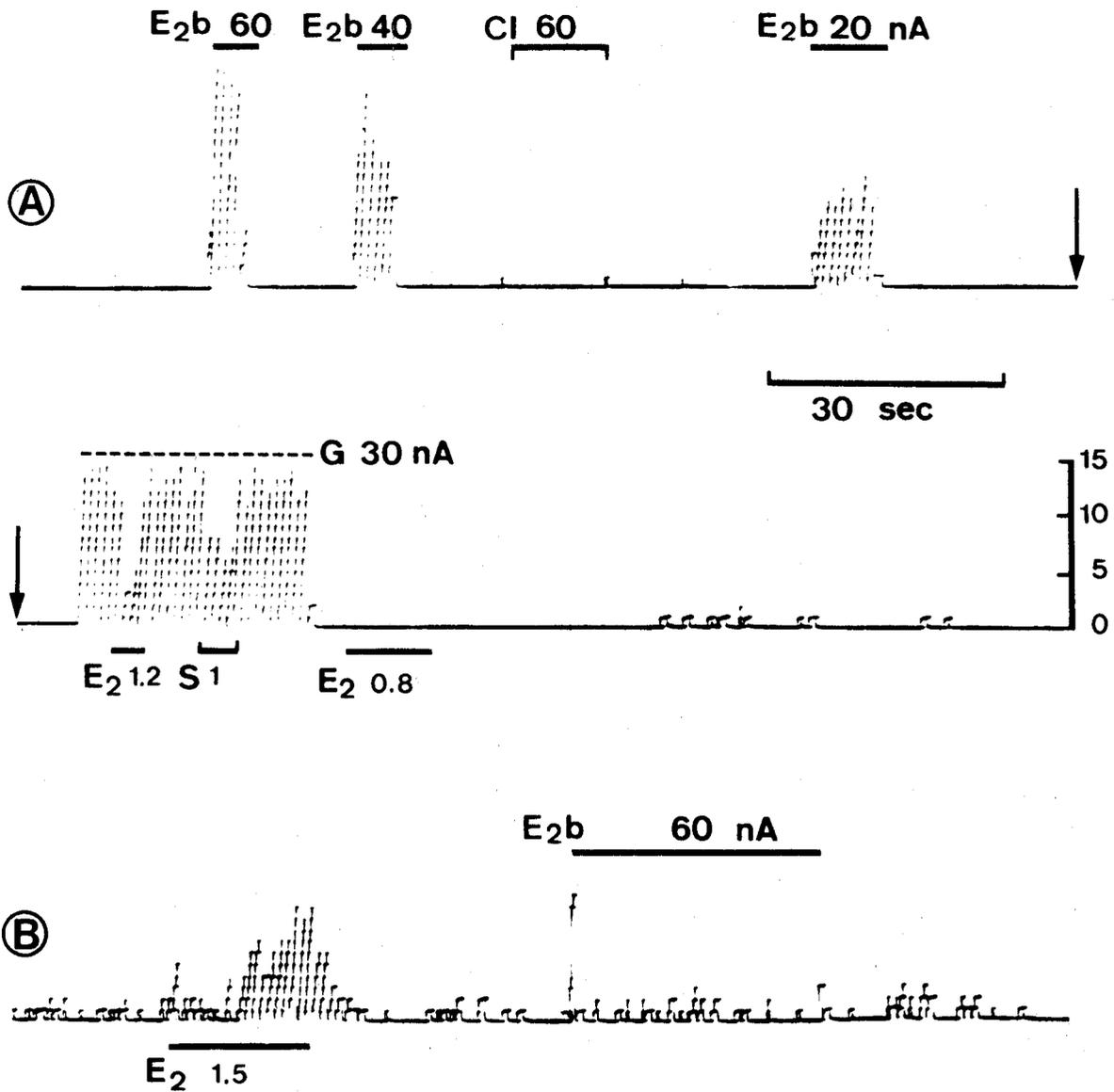


FIGURE 39 : A : Réponse excitatrice par le 17  $\beta$ -oestradiol.

B : inhibition par le stéroïde d'une activité induite par le glutamate.

2/ Comparaison des effets du 17  $\beta$ -oestradiol et du 17  $\beta$ -oestradiol-7 $\alpha$ -acide butyrique

Cent douze neurones sont testés vis-à-vis de ces 2 stéroïdes. Le stéroïde acide est éjecté comme un anion, à l'aide de courants polarisants balancés, variant de 10 à 80 nA. Douze (10,71 %) répondent par une excitation et 3 (2,67 %) par une inhibition à l'application iontophorétique du stéroïde acide. Quand un effet est ainsi obtenu, l'application du stéroïde naturel par pression est inefficace (figure 40 A). Inversement, lorsque le 17  $\beta$ -oestradiol est excitateur, le stéroïde acide se révèle inefficace (figure 40 B).



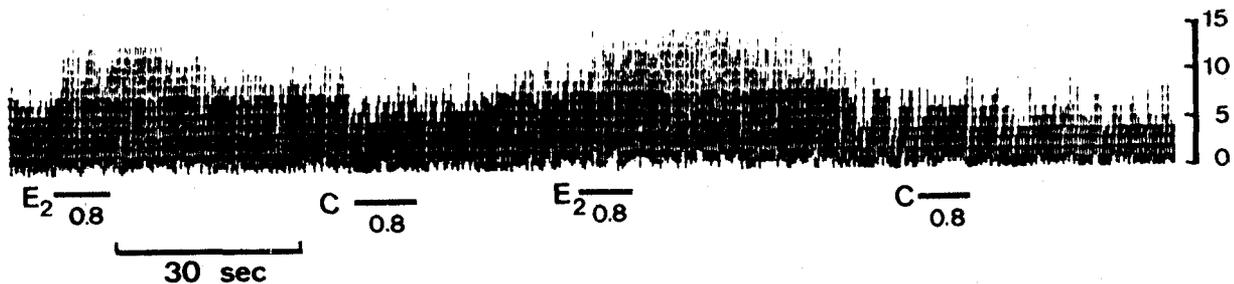
**FIGURE 40** : A : Effets excitateurs du  $17\beta$ -oestradiol-7  $\alpha$ -acide butyrique sur un neurone ayant une faible activité spontanée. L'application par pression du stéroïde naturel provoque un effet solvant sur l'activité induite par le glutamate, mais n'a pas d'effet excitateur.

B : L'excitation résultant d'une éjection par pression du  $17\beta$ -oestradiol, n'est pas obtenue par le stéroïde acide. La barre verticale indique le nombre de potentiels d'action par seconde.

### 3/ Comparaison des effets du 17 $\beta$ -oestradiol et du cortisol

Sur 280 neurones septo-préoptiques, 65 sont étudiés avec des électrodes contenant deux stéroïdes naturels, afin de tester les effets du cortisol sur des neurones sensibles au 17  $\beta$ -oestradiol. Un troisième canal "pression" contient le solvant afin de déterminer si des effets "alcool" sont possibles et de détecter les artéfacts provoqués par l'application extracellulaire d'un volume de liquide.

Quand le cortisol est appliqué aux neurones sensibles au 17  $\beta$ -oestradiol, (c'est le cas de 13 neurones parmi les 65 étudiés), 2 discriminent clairement entre les 2 hormones, en ce sens que le 17  $\beta$ -oestradiol est excitateur, tandis que le cortisol est sans effet (figure 41).



**FIGURE 41** : Réponse excitatrice rapide d'un neurone préoptique au 17  $\beta$ -oestradiol ( $E_2$ ). Le cortisol (C) n'a pas d'effet. Les 2 stéroïdes sont appliqués avec la même pression. Les potentiels d'action sont intégrés sur des périodes de 500 msec.

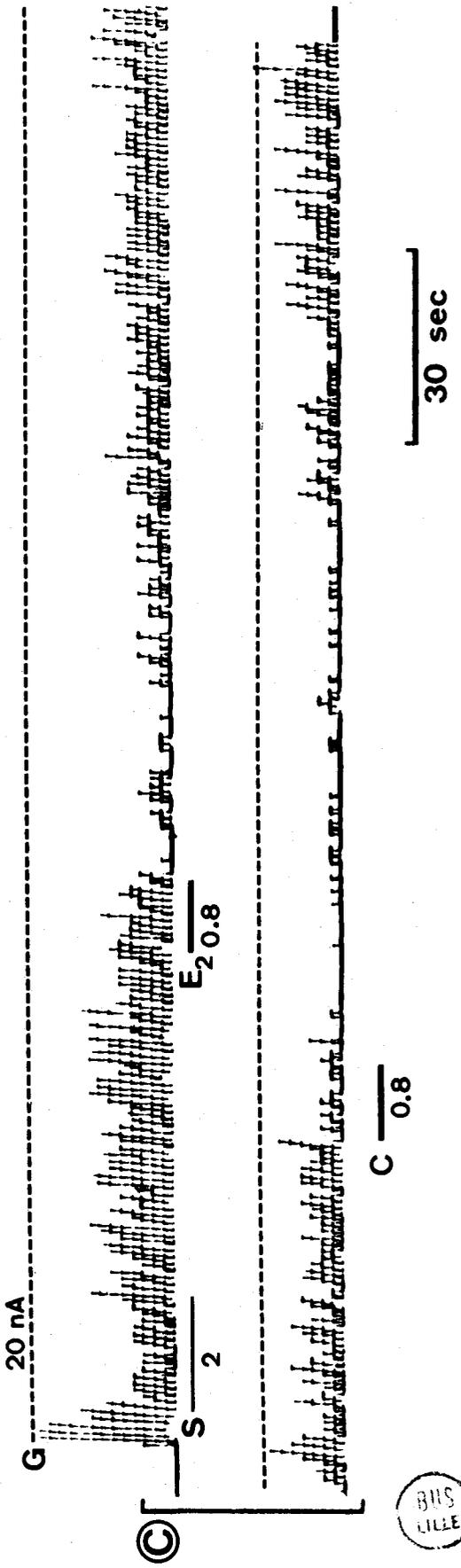
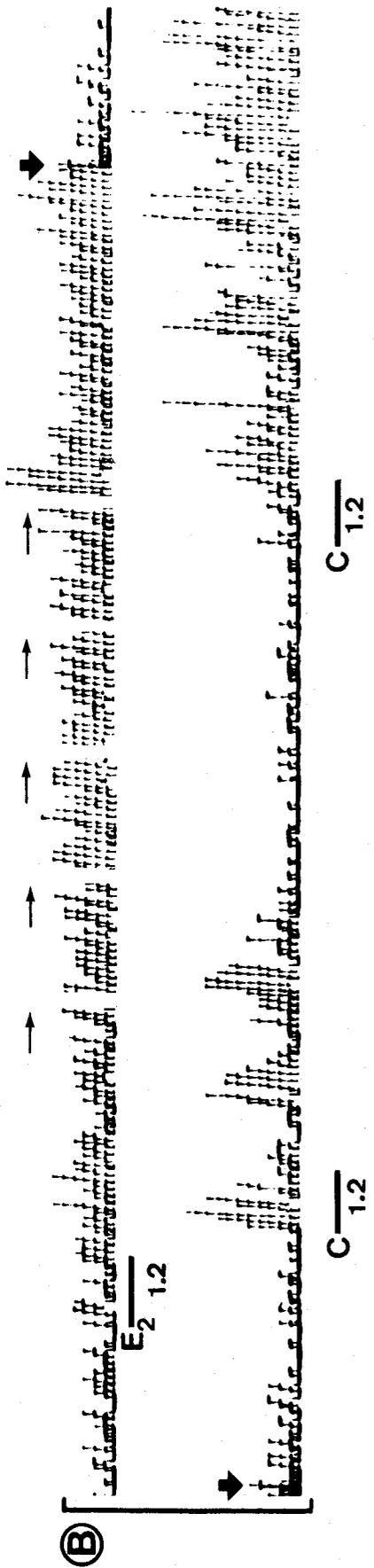
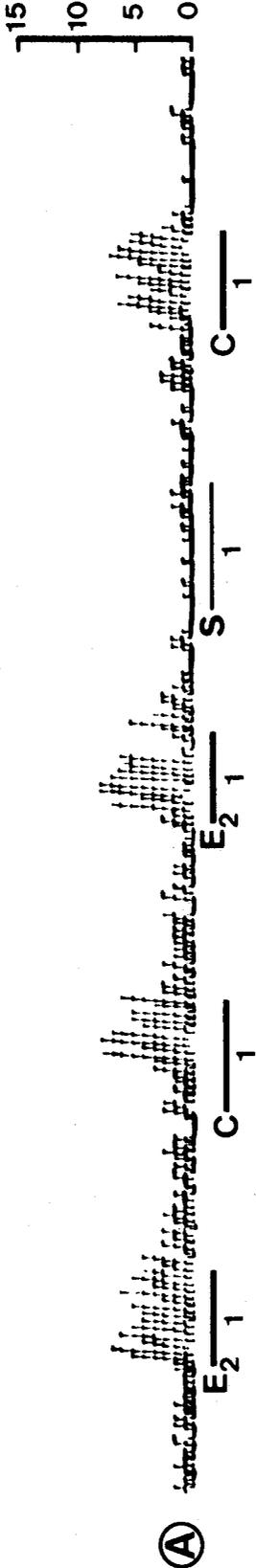
Par contre, 17  $\beta$ -oestradiol et cortisol ont des effets similaires sur les 11 autres neurones. Des réponses excitatrices rapides sont observées sur 6 neurones lorsque les hormones sont alternativement appliquées (figure 42 A). Deux autres neurones montrent des excitations

FIGURE 42 : Réponses à l'oestradiol ( $E_2$ ) de 3 neurones septopréoptiques et comparaison avec des réponses évoquées par le cortisol (C). Les potentiels d'action sont intégrés sur des périodes de 1 seconde.

A : Réponse excitatrice rapide à l'oestradiol et au cortisol. Le solvant (S) n'a aucun effet.

B : Réponse excitatrice de longue durée à l'oestradiol (trace supérieure). Les enregistrements sont séparés par 20 secondes, (flèches horizontales). Après retour à l'activité initiale, (flèches verticales), les 2 applications de cortisol produisent d'abord une brève activation puis une activation forte et soutenue (trace inférieure).

C : Réponse inhibitrice prolongée à l'oestradiol de l'activité induite par le glutamate d'un neurone (trace supérieure). L'application iontophorétique continue de glutamate est indiquée par une ligne en pointillé. L'oestradiol est appliqué avec une pression plus petite que celle produisant un effet solvant minimal. Après le retour à l'activité initiale, l'application de cortisol déclenche similairement une réponse inhibitrice (trace inférieure).



BILS  
LILLE

prolongées en réponse à l'application des 2 stéroïdes (figure 42 B). Un neurone spontanément actif et 2 neurones dont l'activité est évoquée par le glutamate, initialement inhibés par le  $17\beta$ -oestradiol, montrent une réduction similaire de leur activité unitaire, à la suite de l'application par pression de cortisol (figure 42 C).

#### 4/ Localisation des neurones sensibles aux stéroïdes

L'examen histologique révèle que les neurones sensibles à l'oestradiol sont largement dispersés dans toute la zone explorée. Aucune corrélation n'est possible entre la sensibilité des neurones aux stéroïdes et leur position dans l'aire septo-préoptique, sauf pour les 2 neurones répondant seulement à l'oestradiol, qui sont localisés dans la partie suprachiasmatische du noyau préoptique médian (figure 43).

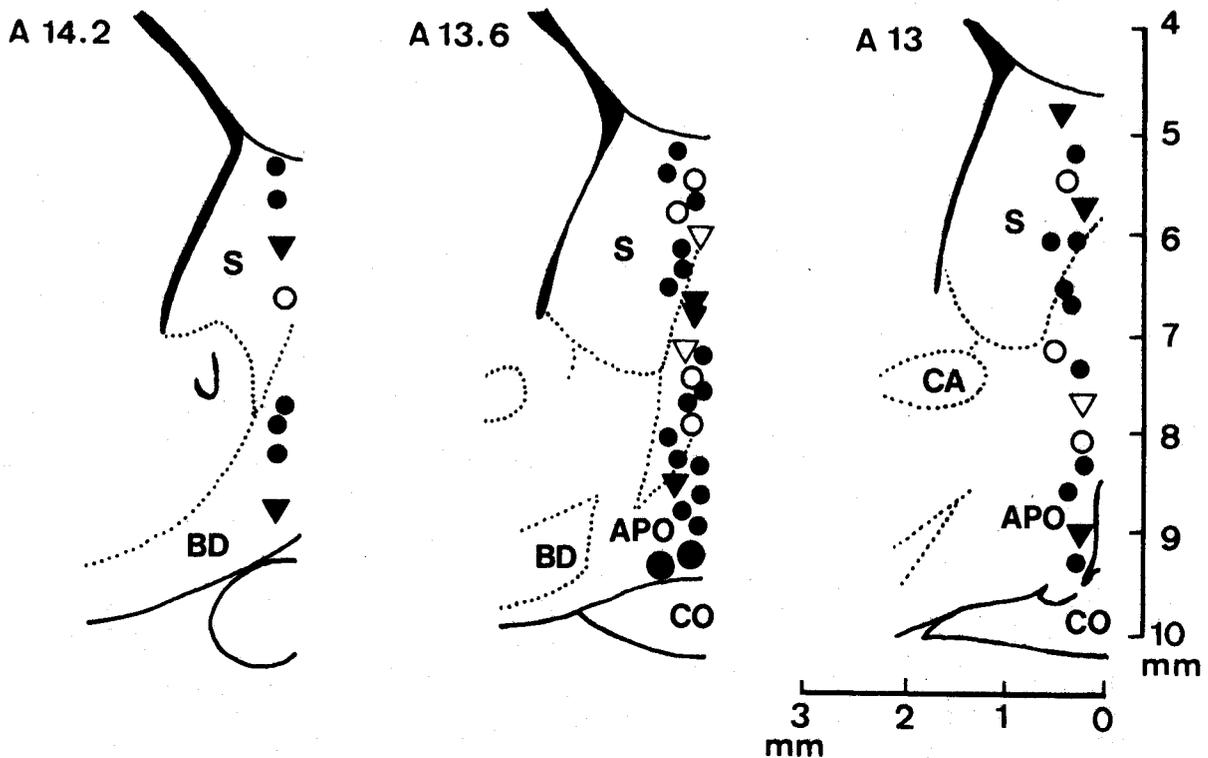


FIGURE 43 : Localisation sur 3 coupes transversales (d'après l'atlas stéréotaxique de POULAIN) des neurones sensibles au  $17\beta$ -oestradiol. Les cercles indiquent les excitations (petits cercles pleins : neurones testés avec le  $17\beta$  oestradiol ; grands cercles pleins : neurones excités par le  $17\beta$ -oestradiol, mais non par le cortisol ; cercles vides : neurones excités par les 2 stéroïdes). Les triangles représentent les inhibitions (triangles pleins : neurones testés avec le  $17\beta$ -oestradiol seul ; triangles vides : neurones inhibés par les 2 stéroïdes). Abréviations : APO : aire préoptique ; BD : bande diagonale de Broca ; CA : commissure antérieure ; CO : chiasma optique ; S : septum.

### III - DISCUSSION

#### A - EFFETS DE STEROIDES "ACIDES", APPLIQUES PAR IONTOPHORESE, SUR DES NEURONES SEPTAUX ET PREOPTIQUES

Nos résultats obtenus avec l'oestradiol 7  $\alpha$ -acide butyrique sur des neurones septaux et préoptiques (CARETTE et coll., 1979) confirment ceux précédemment obtenus avec d'autres esters de stéroïdes (KELLY et coll., 1976, 1977 a et b, YAMADA, 1975 ; YAMADA et NISHIDA, 1978). Les stéroïdes "acides" sont capables de modifier l'activité électrique de neurones. Les effets surviennent après une courte latence (de 1 à 20 secondes selon les auteurs), se terminent rapidement après la fin de l'application des courants iontophorétiques (de 1 à 50 secondes) selon les auteurs. La direction des effets par contre, n'est pas la même selon les études. KELLY et coll. (1976, 1977 a et b) rapportent que les effets de l'oestradiol-hémisuccinate sur des neurones de l'aire préoptico-septale sont différents selon que les neurones sont activés antidromiquement ou non par stimulation de l'éminence médiane, et en fonction du cycle oestral. Sur 18 neurones endocrines testés avec le stéroïde acide, 4 sont inhibés durant le dioestrus 2 ou le prooestrus tandis que les autres ne répondent pas. En ce qui concerne les neurones non identifiés, une inhibition est surtout obtenue durant le prooestrus, l'oestrus et le dioestrus 1, une activation étant observée en dioestrus 2. YAMADA et NISHIDA (1978) observent uniquement des réponses inhibitrices à l'application d'oestrogènes sulfates dans l'aire préoptico-septale de rattes ovariectomisées 3 à 5 semaines avant l'expérimentation. Chez le cobaye, nous observons essentiellement des activations sur des neurones non identifiés et sur 1 neurone endocrine, à l'exception de 2 inhibitions. La comparaison entre les résultats obtenus à partir de ces diverses études iontophorétiques s'avère difficile puisque à la fois les espèces, les stéroïdes "acides" et les conditions hormonales utilisées sont différentes. Il convient néanmoins de faire plusieurs remarques. La stabilité chimique de l'oestradiol-7  $\alpha$ -acide butyrique permet d'exclure son hydrolyse, ce qui signifie que c'est le composé intact, éjecté de la micropipette, qui provoque les effets observés. Par contre, dans le cas de l'oestradiol-hémisuccinate, en raison de la présence d'estérases dans l'espace extra-cellulaire, il ne peut être déterminé si le stéroïde libre et/ou l'ester du stéroïde sont responsables des changements d'activité électrique

(KELLY et coll. 1977 a). KELLY et coll. (1978) démontrent l'absence de réponse de neurones de l'aire préoptico-septale à l'oestradiol-hémisuccinate chez des rattes ovariectomisées, suggérant que les stéroïdes ovariens sont nécessaires pour le maintien de la sensibilité des neurones au stéroïde acide. Par contre, YAMADA et NISHIDA (1978) observent des effets d'oestrogènes sulfates chez des rattes ovariectomisées depuis plusieurs semaines.

B - EFFETS DE STEROIDES CONVENTIONNELS SUR DES NEURONES SEPTAUX, PREOPTIQUES, HYPOTHALAMIQUES ET DU BULBE OLFACTIF

1/ Etude in vitro : stéroïdes dans le milieu de culture

KELLY et coll. (1980) réalisent des enregistrements intracellulaires de neurones parvocellulaires dans des coupes d'hypothalamus de cobayes femelles afin d'élucider les changements d'excitabilité membranaire provoqués par les stéroïdes. En appliquant le 17  $\beta$ -oestradiol dans le milieu de culture, à des neurones des noyaux ventro-médian et arqué, KELLY et coll. (1980) observent uniquement des hyperpolarisations accompagnées d'une diminution de la résistance membranaire.

2/ Etude in vivo : application des stéroïdes par pression

Nous décrivons pour la première fois, les effets du 17  $\beta$ -oestradiol libre, appliqué par pression, sur l'activité de neurones septo-préoptiques chez le cobaye femelle in vivo (POULAIN et CARETTE, 1981 a, et b). Les effets sont différents, à la fois en direction et en durée. La majorité des neurones sensibles au 17  $\beta$ -oestradiol montre une réponse excitatrice rapide. En plus de ces effets rapides, des activations de plus longue durée sont observées. Enfin, des inhibitions avec latence plus ou moins importante et dépassant le temps d'application du stéroïde sont obtenues.

### 3/ Etude in vivo : application des stéroïdes par un flux d'air

MACLEOD et coll. (1979) appliquent différents stéroïdes sur des neurones du bulbe olfactif dont ils enregistrent l'activité unitaire extracellulaire. Ils observent essentiellement un effet excitateur de la testostérone et d'une phéromone stéroïdale.

#### C - COMPARAISON DES EFFETS DES STEROIDES "ACIDES" ET CONVENTIONNELS SUR UN MEME NEURONE

KELLY et coll. (1980) comparent les effets du 17  $\beta$ -oestradiol et du 17  $\beta$ -oestradiol-hémisuccinate sur quelques neurones et n'observent aucune différence entre les deux stéroïdes dans le type et le décours des réponses. Il apparaît ainsi possible que l'ester soit hydrolysé en stéroïde libre.

Le 17  $\beta$ -oestradiol et l'oestradiol-7  $\alpha$ -acide butyrique sont testés sur des neurones septo-préoptiques (POULAIN et CARETTE, 1981 a). Les neurones sensibles à l'un des stéroïdes ne répondent pas à l'autre et inversement. Une telle observation peut résulter du fait de l'oestradiol-7  $\alpha$ -acide butyrique a une stabilité chimique qui exclut son hydrolyse. Les effets de ce stéroïde non conventionnel peuvent donc être différents de ceux d'un stéroïde naturel.

#### D - SPECIFICITE DES REPONSES OBSERVEES

Dans notre étude iontophorétique (CARETTE et coll., 1979), quatre stéroïdes acides sont testés en plus de l'oestradiol 7  $\alpha$ -acide butyrique. Plus de 80 % des neurones testés ne répondent pas aux stéroïdes appliqués. Certains neurones sensibles répondent à un seul stéroïde, d'autres aux 3 stéroïdes. L'isomérisie 7 $\alpha$ /7 $\beta$  des dérivés désoxycorticostérone-7-acétiques est reconnue par certains neurones. Ces résultats révèlent donc une spécificité au niveau neuronal et une spécificité des stéroïdes pour certains neurones. Dans l'étude portant sur les effets des stéroïdes naturels, une

situation identique se retrouve : seulement un certain pourcentage de neurones est sensible aux stéroïdes, certains neurones répondent à un seul stéroïde tandis que d'autres répondent aux 2 stéroïdes appliqués.

Une stéréospécificité pour les effets électrophysiologiques rapides du 17  $\beta$ -oestradiol-hémisuccinate est prouvée sur des neurones de l'aire septo-préoptique puisque le 17  $\alpha$ -oestradiol-hémisuccinate n'est pas actif (KELLY et coll. 1977 a). De même, au niveau des neurones de l'hypothalamus médio-basal, in vitro (KELLY et coll., 1980), l'effet du 17  $\beta$ -oestradiol apparaît spécifique puisque l'oestrone est sans effet.

Au regard de ces résultats, l'absence de stéréospécificité de certains neurones sensibles donc à plusieurs stéroïdes apparaît intrigante. Il convient de noter qu'il existe dans la littérature des exemples analogues. KELLY et coll. (1977 b) montrent le cas d'un neurone dont l'activité unitaire induite par l'acétylcholine est inhibée par le 17  $\beta$ -oestradiol-hémisuccinate et le cortisol-hémisuccinate. De même, un oestrogène conjugué et la bétaméthasone disodium phosphate ont un effet inhibiteur similaire sur un neurone de l'hypothalamus médio-basal de rat mâle (YAMADA et UESHIMA, 1978). Des stéroïdes naturels : la testostérone et une phéromone stéroïdale, appliquées par un flux d'air directement sur des neurones du bulbe olfactif, ont parfois un effet similaire sur l'activité unitaire du même neurone (MAC LEOD et coll. 1979). Ainsi se fait la distinction de trois types de neurones : neurones non sensibles, neurones non discriminateurs, et neurones discriminateurs, c'est-à-dire sensibles à un stéroïde mais non à l'autre. Dans le cas des neurones non discriminateurs, il peut être supposé que différents stéroïdes provoquent un effet sur un même neurone, en agissant à travers des sites de liaison respectifs, ou à travers un même site qui avait un large spectre de spécificité stéréochimique. La seconde supposition apparaît plus vraisemblable puisqu'à chaque fois, le 17  $\beta$ -oestradiol et le cortisol ont le même effet. Une diversité stéréochimique des stéroïdes actifs sur la membrane d'ovocytes de *Xenopus laevis* est également rapportée (BAULIEU et coll. 1978).

## E - EFFETS MEMBRANAIRES DES STEROIDES

Il est admis que l'action des stéroïdes au niveau cellulaire survient à travers une activation du génome de la cellule cible. Dans un premier temps, il y a liaison du stéroïde à des sites récepteurs intracellulaires. Dans un deuxième temps, il y a translocation du complexe hormone-récepteur vers le noyau de la cellule (Mc EWEN et coll., 1978). Les techniques radioautographiques confirment la localisation intracytoplasmique des récepteurs des stéroïdes avec une concentration des produits radioactifs dans la zone nucléaire des cellules. Nos résultats, obtenus avec les stéroïdes naturels montrent que les neurones sensibles au 17  $\beta$ -oestradiol ne sont pas uniquement localisés dans l'aire préoptique médiane contenant des récepteurs intracellulaires pour ce stéroïde (WAREMBOURG, 1977) mais sont dispersés dans l'aire septo-préoptique. Les effets électriques déclenchés par le 17  $\beta$ -oestradiol ne sont vraisemblablement pas en relation avec les effets hormonaux déclenchés au niveau intracellulaire et peuvent représenter une voie supplémentaire d'action au niveau du neurone pour le stéroïde.

Les effets génomiques des stéroïdes impliquent une latence de l'effet qui se mesure en minutes ou en heures et une durée de l'effet qui dépasse la disparition du stéroïde du tissu. Les effets électrophysiologiques des stéroïdes, obtenus aussi bien par iontophorèse que par éjection par pression, présentent une latence qui s'exprime en secondes et une durée de l'effet qui ne dépasse pas ou peu la fin de l'application du stéroïde. Les potentiels d'action des neurones dont la fréquence est modifiée par les stéroïdes sont d'origine membranaire. L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la membrane plasmique des neurones peut être le site d'action des stéroïdes dans leurs effets électrophysiologiques.

Cette hypothèse est consistante avec un certain nombre de résultats. KELLY et coll. (1980) suggèrent que le site d'action du 17  $\beta$ -oestradiol est la membrane nerveuse puisque ce stéroïde polarise certains neurones. Les réponses obtenues par ARNAULD et coll. (1981) sur des neurones du noyau caudé, à la suite d'injections intra-musculaires de benzoate d'oestradiol, apparaissent s'effectuer à travers la membrane cellulaire en raison de leurs courtes latences et en raison du fait que la région étudiée présente un taux faible de récepteurs intracellulaires aux oestrogènes, déterminé par des études

biochimiques et radioautographiques. L'oestradiol agirait directement sur les récepteurs de la dopamine des neurones du noyau caudé. Des hypothèses similaires quant à l'action membranaire des stéroïdes, sont émises par KENDRICK et DREWETT (1979), et TEYLER et coll. (1980) dans leurs études respectives sur des neurones de l'amygdale et des cellules pyramidales de l'hippocampe.

Des sites de liaison sur des membranes plasmiques, spécifiques pour le  $17\beta$ -oestradiol existent également sur des cellules utérines (PIETRAS et SZEGO, 1977, 1979 a), sur des hépatocytes (PIETRAS et SZEGO, 1979 b), sur des cellules hypophysaires sécrétant la prolactine (DUFY et coll., 1979). KOCH et coll. (1978) indiquent que des corticostéroïdes se lient également aux membranes plasmiques de cellules hypophysaires, tandis que l'aldostérone interagit avec celles de cellules rénales (OZEGOVIC et coll., 1977). Enfin, la progestérone agit au niveau de la surface cellulaire pour réinitier la maturation méiotique dans des ovocytes de *Xenopus laevis* (BAULIEU et coll., 1978).

Ainsi, la membrane plasmique de différents types cellulaires peut constituer le site d'action d'hormones stéroïdes à travers lequel s'expriment leurs effets (BAULIEU, 1978).

#### F - IMPLICATION FONCTIONNELLE POSSIBLE DES EFFETS ELECTRIQUES DES STEROIDES DANS CERTAINS EVENEMENTS NEUROENDOCRINIENS

##### 1/ La décharge pulsatile de LH (références dans GALLO, 1980)

L'hormone lutéotrope est libérée à partir de l'adénohypophyse, d'une façon pulsatile. Il est très vraisemblable que cet événement soit dû à une libération pulsatile de LHRH. Différents neurotransmetteurs ainsi que les stéroïdes ovariens influencent la libération épisodique de LH. Les oestrogènes inhibent cette libération chez un certain nombre d'espèces, l'effet apparaissant quelques minutes après l'infusion intraveineuse du stéroïde. Cette courte latence de l'effet exclut toute action des stéroïdes à travers le génome, mais permet de penser à une action au niveau membranaire. Cet effet inhibiteur par les oestrogènes apparaît impliquer deux niveaux d'action : l'hypophyse et le système nerveux central. La question se pose de la relation

possible entre nos résultats électrophysiologiques et les mécanismes impliqués dans l'effet inhibiteur des oestrogènes sur la décharge pulsatile de LH. L'un des mécanismes suggérés est que l'hormone, en inhibant l'activité électrique nerveuse, interfère avec la libération de LHRH. Etant donné que nous avons essentiellement observé des excitations par le 17  $\beta$ -oestradiol, il est possible que les effets déclenchés par le stéroïde, affectent un interneurone inhibiteur en contact synaptique avec un neurone impliqué dans la synthèse et la libération de LHRH.

## 2/ La rétroaction négative des oestrogènes dans le contrôle de la libération de LH

Chez les animaux présentant une ovulation spontanée, comme le cobaye, les taux plasmatiques de LH sont relativement faibles avant de s'élever brusquement pour induire l'ovulation et il existe une corrélation entre la sécrétion de LH et celle des stéroïdes gonadiques (CROIX et FRANCHIMONT, 1975). Une double rétroaction des oestrogènes s'exerce sur la sécrétion de LH : elle est négative et provoque des taux bas de LH avant de devenir positive et de conduire à la décharge préovulatoire de LH. La rétroaction positive intervient au niveau hypothalamique et au niveau hypophysaire et s'exercerait avec une latence de plusieurs heures. La stimulation à long terme exercée par l'oestradiol sur la sécrétion de LH peut être bloquée par des inhibiteurs de la synthèse protéique (JACKSON, 1973). La rétroaction négative se situe uniquement au niveau hypothalamique, s'exerce rapidement, c'est-à-dire dans les minutes qui suivent l'injection d'oestradiol. DUFY et coll. (1978) trouvent que l'actinomycine D, inhibiteur de la synthèse protéique, n'empêche pas l'action inhibitrice du 17  $\beta$ -oestradiol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol n'est donc pas en relation avec un évènement nucléaire au niveau des neurones mais fait très probablement intervenir un phénomène membranaire. Elle peut s'exercer sur la libération hormonale en modifiant la fréquence des potentiels d'action. Nos résultats électrophysiologiques sont donc en accord avec cette conception du mécanisme de rétroaction négative exercée par le 17  $\beta$ -oestradiol sur la sécrétion tonique de LH.

G - LE 17  $\beta$ -OESTRADIOL EN TANT QUE NEUROMODULATEUR

Le 17  $\beta$ -oestradiol et les stéroïdes en général, peuvent agir sur la fonction du neurone à différents niveaux : sur son métabolisme, sur les récepteurs membranaires aux différents neurotransmetteurs (leur synthèse, leur dégradation), sur la libération des produits élaborés par le neurone, sur l'interaction entre le neurotransmetteur et son récepteur. Tous ces effets peuvent avoir des conséquences, à plus ou moins long terme, sur des évènements pré- ou post-synaptiques et donc sur l'activité électrique des neurones. De tous ces effets, seulement certains sont compatibles avec les effets électrophysiologiques rapides, provoqués par les stéroïdes tels que nous les observons. Ils nécessitent en outre que la neuromodulation s'exerce au niveau membranaire. Ces effets peuvent concerner la libération de substances par les neurones, et l'interaction entre un neurotransmetteur et son récepteur. Il est montré que les corticostéroïdes inhibent la libération de CRF (JONES et coll., 1977), au cours de la rétroaction rapide. Le 17  $\beta$ -oestradiol, par ailleurs, inhibe la liaison de la noradrénaline et de la dopamine à des membranes synaptosomales (INABA et KAMATA, 1979). Les stéroïdes exercent une neuromodulation qui présente deux aspects : l'une met en jeu des récepteurs intracellulaires et une synthèse protéique, a une action durable, tandis que l'autre s'exerce au niveau membranaire, a une action rapide. A l'heure actuelle, aucun récepteur membranaire aux stéroïdes n'est identifié.

DISCUSSION GENERALE

-----

## I - CONTROLE SYNAPTIQUE DES NEURONES ENDOCRINES PARVOCELLULAIRES

Le contrôle hypothalamique des sécrétions adénohypophysaires est effectué essentiellement par les neurones endocrines parvocellulaires qui agissent comme transducteurs puisqu'ils convertissent une information nerveuse en une information endocrine. Ce sont ces neurones que nous avons choisis comme sites d'action dans l'étude du rôle de différentes substances dans la régulation des sécrétions adénohypophysaires. Nos hypothèses de travail s'appuient sur trois types d'études : celles concernant l'innervation de l'hypothalamus, du septum et des bandelettes diagonales de BROCA, celles relatives à la localisation des corps cellulaires de neurones endocrines par des méthodes immunocytochimiques, et celles attribuant à différentes substances un rôle dans le contrôle des fonctions adénohypophysaires (études neuropharmacologiques). Ces dernières, malgré l'information qu'elles apportent, présentent un certain nombre de limites :

- les substances testées administrées de façon systématique, peuvent avoir des actions aussi bien centrales que périphériques,
- même les substances injectées directement dans le cerveau peuvent avoir plus d'un effet et agir à plusieurs niveaux. Enfin, lorsqu'on applique une substance dans le noyau concerné directement par le contrôle d'une fonction, un délai important entre le moment de l'injection et le début de l'effet peut signifier une action indirecte de la substance par l'intermédiaire d'une autre substance.

Dans ce contexte, les études électrophysiologiques combinant les techniques d'identification antidromique et d'application de substances par microiontophorèse ou par pression présentent plusieurs avantages :

- elles permettent une identification fonctionnelle en montrant que ces neurones se projettent dans l'éminence médiane. Les neurones ainsi identifiés sont considérés comme des neurones endocrines,
- elles permettent une localisation anatomique des corps cellulaires des neurones étudiés,
- elles mesurent un paramètre fonctionnel important des neurones : leur activité électrique,
- elles permettent l'application directe des substances sur les neurones étudiés, il est ainsi possible d'établir une relation directe de cause à effet.

Si l'application locale de substances sur les neurones ne permet pas en elle-même de déterminer si le site d'action est bien le neurone dont on enregistre l'activité unitaire, certaines conditions expérimentales (glutamate, magnésium) précisent le site d'action des substances testées (sites pré ou postsynaptiques).

Nos études sur différentes substances (noradrénaline, histamine, enképhalines) confirment l'existence d'une innervation de l'hypothalamus et de la région rostrale de l'hypothalamus par ces amines et les peptides morphinomimétiques et précisent qu'une articulation entre terminaisons aminergiques et neurones peptidergiques d'une part, terminaisons peptidergiques et neurones peptidergiques d'autre part, est possible. Dans certains cas, nos études précisent que les synapses sont de type axo-somatique (enképhalines).

La limite actuelle des études électrophysiologiques sur des neurones endocrines parvocellulaires est leur identification fonctionnelle seulement partielle. A l'inverse des neurones endocrines magnocellulaires, identifiables par leur projection vers la neurohypophyse, et dont la nature du produit élaboré (neurones à ocytocine, neurones à vasopressine) peut être déterminée par l'allure de leur activité électrique (POULAIN et coll., 1977), les neurones endocrines parvocellulaires ne peuvent être identifiés sur la base de leur activité électrique. La solution serait d'effectuer une détermination de la nature de la substance élaborée par le neurone étudié, a posteriori par un contrôle immunocytochimique. Actuellement, pour l'interprétation de nos résultats, nous établissons une corrélation entre la localisation des neurones étudiés d'une façon électrophysiologique et celle des corps cellulaires des neurones par immunocytochimie.

## II - ROLE DES POTENTIELS D'ACTION DANS L'ACTIVITE ENDOCRINE D'UN NEURONE

Les principaux aspects du fonctionnement du neurone endocrine, c'est-à-dire la synthèse, le transport axonique et la libération de la neurohormone sont-ils contrôlés par l'activité électrique du neurone ? De nombreuses études ont été réalisées (surtout sur le système hypothalamo-neurohypophysaire) afin de répondre à ces questions.

#### A - SYNTHESE DE LA NEUROHORMONE

Il n'y a aucune preuve directe que les potentiels d'action contrôlent la vitesse de synthèse protéique. Cependant, lors de la genèse et de la propagation des potentiels d'action, se produisent des mouvements ioniques intéressant le  $\text{Na}^+$ , le  $\text{K}^+$ , le  $\text{Ca}^{++}$  et il n'est pas exclu que ces processus interviennent dans les mécanismes de synthèse protéique.

#### B - TRANSPORT AXONIQUE DE LA NEUROHORMONE

Une relation entre l'activité électrique et le transport axonique de la neurohormone n'est pas établie. Il semble que la quantité de substances transportées le long de l'axone puisse dépendre de l'activité électrique mais la vitesse de transport n'est pas altérée (NORSTROM et coll., 1971).

#### C - LIBERATION DE LA NEUROHORMONE

Un mécanisme de couplage excitation-sécrétion est décrit pour la libération des neurohormones à partir des terminaisons axoniques. Une dépolarisation de ces terminaisons, qui est produite physiologiquement par les potentiels d'action conduits le long des axones, provoque une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions  $\text{Ca}^{++}$ , ce qui a pour résultat une entrée de  $\text{Ca}^{++}$  dans la terminaison axonique. Ces ions  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaires évoquent la libération par exocytose, des neurohormones.

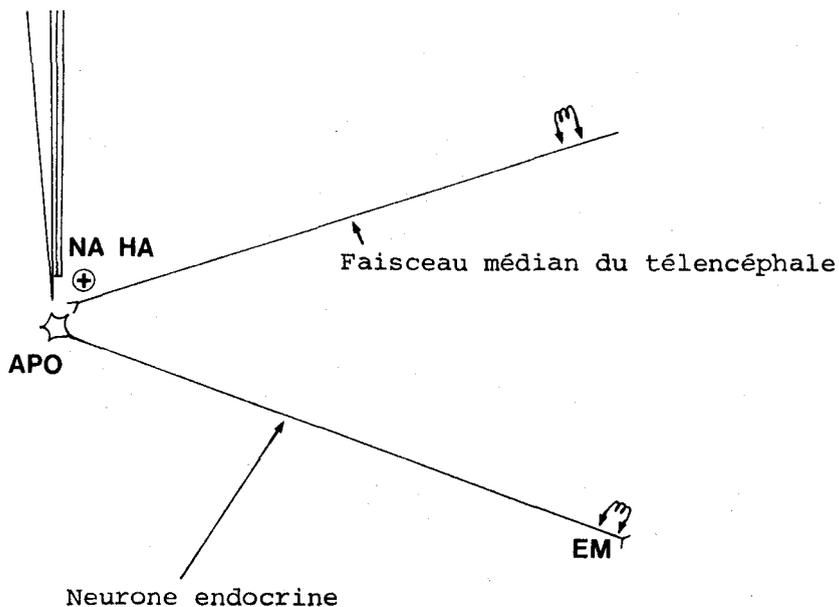
Des expériences in vitro et in vivo de stimulations électriques de neurohypophyses démontrent une libération de neurohormones en réponse à cette stimulation (MIKITEN et DOUGLAS, 1965 ; DREIFUSS et coll., 1971 ; HARRIS et coll., 1969). Une corrélation est ensuite établie entre les modifications d'activité unitaire en réponse à des stimuli connus pour provoquer une libération neurohormonale et la libération effective, mesurée simultanément, de ces neurohormones (DYBALL, 1971 ; WAKERLEY et LINCOLN, 1973 ; LINCOLN et WAKERLEY, 1974, 1975). Ces études permettent donc de supposer que les potentiels d'action des neurones endocrines magnocellulaires contrôlent directement la libération du produit de sécrétion du neurone.

Des stimulations électriques de la partie médiobasale de l'hypothalamus provoquent la libération de la lulibérine (DYER et coll., 1980). La présence d'ions  $Ca^{++}$  est nécessaire dans le milieu d'incubation pour cette libération. Par contre, une relation directe entre l'activité électrique des neurones à lulibérine et la libération de l'hormone à partir des terminaisons axoniques n'est pas établie puisque des enregistrements électrophysiologiques à partir des neurones à lulibérine identifiés ne sont pas possibles. A partir des données acquises essentiellement sur les neurones endocrines magnocellulaires, nous supposons que l'activité électrique des neurones endocrines en général est clairement en relation avec les processus de libération du produit de sécrétion. C'est sur cette base que nos discussions sont réalisées pour corréliser nos observations avec les effets des différents neurorégulateurs sur les fonctions adénohypophysaires puisque les changements dans les processus de synthèse protéique et de transport axonique en relation avec l'activité électrique des neurones endocrines ne sont pas nettement établis.

### III - CONNEXIONS NERVEUSES ENTRE LE FAISCEAU MEDIAN DU TELECEPHALE, L'AIRE PREOPTIQUE ET L'HYPOTHALAMUS BASAL

Des expériences montrent que le faisceau médian du télencéphale peut jouer un rôle modulateur dans le contrôle de certaines sécrétions adénohypophysaires (MARTINOVIC et McCANN, 1977 ; TINDAL et KNAGGS, 1977). PERKINS et WHITEHEAD (1978) étudient les réponses de neurones des régions préoptique et hypothalamique antérieure à la stimulation du faisceau médian du télencéphale. Les afférences de ce faisceau à ces neurones peuvent être soit excitatrices, soit inhibitrices. L'application iontophorétique de la dopamine ou de la noradrénaline supprime l'activité des neurones activés et inhibés orthodromiquement. Dans une autre étude, les mêmes auteurs, en 1979, montrent que 22 % des neurones de l'aire préoptique, hypothalamique antérieure, activés antidromiquement par stimulation de l'hypothalamus basal reçoivent une entrée excitatrice à partir du faisceau médian du télencéphale. Ils notent une absence complète d'entrée inhibitrice à partir du faisceau sur ces neurones activés antidromiquement. Sur la base de leurs précédents résultats (PERKINS et WHITEHEAD, 1978), ils indiquent que la noradrénaline n'est probablement pas le neurotransmetteur impliqué dans cette entrée excitatrice.

Nos résultats ainsi que ceux de MOSS et coll. (1978) montrent que la noradrénaline peut activer des neurones se projetant vers l'éminence médiane, neurones qui peuvent correspondre à ceux activés antidromiquement par stimulation de l'hypothalamus basal (noyaux arqué, ventro-médian). Une autre amine, l'histamine, active les neurones endocrines, comme le montrent nos études iontophorétiques et peut être le neurotransmetteur impliqué dans cette entrée excitatrice. Des fibres histaminergiques sont présentes dans le faisceau médian du télencéphale et innervent les aires préoptiques et hypothalamiques antérieures (GARBARG et coll., 1976 ; HAAS et coll., 1978). De plus, HAAS et WOLF (1977) montrent que des neurones hypothalamiques, activés orthodromiquement par stimulation du faisceau médian du télencéphale, ont leur activité unitaire augmentée par l'histamine appliquée iontophorétiquement. Pour donner une réponse définitive au problème de la nature des afférences excitatrices du faisceau médian du télencéphale à des neurones endocrines, il serait nécessaire de stimuler à la fois l'éminence médiane et le faisceau médian du télencéphale pour identifier les neurones endocrines recevant des afférences excitatrices du faisceau, puis d'appliquer, par iontophorèse, noradrénaline et histamine pour en déterminer l'effet sur l'activité unitaire (figure 44).

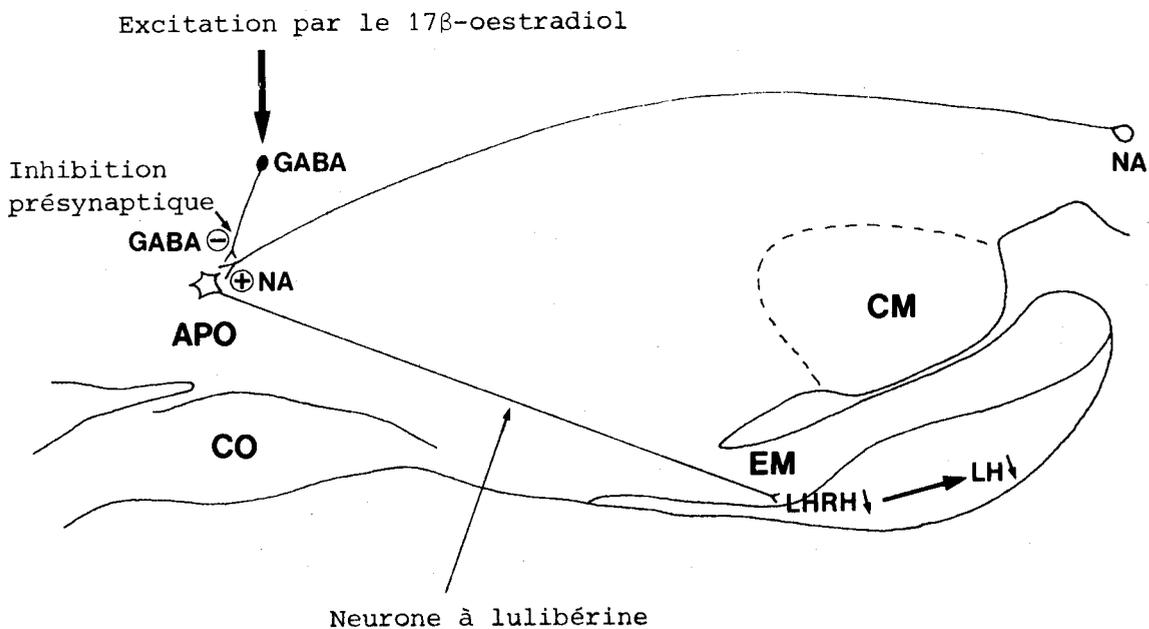


**FIGURE 44** : Schéma montrant les relations faisceau médian du télencéphale, aire préoptique, éminence médiane et la nature possible des neurotransmetteurs impliqués dans les afférences excitatrices de ce faisceau aux neurones endocrines.  
 Abréviations : APO, aire préoptique ; EM, éminence médiane ; HA, histamine ; NA, noradrénaline.

IV - INTERACTION 17  $\beta$ -OESTRADIOL, NEURONES NORADRENERGIQUES

Un renouvellement élevé de la noradrénaline dans l'aire préoptique est observé chez des animaux ovariectomisés (LÖFSTRÖM et coll., 1977). Ceci suggère que la rétroaction négative des oestrogènes s'exerce, au moins en partie, dans l'aire préoptique en impliquant la noradrénaline. WUTTKE et coll. (1981) émettent l'hypothèse que la régulation de ce renouvellement se situe au niveau des terminaisons noradrénergiques et met en jeu un mécanisme d'inhibition présynaptique par le GABA. A l'appui de leur hypothèse, ces auteurs démontrent que le renouvellement du GABA est faible chez des animaux ovariectomisés. Par conséquent, la rétroaction négative des oestrogènes peut impliquer une inhibition présynaptique GABAergique de la libération de noradrénaline dans l'aire préoptique. D'ailleurs, une injection intraventriculaire de GABA chez des animaux ovariectomisés réduit significativement les taux de LH plasmatique ainsi que le renouvellement de la noradrénaline préoptique. L'application locale de 17  $\beta$ -oestradiol dans l'aire préoptique chez des animaux ovariectomisés réduit le renouvellement de la noradrénaline dans cette aire. Ceci indique que des neurones sensibles au 17  $\beta$ -oestradiol existent dans l'aire préoptique et y influencent le renouvellement de la noradrénaline. Les observations de WUTTKE et coll. (1981) montrent que le 17  $\beta$ -oestradiol augmente le renouvellement du GABA mais diminue celui de la noradrénaline dans l'aire préoptique et que le GABA diminue également ce renouvellement de la noradrénaline. Ces résultats suggèrent que dans la rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol, les neurones sensibles au stéroïde dans l'aire préoptique peuvent être GABAergiques et inhiber le renouvellement de la noradrénaline par une action au niveau des terminaisons noradrénergiques. DUFY et coll. (1978) démontrent que la rétroaction négative des stéroïdes n'implique pas une synthèse protéique, mais est un processus rapide qui peut mettre en jeu des modifications de fréquence de décharge de neurones en relation avec des effets membranaires. Nos résultats électrophysiologiques acquis avec le 17  $\beta$ -oestradiol sur des neurones septo-préoptiques corroborent l'ensemble des résultats précédents. En tenant compte du fait que des neurones à lulibérine sont présents dans l'aire préoptique (BARRY et coll., 1973), que nous observons dans cette aire, des effets excitateurs de la noradrénaline sur l'activité unitaire de neurones endocrines, il est possible d'établir un schéma hypothétique concernant le mécanisme de rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol (figure 45).

Le stéroïde peut exciter les neurones GABAergiques, ce qui entraîne une inhibition de la libération de noradrénaline. L'action excitatrice de cette amine sur les neurones à lulibérine est ainsi supprimée. Ceci peut expliquer les taux faibles de LH plasmatique pendant la phase de rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol.



**FIGURE 45** : Schéma illustrant les relations possibles entre neurones GABAergiques, noradrénergiques et à lulibérine dans le mécanisme de rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol.

Abréviations : APO : aire préoptique ; EM : éminence médiane ; NA : noradrénaline.

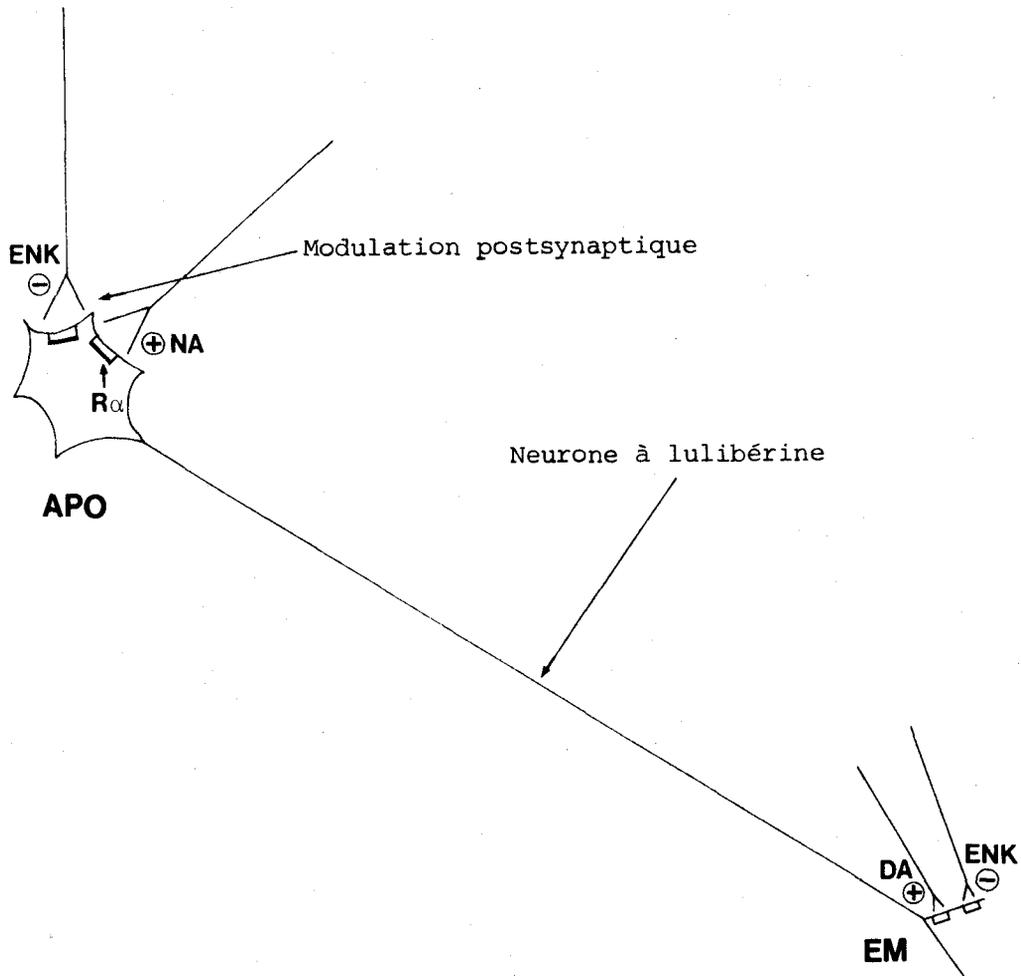
V - INTERACTION ENKEPHALINE, NORADRENALINE SUR DES NEURONES A LULIBERINE

Des expériences récentes (KALRA et SIMPKINS, 1981) suggèrent l'implication de la noradrénaline dans l'action des peptides opioïdes sur la sécrétion de LH. L'augmentation des taux de LH plasmatique induite par la naloxone est abolie par des dépléteurs des taux de noradrénaline dans l'hypothalamus, et par un agent bloquant les récepteurs alpha-adrénergiques. Le site de l'interaction entre peptides opioïdes et noradrénaline apparaît être l'aire préoptique puisque d'une part, l'implantation de naloxone dans cette aire déclenche la libération de LH (KALRA et SIMPKINS, 1981), d'autre part la déafférentation entre l'hypothalamus antérieur et l'hypothalamus médiobasal abolit cette réponse (HIGUCHI et KAWAKAMI, 1981). Des preuves morphologiques sont également en faveur de l'aire préoptique puisque des terminaisons noradrénergiques et enképhalinerigiques ainsi que des corps cellulaires de neurones à lulibérine y sont localisés.

Des expériences biochimiques montrent que les enképhalines inhibent la libération d'un certain nombre de substances : neurotransmetteurs classiques (noradrénaline, dopamine, acétylcholine) et peptides (substance P) à travers des récepteurs morphiniques, au niveau de synapses axo-axoniques (réf. dans BEAUMONT et HUGHES, 1979). Les enképhalines, dans ce cas, sont considérées comme des neuromodulateurs présynaptiques de la libération de neurotransmetteurs. Ces peptides opioïdes peuvent également agir comme neuromodulateurs postsynaptiques en interférant avec des neurotransmetteurs. TSANG et coll. (1978) montrent qu'au niveau du cortex cérébral et de l'hypothalamus, les peptides opioïdes se lient à leurs récepteurs spécifiques membranaires et que le complexe enképhaline-récepteur inhibe ensuite la liaison de la noradrénaline aux récepteurs alpha et bêta-adrénergiques.

Les deux types de neuromodulation dans l'interaction peptides opioïdes, noradrénaline sont possibles. Nos résultats montrent que les enképhalines inhibent l'activité unitaire de neurones endocrines de la région préoptique, l'effet étant bloqué par la naloxone. De plus, en présence d'ions  $Mg^{++}$  qui bloquent la transmission synaptique, l'effet des peptides opioïdes persiste, il est donc postsynaptique. En fonction de nos résultats, de ceux de TSANG et coll. (1978), de KALRA et SIMPKINS (1981), le schéma hypothétique suivant peut être proposé concernant l'action des enképhalines

sur les corps cellulaires des neurones à lulibérine (figure 46). Nous y ajoutons l'effet des peptides opioïdes sur les terminaisons axoniques de ces mêmes neurones d'après les travaux de ROTSZTEJN et coll. (1978) qui montrent que les enképhalines bloquent l'effet stimulateur de la dopamine sur la libération de LHRH.



**FIGURE 46** : Schéma montrant les deux sites d'action possibles des enképhalines sur un neurone à lulibérine.

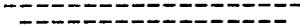
Abréviations : APO : aire préoptique ; DA : dopamine ; ENK : enképhalines ; NA : noradrénaline ; R $\alpha$  : récepteur alpha-adrénergique.

VI - INTERACTIONS 17  $\beta$ -OESTRADIOL, ENKEPHALINE ET 17  $\beta$ -OESTRADIOL, HISTAMINE

Des études récentes (CICERO et coll., 1980) indiquent que des neurones enképhalinerigiques sont impliqués dans la rétroaction négative exercée par la testostérone. Il n'y a pas de données similaires concernant la rétroaction négative du 17  $\beta$ -oestradiol. Des résultats indiquent simplement que le 17  $\beta$ -oestradiol augmente les taux de mét-enképhaline dans l'aire préoptique (DUPONT et coll., 1980). D'autre part, les taux de mét-enképhaline dans l'aire préoptique-hypothalamique antérieure varient en fonction du cycle oestral chez la ratte (KUMAR et coll., 1979), ce qui suggère que les enképhalines sont impliquées dans la régulation de la fonction hypothalamo-hypophysaire durant le cycle oestral. Les données actuelles ne nous permettent pas cependant d'établir des corrélations avec celles que nous avons obtenues concernant les enképhalines et le 17  $\beta$ -oestradiol.

PORTALEONE et coll. (1980) montrent qu'une interaction est possible entre le 17  $\beta$ -oestradiol et les récepteurs histaminergiques au niveau hypothalamique. D'autres données sont nécessaires pour intégrer ces résultats dans la régulation de fonctions neuroendocrines.

C O N C L U S I O N



Les neurorégulateurs contrôlent l'activité des neurones de différentes façons :

- par une modification de l'excitabilité membranaire,
- par une régulation du métabolisme des neurotransmetteurs.

Au niveau du système nerveux central, les neurones endocrines parvocellulaires constituent la voie finale commune essentielle dans la régulation des sécrétions adénohypophysaires. Ces neurones sont soumis au contrôle de différents neurorégulateurs.

Nos résultats montrent que la noradrénaline et l'histamine font partie de ces neurorégulateurs en modifiant l'excitabilité membranaire de neurones endocrines identifiés électrophysiologiquement et dont les corps cellulaires sont situés dans l'aire septo-préoptique. Les neurones adjacents, susceptibles également de participer au contrôle des sécrétions adénohypophysaires sont soumis à la même influence. Ces substances ionisables ont été appliquées par la technique de microiontophorèse à partir de micropipettes multiples. Dans le cas de l'histamine, l'application a été réalisée à partir de micropipettes de notre fabrication dont le canal d'enregistrement fait saillie. L'activité unitaire des neurones étudiés, dont le corps cellulaire est de petite taille, est ainsi améliorée à la fois dans son amplitude et dans sa stabilité. Tandis que les effets rapides et transitoires de l'histamine permettent de penser à un rôle de neurotransmetteur, des variations plus durables de la polarisation membranaire des neurones suggèrent un rôle de modulateur pour cette substance dans l'aire septo-préoptique.

Nos résultats montrent également que les enképhalines, pentapeptides morphinomimétiques, appliqués par microiontophorèse à partir de micropipettes dont le canal d'enregistrement fait saillie, exercent uniquement un effet inhibiteur sur l'activité unitaire de neurones endocrines et adjacents

de l'aire septopréoptique et de l'hypothalamus tubéral. Cette uniformité d'effet indique vraisemblablement un seul site d'action au niveau cellulaire pour ces substances. Les inhibitions complètes par les enképhalines sur une activité induite par le glutamate de neurones silencieux suggèrent que ce site est postsynaptique. La persistance des effets des enképhalines en présence de  $Mg^{++}$  qui bloque la transmission synaptique permet d'affirmer que le site est postsynaptique.

Nos résultats font apparaître en outre, une sensibilité différentielle de certains neurones à la leu- et à la mét-enképhaline, ce qui implique :

- une distribution différentielle des deux enképhalines,
- des récepteurs différents pour ces deux peptides morphinomimétiques,
- une fonction différentielle pour chacun d'eux.

Ces hypothèses que nous avons formulées en 1978 (CARETTE et POULAIN, 1978) ont été confirmées par la suite par différentes études. Enfin, le fait que nous observions des effets inhibiteurs des enképhalines, bloqués ou non par la naloxone suggère que des récepteurs morphiniques multiples existent.

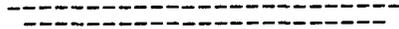
Il est admis que neurotransmetteurs classiques et neuro-peptides agissent au niveau de récepteurs membranaires avec parfois mise en jeu d'un second messager intracellulaire pour exercer leurs effets. Des travaux récents (GOLDFINE, 1981) suggèrent que des peptides peuvent agir sur leurs cellules-cibles en se fixant sur des récepteurs spécifiques membranaires, le complexe peptide-récepteur étant ensuite internalisé par la cellule. A l'intérieur de celle-ci, le complexe se dissocie, le récepteur est soit dégradé, soit recyclé dans la membrane et le peptide se lie à des organites cytoplasmiques pour exercer son effet. Il est concevable qu'un tel mécanisme d'action survienne pour les peptides au niveau du système nerveux central. Les concepts courants concernant la neurotransmission, la neuromodulation sont également revus actuellement à la lumière de certains travaux comme ceux indiquant la présence au sein d'une même terminaison nerveuse, d'un neurotransmetteur classique et d'un neuropeptide (CHANPALAY et coll., 1978) ou de deux neuropeptides (TRAMU et coll. 1977, TRAMU et LEONARDELLI, 1979 ; BEAUVILLAIN et coll., 1981) ou même d'un neurotransmetteur classique et de deux neuropeptides (JOHANSSON et coll. 1981). La signification fonctionnelle de ces neurones contenant plusieurs substances n'est pas encore connue. Dans certains cas, il semble que deux substances puissent interagir au

niveau du même récepteur. Les techniques que nous avons utilisées au cours de ce travail, peuvent constituer un moyen de vérifier de telles hypothèses.

Les hormones stéroïdes sont également des neurorégulateurs jouant un rôle important dans certains événements neuroendocriniens. Classiquement, le mécanisme par lequel elles agissent comporte les étapes suivantes : diffusion à travers la membrane du neurone, liaison à un récepteur cytoplasmique, translocation du complexe stéroïde-récepteur vers le noyau du neurone puis altération du génome, étape initiale d'une synthèse protéique. Par la suite, des résultats obtenus sur différents types cellulaires ont suggéré que les stéroïdes pouvaient également agir au niveau membranaire (BAULIEU, 1978). En utilisant des stéroïdes acides appliqués par iontophorèse, nous montrons que ces substances provoquent des modifications d'activité unitaire de neurones septo-préoptiques. Ces effets surviennent après une courte latence, suggérant un effet membranaire. Cependant, ces stéroïdes acides ne sont pas conventionnels. Pour appliquer des stéroïdes naturels non ionisables au voisinage de neurones, nous avons utilisé la technique d'éjection par pression à partir de micropipettes multiples de notre fabrication. Nous montrons pour la première fois que des stéroïdes naturels, dans des conditions *in vivo*, peuvent déclencher des effets électriques rapides sur des neurones de l'aire septo-préoptique. La nature et la rapidité des effets observés suggèrent que l'action des stéroïdes implique un phénomène membranaire. Ainsi la neuromodulation par ces substances peut s'exercer aussi bien au niveau du noyau du neurone qu'au niveau de sa membrane.

Des résultats récents obtenus dans le laboratoire du Professeur BAULIEU donnent une nouvelle dimension à la neurorégulation par les stéroïdes dans le cerveau. Ces résultats montrent qu'un stéroïde, le sulfate de déhydroépiandrostérone est synthétisé dans le cerveau et représente donc un "neurostéroïde" (CORPECHOT et coll., 1981). Nous avons testé, en collaboration avec P. POULAIN, le sulfate de déhydroépiandrostérone sur des neurones septo-préoptiques. Les résultats préliminaires montrent que ce "neurostéroïde", appliqué par iontophorèse, modifie l'excitabilité membranaire des neurones testés.

B I B L I O G R A P H I E



- ALVAREZ E.D. et DONOSO A.O. (1981). Effects of histamine implants in several brain regions on the release of prolactin in conscious adult male rats. J. Endocr. 88, 351-358.
- ANDERSON C.H. et SHEN C.L. (1980). Efferents of the medial preoptic area in the guinea pig : autoradiographic study. Brain Res. Bull. 5, 257-265.
- ARAKELIAN M.C. et LIBERTUN C. (1977) H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> histamine receptor participation in the brain control of prolactin secretion in lactating rats. Endocrinology 100, 890-895.
- ARMSTRONG-JAMES M. et MILLAR J. (1979). Carbon fibre microelectrodes. J. Neuroscience Methods 1, 279-287.
- ARNAULD E., DUFY B., PESTRE M. et VINCENT J.D. (1981). Effects of estrogens on the responses of caudate neurons to microiontophoretically applied dopamine. Neurosc. Lett. 21, 325-331.
- BARCHAS J.D., AKIL H., ELLIOTT C.R., HOLMAN R.B. et WATSON S.J. (1978). Behavioral neurochemistry : neuroregulators and behavioral states. Science 200, 964-973.
- BARGMANN W. et SCHARRER E. (1951). The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. Amer. Scient. 39, 255-259.
- BARKER J.L., CRAYTON J.W. et NICOLL R.A. (1971). Noradrenaline and acetylcholine responses of supraoptic neurosecretory cells. J. Physiol. (Lond.) 218, 19-32.
- BARRACLOUGH C.A. et CROSS B.A. (1963). Unit activity in the hypothalamus of the cyclic female rat : effect of genital stimuli and progesterone. J. Endocr. 26, 339-359.
- BARRACLOUGH C.A. et SAWYER C.H. (1955). Inhibition of the release of pituitary hormone in the rat by morphine. Endocrinology 57, 329-337.
- BARRY J., DUBOIS M.P. et CARETTE B. (1974). Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway in the normal, castrated or testosterone-treated male guinea pig. Endocrinology 95, 1416-1423.
- BARRY J., DUBOIS M.P. et POULAIN P. (1973). LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. Z. Zellforsch. 146, 351-366.
- BAULIEU E.E. (1978). Cell membrane, a target for steroid hormones. Mol. Cell. Endocrinol. 12, 247-254.
- BAULIEU E.E., GODEAU F., SCHORDERET M. et SCHORDERET-SLATKINE S. (1978). Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes : surface and calcium. Nature 275, 593-598.
- BEAUMONT A. et HUGHES J. (1979). Biology of opioid peptides. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19, 245-267.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G. et DUBOIS M.P. (1981). Ultrastructural immunocytochemical evidence of the presence of a peptide related to ACTH in granules of LHRH nerve terminals in the median eminence of the guinea pig. Cell Tissue Res. 218, 1-6.

- BEN BARAK Y., GUTNICK M.J. et FELDMAN S. (1977). Iontophoretically applied corticosteroids do not affect the firing of hippocampal neurons. Neuroendocrinology, 23, 248-256.
- BERTACCINI G. et CORUZZI G. (1981). Evidence for and against heterogeneity in the histamine H<sub>2</sub>-receptor population. Pharmacology, 23, 1-13.
- BLACKWELL R.E. et GUILLEMIN R. (1973). Hypothalamic control of adenohipophyseal secretions. Ann. Rev. Physiol. 35, 357-390.
- BRADLEY P.B., GAYTON R.J. et LAMBERT L.A. (1978). Electrophysiological effects of opiates and opioid peptides. In Centrally acting peptides, ed. HUGHES J., The Macmillan Press Ltd, London, p. 215-229.
- BROWNSTEIN M.J., PALKOVITS M., TAPPAZ M.L., SAAVEDRA J.M. et KIZER J.S. (1976). Effect of surgical isolation of the hypothalamus on its neurotransmitter content. Brain Res. 117, 287-295.
- BROWNSTEIN M.J., SAAVEDRA J.M., PALKOVITS M. et AXELROD J. (1974). Histamine content of hypothalamic nuclei of the rat. Brain Res. 77, 151-156.
- BRUNI J.F., VAN VUGT D., MARSHALL S. et MEITES J. (1977). Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroïde stimulating hormone and growth hormone. Life Sci. 21, 461-466.
- CARETTE B. (1975). Projection de neurones de la région préoptique et de l'aire hypothalamique antérieure vers l'hypothalamus médio-basal chez le cobaye mâle. C.R. Acad. Sci. (Paris), 281, 917-920.
- CARETTE B. (1976). Iontophorèse de la noradrénaline sur des neurones des aires septale, préoptique et hypothalamique antérieure. C. R. Acad. Sci. (Paris), 282, 1877-1880.
- CARETTE B. (1978a). A new method of manufacturing multibarrelled micropipettes with projecting recording barrel. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 44, 248-250.
- CARETTE B. (1978b). Responses of preoptic-septal neurons to iontophoretically applied histamine. Brain Res. 145, 391-395.
- CARETTE B. (1981). Effects of iontophoretic application of enkephalins and naloxone on tuberoinfundibular and adjacent neurons in the guinea pig. Neuropeptides, 1, 283-291.
- CARETTE B., BARRY J., LINKIE D., GERIN M., MESTER J. et BEAULIEU E.E. (1979). Effets de l'"oestradiol-7  $\alpha$ -acide butyrique" au niveau de cellules hypothalamiques. C.R. Acad. Sci. (Paris), 288, 631-634.
- CARETTE B. et POULAIN P. (1978). Inhibitory action of iontophoretically applied methionine-enkephaline and leucine-enkephaline on tuberal hypothalamic neurons. Neurosci. Lett. 7, 137-140.
- CARETTE B. et POULAIN P. (1981). Postsynaptic inhibitory effects of met- and leu-enkephaline on endocrine and adjacent neurones in the preoptic-septal region of guinea pig. Regulatory peptides, sous presse.

- CASANUEVA F., BETTI R., COCCHI D., CHIELI T., MANTEGAZZA P. et MULLER E.E. (1981) Proof for histaminergic but not for adrenergic involvement in the growth hormone-releasing effect of an enkephalin analog in the dog. Endocrinology 108, 157-163.
- CASANUEVA F., BETTI R., FRIGERIO C., COCCHI D., MANTEGAZZA P. et MULLER E.E. (1980) Growth hormone-releasing effect of an enkephalin analog in the dog : evidence for cholinergic mediation. Endocrinology 106, 1259-1245.
- CHANG K.J. et CUATRECASAS P.J. (1979). Multiple opiate receptors : enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. J. Biol. Chem. 254, 2610-2618.
- CHAN-PALAY V., JONSSON G. et PALAY S.L. (1978). Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1582-1586.
- CICERO T.J., BADGER T.M., WILCOX C.E., BELL R.D. et MEYER E.R. (1977). Morphine decreases luteinizing hormone by an action on the hypothalamic-pituitary axis. J. Pharmac. Exp. Ther. 203, 548-555.
- CICERO T.J., MEYER E.R., GABRIEL S.M., BELL R.D. et WILCOX C.E. (1980). Morphine exerts testosterone-like effects in the hypothalamus of the castrated male rat. Brain Res. 202, 151-164.
- CLARKE G., LINCOLN D.W. et WOOD P. (1980). Inhibition of vasopressin neurones by intraventricular morphine. J. Physiol. (Lond.), 303, 59-607.
- CLARKE G., WOOD P., MERRICK L. et LINCOLN D.W. (1979). Opiate inhibition of peptide release from the neurohumoral terminals of hypothalamic neurones. Nature 282, 746-748.
- COCCHI D., SANTAGOSTINO A., GIL-AD I., FERRI S. et MULLER E.E. (1977). Leu-enkephalin stimulated growth hormone and prolactin release in the rat : comparison with the effect of morphine. Life Sci. 20, 2041-2046.
- CORPECHOT C., ROBEL P., AXELSON M., SJOVALL J. et BAULIEU E.E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in the rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (sous presse).
- COWAN A., DOXEY J.C. et METCALF G. (1976). A comparison of pharmacological effects produced by leucine-enkephalin, methionine-enkephalin, morphine and ketocyclazocine. In Opiates and Endogenous opioid peptides, ed. by H.W. KOSTERLITZ, North-Holland Publishing Co, New-York, p. 95-103.
- CROIX D. et FRANCHIMONT P. (1975). Changes in the serum levels of the gonadotrophins, progesterone and estradiol during the estrus cycle of the guinea-pig. Neuroendocrinology 19, 1-11.
- CROSS B.A., DYBALL R.E.J., DYER R.G., JONES C.W., LINCOLN D.W., MORRIS J.F. et PICKERING B.T. (1975). Endocrine neurones. Recent Progress in Hormone Research, 37, 243-294.
- CROSS B.A. et DYER R.G. (1971). Unit activity in rat diencephalic islands : the effect of anesthetics. J. Physiol. (Lond.), 212, 467-481.

- CROSSMAN A.R., WALKER R.J. et WOODRUF G.N. (1974). Problems associated with iontophoretic studies in the caudate nucleus and substantia nigra. Neuropharmacology 13, 547-552.
- CURTIS D.R. (1968). A method for assembly of "parallel" micropipettes. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 24, 584-589.
- CURTIS D.R. et JOHNSTON G.A.R. (1974). Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. Rev. Physiol. 69, 97-188.
- DAIKOKU S., MATSUMURA H. et SHINOHARA Y. (1976). Efferent projection of the nucleus Praeopticus Medialis to the median eminence in rats. Neuroendocrinology 21, 130-138.
- DAVIES J. et DRAY A. (1976). Effects of enkephalin and morphine on Renshaw cells in feline spinal cord. Nature 262, 603-604.
- DAVIES J. et WATKINS J.C. (1977). Effect of magnesium ions on the responses of spinal neurones to excitatory amino acids and acetylcholine. Brain Res. 130, 364-368.
- DEMOULIN A., HAZEE-HAGELSTEIN M.T., RENARD C. et FRANCHIMONT P. (1980). Action de la leucine-enképhaline et de la méthionine-enképhaline sur la libération et la synthèse des gonadotrophines et de la prolactine in vitro. C.R. Soc. Biol. 174 211-215.
- DEVOTO P., MARCHISIO A.M., CARBONI E. et SPANO P.F. (1980). Detection of <sup>3</sup>H cimetidine specific binding in rat anterior pituitary. Europ. J. Pharmacol. 63, 91-93.
- DEVRIES G.H., CHANCE W.T., PAYNE W.R. et ROSECRANS J.A. (1979). Effect of autoanalgesia on CNS enkephalin receptors. Pharmac. Biochem. Behav. 11, 741-744.
- DONOSO A.O. (1978). Induction of prolactin and luteinizing hormone release by histamine in male and female rats and the influence of brain transmitter antagonists. J. Endocr. 76, 193-202.
- DONOSO A.O. et BANZAN A.M. (1979). Release of prolactin and LH and histamine-containing cells in brain. J. Neural Transmission 44, 327-332.
- DONOVAN B.T. et HARRIS G.W. (1956). Adrenergic agents and the release of gonadotrophic hormone in the rabbit. J. Physiol. (Lond.) 132, 577-585.
- DREIFUSS J.J., KALNINS I., KELLY J.S. et RUFF K.B. (1971). Action potentials and release of neurohypophysial hormones, in vitro. J. Physiol. (Lond.) 215, 805-817.
- DROUVA S.V., EPELBAUM J., TAPIA-ARANCIBIA L., LAPLANTE E. et KORDON C. (1981). Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from medio-basal hypothalamic neurons. Neuroendocrinology, 32, 163-167.
- DUFY B. et DUFY BARBE L. (1978). Effects of gonadal steroids on the electrical activity of hypothalamic neurons. In Biologie cellulaire des processus neurosécrétoires hypothalamiques, Eds J.D. VINCENT et KORDON C., Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 207-220.
- DUFY B., DUFY-BARBE L. et VINCENT J.D. (1978). Effects of protein synthesis inhibitors on the negative feedback effect of estrogen on LH release. Hormone Res. 9, 279-291.

- DUFY B., PARTOUCHE C., POULAIN D., DUFY-BARBE L. et VINCENT J.D. (1976). Effect of estrogen on electrical activity of identified and unidentified hypothalamic units. Neuroendocrinology 22, 38-47.
- DUFY B., VINCENT J.D., FLEURY H., DU PASQUIER P., GOURDJI D. et TIXIER-VIDAL A. (1979). Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells. Science 204, 509-511.
- DUPONT A., BARDEN N., CUSAN L., MERAND Y., LABRIE F. et VAUDRY H. (1980).  $\beta$ -endorphin and met-enkephalin : their distribution, modulation by estrogens and haloperidol, and role in neuroendocrine control. Fed. Proc. 39, 2544-2550.
- DYBALL R.E.J. (1971). Oxytocin and ADH secretion in relation to electrical activity in antidromically identified supraoptic and paraventricular units. J. Physiol. (Lond.), 214, 245-256.
- DYBALL R.E.J., DYER R.G. et DREWETT R.F. (1974). Chemical sensitivity of preoptic neurones which project to the medial basal hypothalamus. Brain Res. 71, 140-143.
- DYER R.G., MANSFIELD S. et YATES J.O. (1980). Discharge of gonadotrophin-releasing hormone from the mediobasal part of the hypothalamus : effect of stimulation frequency and gonadal steroids. Exp. Brain Res. 39, 453-460.
- EGAN T.M. et NORTH R.A. (1981). Evidence for both  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors on the same myenteric neurons. Fed. Proc. 40, 287.
- ELDE R., HOKFELT T., JOHANSSON O. et TERENIUS L. (1976). Immunohistochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin : initial observations on the nervous system of the rat. Neuroscience 1, 349-351.
- ENJALBERT A., RUBERG M., ARANCIBIA S., PRIAM M. et KORDON C. (1979). Endogenous opiates block dopamine inhibition of prolactin secretion in vitro. Nature, 280, 595-597.
- FORD D.M. (1974). Multi-barrelled micropipettes with improved recording characteristics. J. Physiol. (Lond.) 239, 8-9P.
- FRIES W. et ZIEGLGANSBERGER W. (1974). A method to discriminate axonal from cell body activity and to analyse "silent cells". Exp. Brain Res. 21, 441-445.
- FRY J.P., ZIEGLGANSBERGER W. et HERZ A. (1978). Tachyphylaxis to enkephalin. tolerance and dependence at the single neurone level ? In iontophoresis and transmitter mechanisms in the mammalian central nervous system, Ed. RYALL R.W. et KELLY J.S., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 323-325.
- FRY J.P., ZIEGLGANSBERGER W. et HERZ A. (1979). Specific versus non-specific actions of opioids on hippocampal neurones in the rat brain. Brain Res. 163, 295-305.
- FUXE K., ANDERSSON K., LOFSTROM A., HOKFELT T., FERLAND L., AGNATI L.F., PEREZ DE LA MORA M., SCHWARCZ R., ENEROTH P., GUSTAFSSON J.A. et SKETT P. (1979). Neurotransmitter mechanisms in the control of the secretion of hormones from the anterior pituitary. In Central Regulation of the Endocrine System (Eds. FUXE K., HOKFELT T. et LUFT R.) Plenum Press, New York, p. 349-380.

- GAHWILLER B.H. (1980). Excitatory action of opioid peptides and opiates on cultured hippocampal pyramidal cells. Brain Res. 194, 192-203.
- GALLO R.V. (1980). Neuroendocrine regulation of pulsatile luteinizing hormone release in the rat. Neuroendocrinology 30, 122-131.
- GARBARG M., BARBIN G., BISCHOFF S., POLLARD H. et SCHWARTZ J.C. (1976). Dual localization of histamine in an ascending neuronal pathway and in non-neuronal cells evidenced by lesions in the lateral hypothalamic area. Brain Res. 106, 333-348.
- GARRIS D.R. (1979). Direct septo-hypothalamic projections in the rat. Neurosci. Lett. 13, 83-90.
- GELLER H.M. (1976). Effects of some putative neurotransmitters on unit activity of tuberal hypothalamic neurons in vitro. Brain Res. 108, 423-430.
- GELLER H.M. (1979). Are histamine H<sub>2</sub>-receptor depressions of neuronal activity in tissue cultures from rat hypothalamus mediated through cyclic adenosine monophosphate? Neurosci. Lett. 14, 49-53.
- GELLER H.M. (1981). Histamine actions on activity of cultured hypothalamic neurons: evidence for mediation by H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>- histamine receptors. Developmental Brain Res. 1, 89-101.
- GELLER H.M. et HOFFER B.J. (1977). Effect of calcium removal on monoamine-elicited depressions of cultured tuberal neurons. J. Neurobiol. 9, 43-55.
- GOLDFINE I.D. (1981). Interaction of insulin, polypeptide hormones, and growth factors with intracellular membranes. Biochem. Biophys. Acta 650, 53-67.
- GOODMAN R.R., SNYDER S.H., KUCHAR M.J. et YOUNG W.S. III (1980). Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, 6239-6243.
- GORDON C.J. et HEATH J.E. (1979). Technique for applying neurotropic substances onto single units in awake animals. Brain Res. Bull. 4, 863-865.
- GRANDISON L., FRATTA W. et GUIDOTTI A. (1980). Location and characterization of opiate receptors regulating pituitary secretion. Life Sci. 26, 1633-1642.
- GREEN J.D. et HARRIS G.W. (1947). The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. J. Endocr. 5, 136-146.
- GRUOL D.L. et WEINREICH D. (1979). Two pharmacologically distinct histamine receptors mediating membrane hyperpolarization on identified neurons of *Aplysia californica*. Brain Res. 162, 281-301.
- GUDELSKY G.A. et PORTER J.C. (1979). Morphine- and opioid peptide induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. Life Sci. 25, 1697-1702.
- HAAS H.L. (1981). Analysis of histamine actions by intra- and extra-cellular recording in hippocampal slices of the rat. Agents and Actions 11, 125-128.
- HAAS H.L. et BUCHER V.M. (1975). Histamine H<sub>2</sub>-receptors on single cerebral neurones. Nature 255, 634-635.

- HAAS H.L. et WOLF P. (1977). Central actions of histamine : microelectrophoretic studies. Brain Res. 122, 269-279.
- HAAS H.L., WOLF P. et NUSSBAUMER J.C. (1975). Histamine : action on supraoptic and other hypothalamic neurones of the cat. Brain Res. 88, 166-170.
- HAAS H.L., WOLF P., PALACIOS J.M., GARBARG M., BARBIN G. et SCHWARTZ J.C. (1978). Hypersensitivity to histamine in the guinea-pig brain : microiontophoretic and biochemical studies. Brain Res. 156, 275-291.
- HANCKE J.L. et WUTTKE W. (1979). Effects of chemical lesion of the ventral noradrenergic bundle or of the medial preoptic area on preovulatory LH release in rats. Exp. Brain Res. 35, 127-134.
- HARRIS M.C., MAKARA G.B., et SPYER K.M. (1971). Electrophysiological identification of neurones of the tubero-infundibular system. J. Physiol. (Lond.), 218, 87P-88P.
- HARRIS G.W., MANABE Y. et RUF K.B. (1969). A study of the parameters of electrical stimulation of the unmyelinated fibres in the pituitary stalk. J. Physiol. (Lond.) 203, 67-81.
- HARRIS M.C. et SANGHERA M.K. (1974). Projection of medial basal hypothalamic neurones to the preoptic anterior hypothalamic areas and the paraventricular nucleus in the rat. Brain Res. 81, 401-411.
- HASKINS J.T., GUDELSKY G.A., MOSS R.L. et PORTER J.C. (1981). Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus : effects on dopamine concentration in hypophysial portal plasma and serum prolactin concentrations. Endocrinology 108, 767-771.
- HAVEY D.C. et CASPARY D.M. (1980). A simple technique for constructing "piggy-back" multibarrel microelectrodes. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 48, 249-251.
- HIGUCHI T. et KAWAKAMI M. (1981). Naltrexone-induced LH release in ovariectomized estrogen-primed rat. Endocrinol. Japon 28, 45-50.
- HILL R.G. et PEPPER C.M. (1978). Studies on the pharmacology of nociceptive neurones in the rat thalamus. In iontophoresis and transmitter mechanisms in the mammalian central nervous system, Eds RYALL R.W. et KELLY J.S., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 329-331.
- HILL R.G., PEPPER C.M. et MITCHELL J.F. (1976). Depression of nociceptive and other neurones in the brain by iontophoretically applied met-enkephalin. Nature 262, 604-606.
- HOKFELT T., ELDE R., FUXE K., JOHANSSON O., LJUNGAHL A., GOLDSTEIN M., LUFT R. EFFENDIC S., NILSSON G., TERENIUS L., GANTEN D., JEFFCOATE S., REHFELD J., SAID S. PEREZ DE LA MORA M., POSSANI L., TATIA R., TERAN L. et PALACIOS R. (1978). Aminergic and peptidergic pathways on the nervous system with special reference to the hypothalamus. In the hypothalamus, eds. REICHLIN S., BALDESSARINI R. et MARTIN J.B. Raven Press, New-York, p. 69-135.

- HÖKFELT T., ELDE R., JOHANSSON D., TERENIUS L. et STEIN L. (1977). Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. I. cell bodies. Neurosci. Lett. 5, 25-31.
- HOSFORD D.A. et HAIGLER H.J. (1980). Morphine and methionine-enkephalin : different effects on spontaneous and evoked neuronal firing in the mesencephalic reticular formation of the rat. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 355-363.
- HOSFORD D.A., HAIGLER H.J. et TURNER R.S. (1981). Methionine-enkephalin and morphine : amount ejected microiontophoretically. J. Neuroscience Methods, 4, 135-139.
- HUGHES J. (1981). Peripheral opiate receptor mechanisms. Trends in pharmacological sciences 2, 21-24.
- HUGHES J., SMITH T.W., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.A., MORGAN B.A. et MORRIS H.R. (1975a). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258, 577-579.
- HUGHES J., SMITH T.W., MORGAN B. et FOTHERGILL L. (1975b). Purification and properties of enkephalin. The possible endogenous ligand for the morphine receptor. Life Sci. 16, 1753-1758.
- IBATA Y., NOJYO Y., MIZUKAWA K. et SANO Y. (1977). Direct projection from the medial preoptic area to the median eminence of the cat. Endocrinol. Japon 24, 497-502.
- INABA M. et KAMATA K. (1979). Effect of estradiol-17 $\beta$  and other steroids on norepinephrine and dopamine binding to synaptic membrane fragments of rat brain. Journal of steroid biochemistry 11, 1491-1497.
- IVERSEN L.L., IVERSEN S.D. et BLOOM F.E. (1980). Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. Nature 284, 350-351.
- JACKSON G.L. (1973). Time interval between injection of estradiol benzoate and LH release in the rat and effect of actinomycin D or cycloheximide. Endocrinology 93, 887-892.
- JELL R.M. (1974). Responses of rostral hypothalamic neurones to peripheral temperature and to amines. J. Physiol. (Lond.) 240, 295-307.
- JENKINSON D.H. (1957). The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) 138, 434-444.
- JOHANSSON O. et HÖKFELT T. (1980). Thyrotropin releasing hormone, somatostatin, and enkephalin : distribution studies using immunohistochemical techniques. J. Histochem. Cytochem. 28, 364-366.
- JOHANSSON O., HÖKFELT T., PERNOW B., JEFFCOATE S.L., WHITE N., STEINBUSCH H.W.M., VERHOFSTAD A.A.J., EMSON P.C. et SPINDEL E. (1981). Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron : coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. Neuroscience 6, 1857-1881.

- JONES M.T., HILLHOUSE E.W. et BURDEN J.L. (1977). Dynamics and mechanics of corticosteroid feedback at the hypothalamus and anterior pituitary gland. J. Endocr. 73, 405-417.
- KALRA S.P., CHEN C.L. et KUMAR M.S.A. (1981). Differential response of methionine-enkephalin in basal hypothalamus and preoptic area following hypothalamic deafferentation. Brain Res. 215, 410-413.
- KALRA S.P. et McCANN S.M. (1973). Effect of drugs modifying catecholamine synthesis on LH release induced by preoptic stimulation in the rat. Endocrinology 93, 356-362.
- KALRA S.P. et SIMPKINS J.W. (1981). Evidence for noradrenergic mediation of opioid effects on luteinizing hormone secretion. Endocrinology 109, 776-782.
- KAWAKAMI M. et SAKUMA Y. (1976). Electrophysiological evidences for possible participation of periventricular neurons in anterior pituitary regulation. Brain Res. 101, 79-94.
- KAWANO H. et DAIKOKU S. (1981). Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 32, 179-186.
- KELLY J.S. (1975). Microiontophoretic application of drugs onto single neurons. In L.L. IVERSEN, S.D. IVERSEN and S. SNYDER (Eds.), Handbook of psychopharmacology 2, Plenum Pres, New-York, p. 29-67.
- KELLY M.J., KUHN U. et WUTTKE W. (1980). Hyperpolarization of hypothalamic parvocellular neurons by  $17\beta$ -estradiol and their identification through intracellular staining with Procion Yellow. Exp. Brain Res. 40, 440-447.
- KELLY M.J., MOSS R.L. et DUDLEY C.A. (1976). Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. Brain Res. 114, 152-157.
- KELLY M.J., MOSS R.L. et DUDLEY C.A. (1977b). The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. Exp. Brain Res. 30, 53-64.
- KELLY M.J., MOSS R.L. et DUDLEY C.A. (1978). The effects of ovariectomy on the responsiveness of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen. Neuroendocrinology 25, 204-211.
- KELLY M.J., MOSS R.L., DUDLEY C.A. et FAWCETT C.P. (1977a). The specificity of the response of preoptic-septal area neurons to estrogen :  $17\alpha$ -estradiol versus  $17\beta$ -estradiol and the response of extrahypothalamic neurons. Exp. Brain Res. 30, 43-52.
- KENDRICK K.M. et DREWETT R.F. (1979). Testosterone reduces refractory period of stria terminalis neurons in the rat brain. Science 204, 877-879.
- KIRSTEN E.B. et SHARMA J.N. (1976). Microiontophoresis of acetylcholine, histamine and their antagonists on neurones in the medial and lateral vestibular nuclei of the cat. Neuropharmacology 15, 743-753.

- KOCH B., LUTZ-UCHER B., BRIAUD B. et MIALHE C. (1978). Specific interaction of corticosteroids with binding sites in the plasma membranes of the rat anterior pituitary gland. J. Endocr. 79, 215-222.
- KORITSANSZKY S. et KOVES K. (1976). Data on the absence of axon terminals of medial preoptic area neurons in the surface zone of the median eminence J. Neural Trans. 38, 159-167.
- KREY L.C. et SILVERMAN A.J. (1978). The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain. II. The regulation on gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence. Brain Res. 157, 247-255.
- KRNJEVIC K. et PHILLIS J.W. (1963). Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiol. (Lond.), 165, 274-304.
- KUMAR M.S.A., CHEN C.L. et MUTHER T.F. (1979). Changes in the pituitary and hypothalamic content of methionine-enkephalin during the estrous cycle of rats. Life Sci. 25, 1687-1696.
- LARSSON L.I., CHILDERS S. et SNYDER S.H. (1979). Met- and leu-enkephalin immunoreactivity in separate neurones. Nature 282, 407-410.
- LECHAN R.M., NESTLER J.L., JACOBSON S. et REICHLIN S. (1980). The hypothalamic "tuberoinfundibular" system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HRP) microiontophoresis. Brain Res. 195, 13-27.
- LENG G. (1980). Rat supraoptic neurones : the effects of locally applied hypertonic saline. J. Physiol. (Lond.), 304, 405-414.
- LEONARDELLI J., BARRY J. et DUBOIS M.P. (1973). Mise en évidence par immunofluorescence d'un constituant immunologiquement apparenté au LH-RH dans l'hypothalamus et l'éminence médiane des mammifères. C.R.Acad. Sci. (Paris), 276, 2043-2046.
- LEONARDELLI J. et DUBOIS M.P. (1974). Neurotransmetteurs hypothalamiques et centre élaborateur du LH-RH. Bull. Ass. Anat. 58, 599-609.
- LIBERTUN C. et McCANN S.M. (1976). The possible role of histamine in the control of prolactin and gonadotropin release. Neuroendocrinology 20, 110-120.
- LINCOLN D.W. et KELLY W.A. (1972). The influence of urethane on ovulation in the rat. Endocrinology 90, 1594-1599.
- LINCOLN D.W. et WAKERLEY J.B. (1974). Electrophysiological evidence for the activation of supraoptic neurones during the release of oxytocin. J. Physiol. (Lond.), 242, 533-554.
- LINCOLN D.W. et WAKERLEY J.B. (1975). Factors governing the periodic activation of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells during suckling in the rat. J. Physiol. (Lond.), 250, 443-461.
- LOFSTROM A., ENEROTH P., GUSTAFSSON J.A. et SKETT P. (1977). Effects of estradiol benzoate on catecholamine levels and turnover in discrete areas of the median eminence and the limbic forebrain, and on serum luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin concentrations in the ovariectomized female rat. Endocrinology 101, 1559-1569.

- LORD J.A.H., WATERFIELD A.A., HUGHES J. et KOSTERLITZ H.W. (1977). Endogenous opioid peptides : multiple agonists and receptors. Nature 267, 495-499.
- LUTZ-BUCHER B. et KOCH B. (1980). Evidence for a direct inhibitory effect of morphine on the secretion of posterior pituitary hormones. European Journal of Pharmacology 66, 375-378.
- MAC LEOD N., REINHARDT W. et ELLENDORFF F. (1979) Olfactory bulb neurons of the pig respond to an identified steroidal pheromone and testosterone. Brain Res. 164, 323-327.
- MAKARA G.B., HARRIS M.C. et SPYER K.M. (1972). Identification and distribution of tubero-infundibular neurones. Brain Res. 40, 283-290.
- MAKARA G.B. et HODACS L. (1975). Rostral projections from the hypothalamic arcuate nucleus. Brain Res. 84, 23-29.
- MALPELI J.G. et SCHILLER P.H. (1979). A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. J. Neuroscience Methods 1, 143-151.
- MARTIN W.R. (1967). Opioid antagonists. Pharmac. Rev. 19, 463-521.
- MARTIN W.R., EADES C.G., THOMPSON J.A., HUPPLER R.E. et GILBERT P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 517-532.
- MARTIN R. et VOIGT K.H. (1981). Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. Nature 289, 502-504.
- MARTINOVIC T.V. et McCANN S.M. (1977). Effect of lesions in the ventral noradrenergic tract produced by microinjection of 6-hydroxydopamine on gonadotropin release in the rat. Endocrinology 100, 1206-1213.
- MARWAHA J., PALMER M., HOFFER B. et FREEDMAN R. (1980). Phencyclidine-induced depressions of cerebellar Purkinje neurons. Life Sci. 26, 1509-1515.
- MAY P.B., MITTLER J.C. et ERTEL N.H. (1979). Enkephalins and pituitary hormone release : modification of responsiveness to LHRH. Hormone Res. 10, 57-63.
- MCCAMAN R.E., MCKENNA D.G. et ONO J.K. (1977). A pressure system for intracellular and extracellular ejections of picoliter volumes. Brain Res. 136, 141-147.
- MCEWEN B.S., KREY L.C. et LUINE V.N. (1978). Steroid hormone action in the neuroendocrine system : when is the genome involved ? In the Hypothalamus, eds. REICHLIN S., BALDESSARINI R. et MARTIN J.B., Raven Press, New-York, p. 255-268.
- MEITES J., BRUNI J.F., VAN VUGT D.A. et SMITH A.F. (1979). Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. Life Sci. 24, 1325-1336.
- MIKITEN T.M. et DOUGLAS W.W. (1965). Effect of calcium and other ions on vasopressin release from rat neurohypophysis stimulated electrically in vitro. Nature 207, 302-304.
- MOSS R.L., KELLY M.J. et DUDLEY C.A. (1978). Chemosensitivity of hypophysiotropic neurons to the microelectrophoresis of biogenic amines. Brain Res. 139, 141-152.

- MOSS R.L., KELLY M. et RISKIND P. (1975). Tuberoinfundibular neurons : dopaminergic and norepinephrinergic sensitivity. Brain Res. 89, 265-277.
- MUEHLETHALER M., GAHWILER B.H. et DREIFUSS J.J. (1980). Enkephalin-induced inhibition of hypothalamic paraventricular neurons. Brain Res. 197, 264-268.
- MURRIN L.C., COYLE J.T. et KUCHAR M.J. (1980). Striatal opiate receptors : pre- and postsynaptic localization. Life Sci. 27, 1175-1183.
- NEGRO-VILAR A., OJEDA S.R. et McCANN S.M. (1979). Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals *in vitro*. Endocrinology 104, 1749-1757.
- NICOLL R.A. (1971). Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb. Brain Res. 35, 137-149.
- NICOLL R.A., ALGER B.E. et JAHR C.E. (1980). Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS. Nature 287, 22-25.
- NICOLL R.A., SIGGINS G.R., LING N., BLOOM F.E. et GUILLEMIN R. (1977). Neuronal actions of endorphins and enkephalins among brain regions : a comparative microiontophoretic study. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2584-2588.
- NINKOVIC M., HUNT S.P., EMSON P.C. et IVERSEN L.E. (1981). The distribution of multiple opiate receptors in bovine brain. Brain Res. 214, 163-167.
- NOJYO Y., IBATA Y. et SANO Y. (1976). Demonstration of the tuberoinfundibular tract of the cat. Fluorescence histochemistry and electron microscopy. Cell. Tiss. Res. 168, 289-301.
- NORSTROM A., ENESTROM S. et HAMBERGER A. (1971). Amino acid incorporation into proteins of the supraoptic nucleus of the rat after osmotic stress. Brain Res. 26, 95-103.
- NORTH R.A. (1979). Opiates, opioid peptides and single neurones. Life Sci. 24, 1527-1546.
- NOWAK J.Z. et PILC A. (1979). The action of histamine, histamine H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>-receptor agonists on noradrenaline level in rat brain. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 31, 107-113.
- OKA T. (1980). Enkephalin receptor in the rabbit ileum. Br. J. Pharmac. 68, 193-195.
- OLIVER A.P. (1971). A simple rapide method for preparing parallel micropipette electrodes. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 31, 284-286.
- ONO T., OOMURA Y., NISHINO H., SASAKI K., MURAMOTO K. et YANO I. (1980). Morphine and enkephalin effects on hypothalamic glucoresponsive neurons. Brain Res. 185 208-212.
- OZEGOVIC B., SCHON E. et MILKOVIC S. (1977). Interaction of (<sup>3</sup>H)-aldosterone with rat kidney plasma membranes. J. Steroid Biochem. 8, 815-819.
- PALACIOS J.M. et KUCHAR M.J. (1980). Beta-adrenergic receptor localization by light microscopic autoradiography. Science 208, 1378-1380.

- PALACIOS J.M., WAMSLEY J.K. et KUCHAR M.J. (1981). The distribution of histamine  $H_1$ -receptors in the rat brain : an autoradiographic study. Neuroscience 6, 15-37.
- PALMER M.R. et HOFFER B.J. (1980). Catecholamine modulation of enkephalin-induced electrophysiological responses in cerebral cortex. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 205-215.
- PALMER M.R., WUERTHELE S.M. et HOFFER B.J. (1980). Physical and physiological characteristics of micropressure ejection of drugs from multibarreled pipettes. Neuropharmacology 19, 931-938.
- PATEY G., DE LA BAUME S., GROS C. et SCHWARTZ J.C. (1980). Ontogenesis of enkephalinergic systems in rat brain : post-natal changes in enkephalin levels, receptors and degrading enzyme activities. Life Sci. 27, 245-252.
- PERKINS M.N. et WHITEHEAD S.A. (1978). Responses and pharmacological properties of preoptic/anterior hypothalamic neurones following medial forebrain bundle stimulation. J. Physiol. (Lond.), 279, 347-360.
- PERKINS M.N. et WHITEHEAD S.A. (1979). Neural connexions between the medial forebrain bundle, the preoptic area and the basal hypothalamus in the rat : an electrophysiological study. J. Physiol. (Lond.), 291, 443-456.
- PIETRAS R.J. et SZEGO C.M. (1977). Specific binding sites of oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 265, 69-72.
- PIETRAS R.J. et SZEGO C.M. (1979a). Estrogen receptors in uterine plasma membrane. J. Steroid Biochem. 11, 1471-1483.
- PIETRAS R.J. et SZEGO C.M. (1979b). Metabolic and proliferation responses to estrogen by hepatocytes selected for plasma membrane binding-sites specific for estradiol-17  $\beta$ . J. Cell. Physiol. 98, 145-160.
- PITTMAN Q.J., HATTON J.D. et BLOOM F.E. (1980). Morphine and opioid peptides reduce paraventricular neuronal activity : studies on the rat hypothalamic slice preparation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5527-5531.
- POLLARD H., BISCHOFF S., LLORENS-CORTES C. et SCHWARTZ J.C. (1976). Histidine decarboxylase and histamine in discrete nuclei of rat hypothalamus and the evidence for mast-cells in the median eminence. Brain Res. 118, 509-513.
- PORTALEONE P., GENAZZANI E., PAGNINI G., CRISPINO A., et DI CARLO F. (1980). Interaction of estradiol and 2-hydroxy-estradiol with histamine receptors at hypothalamic level. Brain Res. 187, 216-220.
- PORTALEONE P., PAGNINI G., CRISPINO A. et GENAZZANI E. (1978). Histamine sensitive adenylate cyclase in hypothalamus of rat brain :  $H_1$  and  $H_2$  receptors. J. Neurochem. 31, 1371-1374.
- POULAIN P. (1974). L'hypothalamus et le septum du cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 63, 37-50.
- POULAIN P. (1977). Septal afferents to the arcuate-median eminence region in the guinea pig : correlative electrophysiological and horseradish peroxidase studies. Brain Res. 137, 150-158.

- POULAIN P. et CARETTE B. (1981a). Changes in the firing rate of single preoptic-septal neurons induced by direct application of natural and conjugated steroids. In : Steroid hormone regulation of the brain (Ed. FUXE F., GUSTAFSSON J.A. et WETTERBERG L.), Symposium international n° 34, Wenner-Gren Center, Stockholm, 27-28 October 1980, Pergamon Press, p. 191-201.
- POULAIN P. et CARETTE B. (1981b). Pressure ejection of drugs on single neurons in vivo : technical considerations and application to the study of estradiol effects. Brain Res. Bull. 7, 33-40.
- POULAIN P. et PARTOUCHE C. (1973). Relations des neurones de la région préoptique et du septum avec le noyau arqué et l'éminence médiane. C.R.Acad. Sci.(Paris) 277, 737-739.
- POULAIN D.A., WAKERLEY J.B. et DYBALL R.E.J. (1977). Electrophysiological differentiation of oxytocin- and vasopressin- secreting neurones. Proc. Roy. Soc., London B, 196, 367-384.
- RAMIREZ V.D. et KORDON C. (1978). In vitro release and regulation of neurohormones from hypothalamic fragments or isolated nerve endings. In Biologie cellulaire des processus neurosécrétoires hypothalamiques, eds. J.D. VINCENT et KORDON C. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 579-598.
- RENAUD L.P. (1976). Histamine microiontophoresis on identified hypothalamic neurons : 3 patterns of response in the ventromedial nucleus of the rat. Brain Res. 115, 339-344.
- RENAUD L.P. (1981). A neurophysiological approach to the identification, connections and pharmacology of the hypothalamic tuberoinfundibular system. Neuroendocrinology, 33, 186-191.
- RICHARD P., FREUND-MERCIER M.J. et MOOS F. (1978). Les neurones hypothalamiques ayant une fonction endocrine : identification, localisation, caractéristiques électrophysiologiques et contrôle hormonal. J. Physiol. (Paris), 74, 61-112.
- RICHARDS C.D. et SERCOMBE R. (1970). Calcium, magnesium and the electrical activity of guinea-pig olfactory cortex in vitro. J. Physiol. (Lond.), 211, 571-584.
- ROSSIER J., VARGO T.M., MINICK S., LING N., BLOOM F.E. et GUILLEMIN R. (1977). Regional dissociation of  $\beta$ -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5162-5165.
- ROTSZTEJN W.H., CHARLI J.L., PATTOU E. et KORDON C. (1977). Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats. Endocrinology 101, 1475-1483.
- ROTSZTEJN W.H., DROUVA S.V., PATTOU E. et KORDON C. (1978). Met-enkephalin inhibits in vitro dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. Nature 274, 281-282.
- SAKAI M., SWARTZ B.E. et WOODY C.D. (1979). Controlled micro release of pharmacological agents : measurements of volume ejected in vitro through fine tipped glass microelectrodes by pressure. Neuropharmacology 18, 209-213.

- SAR M., STUMPF W.E., MILLER R.J., CHANG K.J. et CUATRECASAS P. (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J. Comp. Neurol. 182, 17-38.
- SARKAR D.K. et FINK G. (1981). Gonadotropin-releasing hormone surge : possible modulation through postsynaptic  $\alpha$ -adrenoreceptors and two pharmacologically distinct dopamine receptors. Endocrinology 108, 862-867.
- SASTRY B.S.R. et PHILLIS J.W. (1976). Evidence for an ascending inhibitory histaminergic pathway to the cerebral cortex. Can. J. Physiol. Pharmacol. 54, 782-786.
- SATAYAVIVAD J. et KIRSTEN E.B. (1977). Iontophoretic studies of histamine and histamine antagonists in the feline vestibular nuclei. Europ. J. Pharmacol. 41, 17-26.
- SATOH M., ZIEGLGANSBERGER W., FRIES W. et HERZ A. (1974). Opiate agonist-antagonist interaction at cortical neurones of naive and tolerant/dependent rats. Brain Res. 82, 378-382.
- SAWAKI Y. et YAGI K. (1973). Electrophysiological identification of cell bodies of the tuberoinfundibular neurones following stimulation of the median eminence of the rat. J. Physiol. (Lond.), 230, 75-85.
- SAWAKI Y. et YAGI K. (1976). Inhibition and facilitation of antidromically identified tuberoinfundibular neurones following stimulation of the median eminence of the rat. J. Physiol. (Lond.), 260, 447-461.
- SAWYER C.H. (1955). Rhinencephalic involvement in pituitary activation by intraventricular histamine in the rabbit under nembutal anesthesia. Am. J. Physiol. 180, 37-46.
- SCHWARTZ J.C. (1975). Histamine as a transmitter in brain. Life Sci. 17, 503-518.
- SCHWARTZ J.C. (1979). Histamine receptors in brain. Life Sci. 25, 895-912.
- SCHWARTZ J.C. et ROQUES B.P. (1980). Opioid peptides as intercellular messengers. Biomedicine 32, 169-175.
- SEGAL M. (1974). Responses of septal nuclei neurons to microiontophoretically administered putative neurotransmitters. Life Sci. 14, 1345-1351.
- SHAAR C.J., FREDERICKSON R.C.A., DININGER N.B. et JACKSON L. (1977). Enkephalin analogues and naloxone modulate the release of growth hormone and prolactin. evidence for regulation by an endogenous opioid peptide in brain. Life Sci. 21, 853-860.
- SHEN C.L. et ANDERSON C.H. (1980). Efferents from the medial anterior hypothalamic area in the guinea pig. Brain Res. Bull. 5, 693-701.
- SILVERMAN A.J. et KREY L.C. (1978). The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain. I. Intra- and extra-hypothalamic projections. Brain Res. 157, 233-246.
- SIMPKINS J.W., ADVIS J.P., HODSON C.A. et MEITES J. (1979). Blockade of steroid-induced luteinizing hormone release by selective depletion of anterior hypothalamic norepinephrine activity. Endocrinology 104, 506-509.

- SNYDER S.H. et GOODMAN R.R. (1980). Multiple neurotransmitter receptors. J. Neurochem. 35, 5-15.
- SOMJEN G.G. et KATO G. (1968). Effects of magnesium and calcium on neurones in the central nervous system. Brain Res. 9, 161-164.
- SONNHOF U., RICHTER D.W. et STEINBERG R. (1975). A tungsten electrode insulated by a concentric arrangement of glass-pipettes for iontophoresis. Pflügers Arch. ges. Physiol. 360, 45-48.
- SPAMPINATO S., LOCATELLI V., COCCHI D., VICENTINI L., BAJUSZ S., FERRI S. et MULLER E.E. (1979). Involvement of brain serotonin in the prolactin-releasing effect of opioid peptides. Endocrinology 105, 163-170.
- SPEHLMANN R. (1969). Multi-barreled coaxial micro-pipettes with independent control of the central recording barrel. Electroenceph. clin. Neurophysiol. 27, 201-204.
- SWEATMAN P. et JELL R.M. (1977). Dopamine and histamine sensitivity of rostral hypothalamic neurones in the cat : possible involvement in thermoregulation. Brain Res. 127, 173-178.
- SZABADI E. (1979). Adrenoceptors on central neurones : microelectrophoretic studies. Neuropharmacology 18, 831-843.
- SZABADI E. et BRADSHAW C.M. (1974). The role of physical and biological factors in determining the time course of neuronal responses. Neuropharmacology 13, 537-545.
- SZENTAGOTHAI J., FLERKO B., MESS B. et HALASZ B. (1968). Hypothalamic control of the anterior pituitary. 3rd Ed. Akademiai Kiado, Budapest 399p.
- TAMURA Y. et MARUYAMA S. (1979). An apparatus for the assembly of a combined single barrel recording electrode and a multibarrelled micropipette. J. Neuroscience Methods 1, 249-252.
- TASAKI K., TSUKAHARA Y., ITO S., WAYNER M.J. et YU W.Y. (1968). A simple, direct, and rapid method for filling microelectrodes. Physiol. Behav. 3, 1009-1010.
- TERZUOLO C.A., et ARAKI T. (1961). An analysis of intra-versus extracellular potential changes associated with activity of single spinal motoneurons. Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 547-558.
- TEYLER T.J., VARDARIS R.M., LEWIS D. et RAWITCH A.B. (1980). Gonadal steroids : effects on excitability of hippocampal pyramidal cells. Science 209, 1017-1019.
- TINDAL J.S. et KNAGGS G.S. (1977). Pathways in the forebrain of the rat concerned with the release of prolactin. Brain Res. 119, 211-221.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C., CROIX D. et LEONARDELLI J. (1981). Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig. Brain Res. 215, 235-255.
- TRAMU G. et LEONARDELLI J. (1979). Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. Brain Res. 168, 457-471.

- TRAMU G., LEONARDELLI J. et DUBOIS M.P. (1977). Immunohistochemical evidence for an ACTH-like substance in hypothalamic LH-RH neurons. Neurosci. Lett. 6, 305-309.
- TSANG D., TAN A.T., HENRY J.L. et LAL S. (1978). Effect of opioid peptides on noradrenaline-stimulated cyclic AMP formation in homogenates of rat cerebral cortex and hypothalamus. Brain Res. 152, 521-527.
- TUOMISTO J. et TUOMISTO L. (1980). Effects of histamine and histamine antagonists on the uptake and release of catecholamines and 5-HT in brain synaptosomes. Med. Biol. 58, 33-37.
- UNGERSTEDT U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Europ. J. Pharmacol. 5, 107-110.
- UNGERSTEDT U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol. Scand. Suppl. 367, 1-48.
- VAUGHT J.L. et TAKEMORI A.E. (1979a). Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence. J. Pharmacol. Exp. Ther. 208, 86-90.
- VAUGHT J.L. et TAKEMORI A.E. (1979b). A further characterization of the differential effects of leucine enkephalin, methionine enkephalin and their analogs on morphine-induced analgesia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211, 280-283.
- WAKERLEY J.B. et LINCOLN D.W. (1973). Unit activity in the supraoptic nucleus during reflex milk ejection. J. Endocr. 59, XLVI-XLVII.
- WAREMBOURG M. (1977). Radioautographic localization of estrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea-pig. Brain Res. 123, 357-362.
- WEINER R.I., BLAKE C.A., RUBINSTEIN L. et SAWYER C.H. (1971). Electrical activity of the hypothalamus : effects of intraventricular catecholamines. Science 171, 411-412.
- WEINER R.I. et GANONG W.F. (1978). Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. Physiological Reviews 58, 905-976.
- WEINER R.I., SELMANOFF M.K., CHEUNG C.Y., CRONIN M.J. et GOLDSMITH P.C. (1978). Brain catecholamines and control of LH and prolactin secretion in the rat. Dans J.D. VINCENT et C. KORDON (Eds.), Biologie cellulaire des processus neurosécrétoires hypothalamiques, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 101-115.
- WHITEHEAD S.A. et RUF K.B. (1974). Responses of antidromically identified preoptic neurons in the rat to neurotransmitters and to estrogen. Brain Res. 79, 185-198.
- WIEGAND S.J. et PRICE J.L. (1980). Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. J. Comp. Neurol. 192, 1-19.
- WUTTKE W., MANSKY T., STOCK K.W. et SANDMANN R. (1981). Modulatory actions of estradiol on catecholamine and GABA turnover and effects on serum prolactin and LH release. In Steroid hormone regulation of the brain (Eds. FUXE F., GUSTAFSSON J.A. et WETTERBERG L.), Symposium international n° 34, Wenner-Gren center, Stockholm, 27-28 October 1980, Pergamon Press, p. 135-146.

- YAGI K., AZUMA T. et MATSUDA K. (1966). Neurosecretory cell capable of conducting impulse in rat. Science 154, 778-779.
- YAGI K. et SAWAKI Y. (1970). On the localization of neurosecretory cells controlling adeno-hypophysial function. J. Physiol. Soc. Jap. 32, 621-622.
- YAGI K. et SAWAKI Y. (1977). Medial preoptic nucleus neurons : inhibition and facilitation of spontaneous activity following stimulation of the median eminence in female rats. Brain Res. 120, 342-346.
- YAGI K. et SAWAKI Y. (1978). Electrophysiological characteristics of identified tubero-infundibular neurons. Neuroendocrinology 26, 50-64.
- YAMADA Y. (1975). Effects of iontophoretically-applied prolactin on unit activity of the rat brain. Neuroendocrinology 18, 263-271.
- YAMADA Y. et NISHIDA E. (1978). Effects of estrogen and adrenal androgen on unit activity of the rat brain. Brain Res. 142, 187-190.
- YAMADA Y. et UESHIMA H. (1978). Methods of electrophoretical application of estrogen to a single neuron of the brain under in vivo and in vitro conditions. Endocrinol. Japon. 25, 397-401.
- YANG H.Y., HONG J.S. et COSTA E. (1977). Regional distribution of leu and met-enkephalin in rat brain. Neuropharmacology 16, 303-307.
- YOUNG III W.S. et KUCHAR M.J. (1980). Noradrenergic alpha-1 and alpha-2 receptors : light microscopic autoradiographic localization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 77, 1696-1700.
- ZIEGLGANSBERGER W., FRENCH E.D., SIGGINS G.R. et BLOOM F.E. (1979). Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. Science 205, 415-417.
- ZIEGLGANSBERGER W. et TULLOCH I.F. (1979). The effects of methionine- and leucine-enkephalin on spinal neurones of the cat. Brain Res. 167, 53-64.



Cette Thèse a été  
imprimée sur Offset  
par  
le Service Polycopie  
de l'ASSOCIATION CORPORATIVE  
DES ETUDIANTS EN MEDECINE DE  
LILLE