

50376
1987
133

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1987
133

ANNÉE UNIVERSITAIRE 1986-1987

THÈSE N° 133

THESE
PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
MENTION : PHYSIOLOGIE ANIMALE ET CELLULAIRE



PHILIPPE CIOFI

LA CHOLECYSTOKININE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL.
IMMUNOHISTOCHEMIE. COLOCALISATION AVEC DIVERS
NEUROPEPTIDES DANS L'HYPOTHALAMUS DE QUELQUES
MAMMIFERES DONT L'HOMME

SOUTENUE LE 29 JUIN 1987, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN.

JURY

PRÉSIDENT : Mr J.-P. DUPOUY
DIRECTEUR DE THÈSE : Mr G. TRAMU
RAPPORTEURS : Mr J.-C. ANDRIES
Mr B. BLOCH
EXAMINATEUR : Mr M. MAZZUCA

SCD LILLE 1



D 030 246964 5

50376
1987
133

50376
1987
133

SOMMAIRE

=====

AVANT-PROPOS.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	2
I-SUJETS EXPERIMENTAUX.:.....	3
A-Sexe et conditions d'élevage des animaux.....	3
B-Traitement par la colchicine.....	3
C-Autres tissus étudiés.....	4
II-OBTENTION DES IMMUNSERUMS.....	4
A-Origine des antigènes.....	4
B-Couplages des antigènes.....	4
Préparation de l'immunogène CCK-8ns - thyroglobuline.....	6
C-Protocole d'immunisation.....	6
1) Premier jour.....	6
2) Rappels.....	6
3) Reprise des rappels.....	7
D-Conservation des immunosérums.....	7
III-SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS.....	7
IV-METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES.....	7
A-La préparation du tissu.....	8
1) Fixation.....	8
a - Perfusion.....	8
b - Dissection du cerveau.....	8
c - Post-fixation et lavage des tissus.....	8
2) Inclusion.....	8
3) Congélation.....	8
4) Coupe et conservation des coupes.....	9
B-Réaction immunohistochimiques.....	9
1) Application du sérum spécifique.....	10
2) Application du sérum marqué.....	10
a - Sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.....	10
b - Sérum marqué à la peroxydase de Raifort.....	11
3) Utilisation de deux chromogènes différents pour la visualisation simultanée de deux antigènes différents sur une même coupe.....	12
4) Intensification du précipité de la diaminobenzidine.....	12
a - Principe.....	13
b - Réalisation.....	13



5) Réactions immunohistochimiques successives avec élution des anticorps.	14
a - Principe.....	15
b - Réalisation.....	15
c - Contrôle de l'efficacité de l'élution.....	16
C-Spécificité de la réaction immunohistochimique.....	16
1) Les tests immunohistologiques.....	16
a - Spécificité de l'immunsérum de la première étape.....	16
b - Spécificité du composé marqué.....	18
c - Spécificité de la réaction enzymatique.....	18
2) Les tests radioimmunologiques.....	18

PREMIERE PARTIE : IMMUNOHISTOCHIMIE DE LA CHOLECYSTOKININE DANS LE SYSTEME
NERVEUX CENTRAL DU COBAYE

INTRODUCTION.....	24
Historique.....	25
La CCK neurotransmetteur.....	27
RESULTATS.....	31
I-NOMENCLATURE ANATOMIQUE.....	32
II-GENERALITES.....	32
III-AIRES CORTICALES.....	33
IV-LE COMPLEXE AMYGDALIEN.....	36
V-GANGLIONS DE LA BASE.....	38
VI-NOYAUX DU LIT DE LA STRIE TERMINALE.....	39
VII-SEPTUM.....	41
VIII-REGIONS PREOPTIQUES.....	41
IX-HYPOTHALAMUS ET HYPOPHYSE.....	42
A-L'innervation CCK-I de l'hypothalamus.....	42
B-Eminence médiane et neurohypophyse.....	43
C-Distribution des péricaryons marqués dans l'hypothalamus.....	44
D-Adénohypophyse.....	46
X-THALAMUS.....	46
XI-LES FAISCEAUX DE SUBSTANCE BLANCHE.....	48
XII-COEXISTENCE DES IR-CCK ET IR-CRF.....	48
A-Eminence médiane.....	49
B-Noyau paraventriculaire.....	49
DISCUSSION.....	60
Aires corticales.....	61
Complexe amygdalien.....	64
Striatum.....	65

Noyaux du lit de la strie terminale.....	67
Septum.....	67
Régions préoptiques.....	68
Hypothalamus et neurohypophyse.....	69
Adénohypophyse.....	77
Thalamus.....	78
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	80

SECONDE PARTIE : LA CHOLECYSTOKININE DU NOYAU ARQUE: SA COLOCALISATION
AVEC DIVERS NEUROPEPTIDES CHEZ QUELQUES MAMMIFERES
DONT L'HOMME

INTRODUCTION.....	83
RESULTATS.....	84
I-RAPPEL METHODOLOGIQUE.....	85
II-GENERALITES.....	86
III-L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DU COBAYE.....	87
A-Distribution de l'IR-NPY.....	87
B-Distribution de l'IR-CCK.....	88
C-Distribution de l'IR-hGHRF.....	88
E-Comparaisons des différents marquages après élution des anticorps.....	89
1) Comparaison des IR-NPY et IR- END.....	89
2) Comparaison des IR-CCK et IR-NPY.....	89
3) Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY.....	90
4) Comparaison des IR-CTPG et IR-NPY.....	91
5) Comparaison des IR-NPY et IR-SOM.....	92
IV-L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DU CHAT.....	92
A-Distribution de l'IR-NPY.....	93
B-Distribution de l'IR-CCK.....	93
C-Distribution de l'IR-hGHRF.....	93
E-Comparaison des différents marquages après élution des anticorps.....	94
1) Comparaison des IR-CCK et IR-NPY.....	94
2) Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY.....	94
V-L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DU RAT.....	95
A-Distribution de l'IR-NPY.....	95
B-Distribution de l'IR-CCK.....	96
C-Distribution de l'IR-hGHRF.....	96
D-Comparaison des IR-CCK et IR-NPY.....	96
E-Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY.....	96
F-Comparaison des IR-hGHRF et IR-SOM.....	97

VI-L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DE L'HOMME.....	98
A-Distribution de l'IR-NPY.....	98
B-Distribution de l'IR-CCK.....	98
C-Distribution de l'IR-hGHRF.....	99
D-Distribution de l'IR-CTPG.....	99
E-Comparaison des IR-CCK et IR-NPY.....	100
F-Comparaison des IR-hGHRF, IR-CTPG et IR-NPY.....	100
VII-ETUDE DE LA COEXISTENCE DES IR-hGHRF ET IR-NPY DANS LE CERVEAU DU RAT... 101	
A-Distribution de l'IR-hGHRF extra-infundibulaire.....	102
B-Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY.....	103
C-Comparaison de la distribution des IR-NPY et IR-ACTH dans les régions limbiques du cerveau du Rat.....	104
DISCUSSION.....	106
La colocalisation des IR-CCK, IR-hGHRF et IR-NPY dans le noyau arqué.....	107
Le marquage anti-NPY de l'aire hypophysiotrope.....	109
Le marquage anti-CCK de l'aire hypophysiotrope.....	110
Le marquage anti-hGHRF de l'aire hypophysiotrope.....	114
Les projections des neurones (CCK,hGHRF,NPY)-I.....	121
Hypothèse relative à la fonction des neurones (CCK,hGHRF,NPY)-I.....	122
La coexistence des IR-hGHRF et IR-NPY dans le cerveau en général.....	124
CONCLUSION DE LA SECONDE PARTIE.....	126
CONCLUSION GENERALE.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	I-XXVII
Figure 1.....	9
Figure 2.....	15
Figure 3.....	37
Figure 4.....	38
Figure 5.....	40
Figure 6.....	45
Figure 7.....	47
Figure 8.....	70
Figure 9.....	72
Figure 10.....	111
Figure 11.....	111
Figure 12.....	115
Figure 13.....	115

Tableau 1.....	5
Tableau 2.....	19
Tableau 3.....	20
Atlas du Cobaye.....	51
Planches et légendes des planches.....	128
Notes.....	21



Ac, anticorps
ACTH, corticotropine (adrenocorticotropic hormone)
Ag, antigène
APP, polypeptide pancréatique aviaire (avian pancreatic polypeptide)
BPP, polypeptide pancréatique bovin (bovine pancreatic polypeptide)
BSA, sérumalbumine bovine (bovine serumalbumin)
CCK, cholécystokinine
CCK-8, octopeptide carboxyterminal sulfaté de la cholécystokinine
CCK-8ns, octopeptide carboxyterminal non sulfaté de la cholécystokinine
C-PON, extension carboxyterminale du neuropeptide Y (carboxyterminal end of the precursor of the neuropeptide Y)
CRF, corticolibérine (corticotropin-releasing factor)
CTPG, extension carboxyterminale de la somatolibérine (carboxyterminus of preproGRF)
DAB, diaminobenzidine
EM, eminence médiane
END, endorphine
GnRH, gonadolibérine
hGHRF, somatolibérine humaine (human growth hormone-releasing factor)
HSA, sérumalbumine humaine (human serumalbumin)
I, immunoréactif, tive
IgG, immunoglobuline G
IR, immunoréactivité
IS, immunsérum
LH, lutropine (luteinizing hormone)
MSH, mélanotropine (melanocyte-stimulating hormone)
NARC, noyau arqué
NPV, noyau hypothalamique paraventriculaire
NPY, neuropeptide Y
PAF, picric acid-formaldehyde
PAP, peroxydase anti-peroxydase
POMC, pro-opiomélanocortine
rGHRF, somatolibérine murine (rat growth hormone-releasing factor)
RIA, radioimmunoessais
SNC, système nerveux central
SOM, somatostatine
TSH, thyrotropine (thyroid-stimulating hormone)

AVANT-PROPOS

Il est aujourd'hui bien établi que la communication interneuronique au sein du système nerveux central repose sur l'utilisation par le neurone d'une variété de messagers chimiques libérés à l'interface synaptiques des circuits nerveux.

Ces messagers chimiques peuvent être classés en deux grand groupes : des neurotransmetteurs qui sont en général des molécules de petite taille, et des peptides, comptant souvent plusieurs dizaines d'acides aminés, qui sont considérés au moins comme des neuromodulateurs.

Un des aspects spectaculaires de la neurobiologie est l'isolement, depuis les vingt dernières années, grâce aux techniques biochimiques et immunochimiques, d'un nombre toujours croissant de neuropeptides, candidats potentiels à la transmission synaptique.

L'étude de la distribution des neurones peptidergiques par les techniques immunohistochimiques a permis de dresser de véritables cartographies qui définissent une neuroanatomie chimique du système nerveux central.

C'est dans ce cadre qu'entre le travail qui sera présenté ici.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I - SUJETS EXPERIMENTAUX

A - Sexe et conditions d'élevage des animaux

Le présent travail a été essentiellement mené chez le Cobaye et le Rat.

Les animaux étudiés ont surtout été de jeunes adultes mâles normaux (Cobaye Tricolore de 400-600 g et Rat Long Evans de 200-250 g).

Nous avons de plus examiné le SNC de deux Chats mâles adultes, de deux Lapins blanc New Zealand mâles adultes et de deux Souris blanches mâles adultes.

Ces animaux ont été soumis dans l'animalerie à un rythme d'éclairage de 12H/12H, à une température de 18°-20°C et ont eu libre accès à la nourriture et à la boisson.

B - Traitement par la colchicine

Exceptés trois Cobayes et trois Rats considérés comme animaux témoins, tous les sujets expérimentaux ont été traités par la colchicine. Ce traitement initialement employé par BARRY et al. (1973 a et b), a pour effet d'enrichir le corps cellulaire du neurone en produit de sécrétion car il désorganise le cytosquelette et entraîne un blocage du flux axonique. Cela conduit à un renforcement de l'immunoréactivité du péricaryon, donc de sa visualisation.

48 heures avant son sacrifice, l'animal est anesthésié au Nembutal (35 mg/kg, Serva) et le pelage est rasé au sommet de la tête. Son crâne est ensuite placé en contention dans un appareil stéréotaxique. Les mouvements latéraux de la tête de l'animal sont interdits par l'introduction d'une barre horizontale fixée dans chacun des conduits auditifs externes. Le pivotement interauriculaire est ensuite aboli par l'ajustement et la fixation, derrière les incisives supérieures, d'une plaquette qui enserre la totalité du museau de l'animal. La peau du crâne est alors incisée et l'os mis à nu est rapidement dégagé des tissus conjonctifs vascularisés adhérents par grattage à l'aide d'un coton-tige. L'incision étant maintenue ouverte, un pertuis est réalisé à l'aide d'une fraise de dentiste. Par cette ouverture une aiguille de seringue, solidaire de l'appareil stéréotaxique est descendue dans le cerveau, et en fonction de coordonnées stéréotaxiques précises, introduite dans le ventricule latéral. Cette aiguille, reliée à une pompe automatique, permet l'injection d'un volume donné d'une solution de colchicine dans du liquide physiologique.

Les quantités suivantes de colchicine (Serva, Heidelberg, R.F.A.) dissoutes dans 50 ul de liquide physiologique, ont été administrées aux animaux: 200 ug aux Cobayes, 100 ug aux Rats, 30 ug aux Souris et 1 mg aux Chats et Lapins.

A la fin de l'injection, l'aiguille est ôtée, la plaie est refermée à l'aide d'agrafes après application d'une poudre antiseptique (Exoseptoplix, Théraplix, Paris), et l'animal est allongé dans sa cage où sont disponibles nourriture et boisson.

C - Autres tissus étudiés

Des hypophyses complètes de Porc ont été obtenues auprès d'un abattoir local.

Nous avons de plus examiné un hypothalamus humain provenant de l'autopsie 6H post-mortem d'une femme de 78 ans n'ayant présenté aucun symptôme neurologique ou psychiatrique durant sa vie.

Ces tissus ont été fixé in toto par immersion dans du PAF puis classiquement préparés pour l'immunohistochimie.

II - OBTENTION DES IMMUNSERUMS

La plupart des immunsérums (IS) que nous avons utilisés ici ont été produits au laboratoire. Cependant, cinq d'entre eux sont dus à la générosité des Drs Margery C. BEINFELD (anti I-11-H, anti L-8-D et anti-D-10-Y), Bertrand BLOCH (anti-CTPG) et Julia M. POLAK (anti-GPON).

A - Origine des antigènes

Origine, couplage et molécule porteuse de chaque antigène ayant permis la production des différents IS sont récapitulés dans le Tableau 1.

B - Couplage des antigènes

Afin d'augmenter l'immunogénicité de l'antigène synthétique, celui-ci est couplé à une protéine porteuse, généralement une sérumalbumine ou une globuline, par l'intermédiaire d'un agent couplant, généralement le glutaraldéhyde (VANCE et al., 1968)(voir Tableau 1).

A titre d'exemple, nous détaillons ci-dessous le processus de couplage utilisé pour préparer l'immunogène CCK-8ns-thyroglobuline bovine.

Immunsérum	Antigène Synthétique	Origine	Couplage	Porteur	Références	
CCK	15/8	pCCK-8ns	Peninsula	Gluta	TGB	ENGELHARDT et al., 1982 STUDLER et al., 1984
	86	pCCK-8	Bachem	Gluta	HSA	STUDLER, 1985
	16	(26-29)pCCK-33	Peninsula	Gluta	BSA	CNP
	I-11-H	[Arg ¹²](2-12)rCCK-39	Peninsula	Gluta	BSA	CNP
	L-8-D	Lys-Arg-(1-6)rCCK-58	Peninsula	Gluta	BSA	CNP
	D-10-Y	r-préprocCCK(102-111)	Peninsula	Gluta	BSA	ALLARD et BEINFELD, 1985b BEINFELD, 1985b
GASTRINE	14	(1-17)hG34 I	UCB	Gluta	HSA	CNP
	15	(1-6)hG34 I	UCB	Gluta	HSA	CNP
GHRF	81	hGHRF1-44NH ₂	Bachem	Gluta	HSA	TRAMU et al., 1983
	43	rGHRF1-43OH	Peninsula	Gluta	BSA	CNP
	RB747	[Tyr ¹⁸]CTPG19-30NH ₂	Salk Institute	BB	BSA	BLOCH et al., 1986
NPY	12	pNPY	Peninsula	Gluta	HSA	CIOFI et al., 1987
	JN8	C-PON(1-30)	CRB	Gluta	BSA	ALEN et al., 1983 GLUBEKIAN et al., 1985
POMC	19515	(17-39)ACTH	Ciba Geigy	Gluta	HSA	DUBOIS, 1972
	19646	β-END	Salk Institute	Gluta	HSA	TRAMU et al., 1982
CRF	19	oCRF-41	Bachem (Ca)	Gluta	HSA	TRAMU et PILLEZ, 1982 TRAMU et al., 1983
SOM	7	(1-12)SOM-28	Peninsula	Gluta	HSA	CNP
GnRH	83L	GnRH	Serva	Gluta	TGB	TRAMU et al., 1977

BU
LILLE

Tableau 1 : CARACTERISTIQUES DES IMMUNSERUMS UTILISES

ACTH, corticotropine ; BB, benzidine bisdiazotée ; CCK, cholécystokinine ; pCCK-8, octopeptide C-t sulfaté de la CCK porcine ; CCK-8ns, CCK-8 non sulfaté de la CCK porcine ; rCCK, CCK murine ; CNP, caractéristiques immunologiques non publiées ; C-PON, extrémité C-t du pré-pro-neuropeptide Y humain ; oCRF, corticolibérine ovine ; CTPG, extrémité C-t de la pré-pro-somatolibérine humaine ; Bend, bêta-endorphine ; hG34 I, "big gastrin" humaine non sulfatée ; h,rGHRF, somatolibérine humaine et murine ; Gluta, glutaraldéhyde ; GnRH, lulibérine ; HSA, sérumalbumine humaine ; pNPY, neuropeptide Y porcin ; POMC, pro-opiomélanocortine ; SOM, somatostatine ; TGB, thyroglobuline bovine.

Préparation de l'immunogène CCK-8NS-thyroglobuline :

- 10 mg de thyroglobuline bovine sont dissous dans 1,5 ml de tampon phosphate 0,1M pH 7,2 (cf. Note 1),
- 5 mg de CCK-8ns sont dissous dans 1 ml de sérum physiologique,
- les deux solutions sont mélangées et sous agitation constante on y ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde 0,02M dans le tampon phosphate. L'agitation est maintenue trois heures à la température du laboratoire,
- le glutaraldéhyde est inhibé par addition de 0,75 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ dans 0,5 ml de tampon,
- l'ensemble est dialysé pendant 48 H contre une solution à 0,9 p. 100 de chlorure de sodium,
- le volume du dialysat est ajusté à 5 ml et réparti en 10 doses de 500 ul qui seront conservées à - 20°C jusqu'à utilisation.

C - Protocole d'immunisation

Nous décrivons ici le protocole d'immunisation employé au laboratoire pour la production des IS.

La solution antigénique est émulsionnée avec un volume égal d'adjuvant de Freund et administrée à un lapin.

L'immunisation a été réalisée conformément à la méthode par injections multiples de VAITUKAITIS et al. (1971), dont le protocole est détaillé ci-après.

1) Premier jour

L'animal reçoit une dose émulsionnée, soit un volume de 1 ml réparti en une quarantaine d'injections intradermiques.

L'animal reçoit de plus une dose de 1 ml de vaccin anticoquelucheux (PERTHYDRAL, Institut Pasteur) afin de potentialiser sa réponse immunitaire.

2) Rappels

- 15 jours après, le lapin reçoit en rappel, une dose émulsionnée (soit 1ml) en injections intradermiques multiples.

- 3 semaines après ce premier rappel, une autre dose émulsionnée est administrée dans les mêmes conditions.

- 3 semaines après ce deuxième rappel une autre dose est injectée, toujours dans les mêmes conditions.

- 1 mois après ce troisième rappel, par voie intraveineuse, une dose non

émulsionnée est injectée dans la veine marginale de l'oreille.

- les 5^{ème} et 7^{ème} jours suivant cette injection intraveineuse, l'animal est saigné à l'oreille. 30 ml de sang sont prélevés à chacune des saignées.

3) Reprise des rappels

Après un repos d'un mois, le lapin reçoit une dose émulsionnée administrée en injections intradermiques multiples. Un mois après cette série d'injections, une dose non émulsionnée est injectée par voie veineuse et l'animal est saigné comme précédemment cinq et sept jours après ce dernier rappel.

Les rappels sont repris de la même façon après des périodes de repos plus ou moins longues.

D - Conservation des immunosérums

Les IS sont stockés à - 20°C par petites quantités additionnées d'un volume égal de glycérine pure afin qu'à cette température les mélanges restent liquides et puissent être pipetés sans décongélation lors de leur emploi.

Certains lots sont aussi lyophilisés en ampoules de verre qui sont scellées après l'opération.

III - SPECIFICITE DES IMMUNSERUMS

La détection immunohistochimique d'une substance peut donner lieu à l'apparition d'artefacts de deux nature : des artéfacts de nature physicochimique (extraction ou diffusion de l'antigène tissulaire, adsorption des anticorps ou du marqueur) et des artéfacts de nature immunologique qui impliquent la reconnaissance de l'antigène par l'immunoglobuline spécifique.

Les tests de spécificité des IS qui ont été effectués font intervenir des réactions immunohistochimiques témoins - qui sont comparées aux réactions spécifiques - et radioimmunologiques (voir au IV, C).

IV - METHODES IMMUNOHISTOCHIMIQUES

Dans la mesure où l'antigène est immobilisé in situ, sa détection sur coupe histologique sera effectuée en plusieurs étapes.

A - La préparation des tissus

1) Fixation

a - perfusion

Le fixateur utilisé est le "picric acid formaldéhyde" (PAF) de STEFANINI et al. (1967) (cf. Note 2) injecté par perfusion.

L'animal est anesthésié et placé en décubitus dorsal. La cage thoracique est ouverte, le coeur, dégagé du péricarde, est mis à nu. Une petite incision est pratiquée à la pointe du ventricule gauche. Le coeur ainsi ouvert reçoit une canule qui est enfoncée profondément, de façon à ce que son bec débouche dans la lumière aortique. L'oreillette droite est coupée pour permettre l'évacuation du sang.

* remarque : pour éviter la présence d'éléments figurés du sang dans les vaisseaux irrigant le cerveau, le système circulatoire de l'animal est lavé par 100 ml de liquide physiologique perfusés avant passage de fixateur.

300 ml de PAF sont ensuite injectés à vitesse lente (15 mn).

b - dissection du cerveau

Une fois la perfusion terminée, l'animal est décapité et le cerveau est soigneusement disséqué, hypophyse attenante. Deux sections transversales, effectuées à main levée, éliminent bulbes olfactifs et lobes frontaux, alors que le tronc cérébral est sectionné en avant du cervelet. De plus, une section parasagittale est réalisée du côté n'ayant pas reçu la colchicine. Les surfaces résultant de ces sections faciliteront la pénétration du fixateur.

c - post-fixation et lavage des tissus

Le cerveau est ensuite post-fixé 1 H par immersion dans du PAF, puis lavé pendant 24H dans plusieurs bains de tampon de Coons (cf. note 3) à 20 p 100 de saccharose.

2) Inclusion

L'enrobage est réalisé par immersion des pièces dans du Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, Illinois) contenu dans une petite boîte confectionnée par pliage d'une feuille d'aluminium Albal.

3) Congélation

L'ensemble est plongé dans du méthyl-2-butane refroidi par l'azote

liquide. Les blocs congelés sont conservés au congélateur à - 80°C dans des boîtes de films photographiques.

4) Coupe et conservation des coupes

La coupe est effectuée au cryostat. Pour ce faire, le bloc congelé est démoulé et fixé sur la platine porte-objet du cryostat.

Des coupes de 12 um sont recueillies et collées sur des lames traitées à la gélatine alun de chrome (cf. Note 4).

En général, les blocs de cerveau donnent lieu à la récupération systématique de coupes adjacentes sériées qui sont recueillies sur des lames réparties en 10 séries. De cette façon on obtient sur chaque lame une image tous les 120 um, qui peut être comparée à une coupe adjacente sur une série voisine.

Une ou plusieurs séries de lames sont traitées le jour de la coupe, les autres étant conservées emballées dans du papier d'aluminium au congélateur à - 80°C.

Il est ainsi possible de disposer de nombreux échantillons d'un même animal, dont le séjour à basse température sauvegarde la majeure partie de l'immunoréactivité pendant plusieurs mois.

Ce procédé avantageux permet d'effectuer des contrôles et de comparer des immunoréactivités différentes sur des coupes adjacentes, régulièrement espacées et disponibles en grand nombre.

B - Réactions immunohistochimiques

C'est la méthode indirecte qui a été employée dans ce travail (COONS, 1978) (voir Fig. 1).

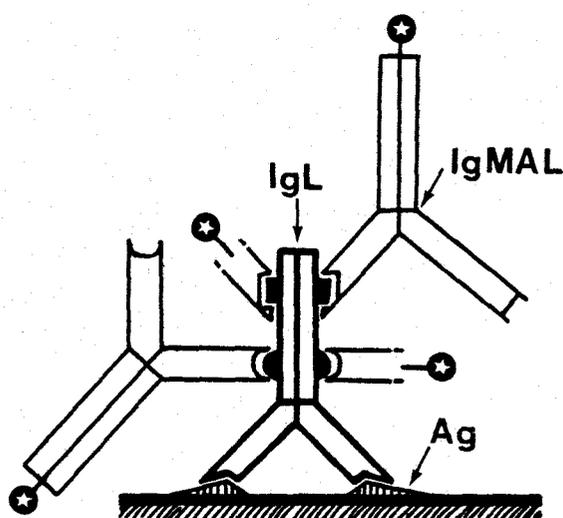


Fig. 1 : Réaction immunohistochimique indirecte.

Ig.L, immunoglobuline de Lapin spécifique de l'antigène tissulaire (Ag).

Ig.MAL, immunoglobuline marquée de Mouton anti-immunoglobuline de Lapin.

Elle s'effectue en deux étapes. L'IS spécifique de l'antigène recherché a été produit au laboratoire chez le Lapin. Le sérum utilisé comme révélateur a été produit chez le Mouton par immunisation contre les immunoglobulines de Lapin (IgL). Ce second sérum couplé au marqueur (l'isothiocyanate de fluorescéine ou la peroxydase de Raifort) est commercialisé par l'Institut Pasteur (Paris) et par BIOSYS (Compiègne).

L'utilisation de méthodes de visualisation du site de liaison antigène-anticorps réputées plus sensibles, comme le complexe PAP ou le complexe Avidine-Biotine, n'ont pas, entre nos mains, dépassé en qualité et finesse les marquages obtenus par l'utilisation simple d'un seul et unique anticorps marqué en deuxième et dernière étape.

1) Application du sérum spécifique

Les IS ont été appliqués à la dilution de 1/400 pendant 12 H ou dilués au 1/50 pendant 1 H à la température du laboratoire. Les dilutions des IS sont réalisées dans le tampon de Coons pH 7,2, et contenant 0,1 p. 100 de la protéine porteuse du peptide-antigène (HSA ou thyroglobuline) et 0,25 p.100 de TRITON X-100.

L'incubation des coupes se fait en atmosphère saturée en eau afin d'éviter toute évaporation.

Lorsque l'on veut comparer des réactions entre elles, des coupes adjacentes convenablement essorées sont recouvertes une à une par des dilutions d'IS différents.

2) Application du sérum marqué

L'incubation des coupes avec le sérum marqué est réalisée en des temps courts.

Deux sérums différents ont été utilisés.

a - sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF)

Il est appliqué après l'incubation par l'IS spécifique qui est suivie d'un rinçage dans le tampon de Coons (10 mn). Le sérum d'immunoglobulines de Mouton anti-Lapin (IgMAL) marquées par l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut Pasteur) est appliqué à la dilution de 1/40 dans du tampon de coons, pendant 60 mn à la température du laboratoire.

Les coupes sont ensuite rincées dans le même tampon, et sont montées dans un milieu glyciné (glycérol pur 9 vol./tampon 1 vol.). Ce montage peut être précédé d'une contre coloration des coupes au bleu Evans en solution à 1/10 000 dans le tampon de Coons (1 mn). Les lames sont examinées au microscope

équipé en fluorescence par réflexion.

b - sérum marqué à la peroxydase de Raifort

Ce sérum marqué est constitué de fractions Fab'2 d'immunoglobulines de Mouton-anti-Lapin couplées à la peroxydase (BIOSYS, Compiègne).

Durant toute cette dernière étape, les dilutions des anticorps marqués ainsi que les différents rinçages des lames avant et après incubation sont effectués dans du tampon de Coons à 0,05 p.100 de Triton X-100 sans adjonction d'azide de sodium. Cet antifongique provoque en effet une baisse considérable du marquage peroxydasique vraisemblablement due à une destruction progressive de l'activité de l'enzyme.

Il est appliqué à la dilution de 1/100 dans du tampon de Coons à 0,05 p.100 de TRITON X-100 sans azide, pendant 50 mn à 4°C pour plus de précautions.

Les coupes sont ensuite rincées une fois dans le même tampon et une fois dans l'eau distillée.

L'activité peroxydasique est ensuite révélée. Trois chromogènes différents sont employés : la 3,3'-diaminobenzidine tétra-HCl (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.), le 4-chloro-1-naphtol (Sigma), ou la 3-amino-9-éthylcarbazole (Sigma), donnant respectivement, un précipité brun, bleu profond ou rouge vif. Le substrat est l' H_2O_2 .

* - utilisation de la 3,3'-diaminobenzidine tétra-HCl (DAB) selon la technique de GRAHAM et KARNOVSKY (1966) :

50 mg de DAB sont dissous dans 100 ml de tampon TRIS 0,1M, pH 7,6 et additionnées de 0,003 p. 100 d' H_2O_2 .

Cette solution est appliquée sur les coupes pendant une minute environ. L'activité peroxydasique donne naissance à un précipité dont l'apparition sur la coupe est contrôlée au microscope. La révélation est stoppée par immersion des lames dans l'eau distillée. Les préparations sont alors déshydratées et montées avec une lamelle dans l'Eukitt (KINDER, R.F.A.).

* - utilisation du 4-chloro-1 naphtol (NAKANE, 1968)

40 mg de 4-chloro-1-naphtol sont dissous dans 0,5 ml de N,N-diméthylformamide (Merck, Darmstadt, R.F.A.) 100 ml de tampon TRIS 0,1 M pH 7,6 (cf Note 5), sont ajoutés, et le précipité floconneux qui se forme est éliminé par filtration. Le filtrat est utilisé après addition de 250 ul d' H_2O_2 à 110 volumes (ou 30%) soit une concentration finale en H_2O_2 de 0,075 p.100. Un précipité bleu-violet apparaît en quelques minutes. Celui-ci étant soluble dans

le toluène et le benzène, le montage de la préparation se fait avec une lamelle dans la glycérine diluée (glycérol pur 9 vol./tampon de Coons 1 vol.).

* utilisation de la 3-amino-9-éthylcarbazole (BOORSMA, 1984)

40 mg de 3-amino-9-éthylcarbazole sont dissous dans 0,5 ml de N,N-diméthylformamide. 100 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M pH 5 (cf. Note 6) sont ajoutés et le tout est filtré. Le procédé de révélation est ensuite identique à celui utilisé pour le 4-chloro-1-naphtol.

3) Utilisation de deux chromogènes différents pour la visualisation simultanée de deux antigènes sur une même coupe (BOORSMA, 1984)

Cette méthode est utilisable quand les deux antigènes ont une localisation différente.

Nous avons entre autres étudié ici la distribution des fibres nerveuses NPY-immunoréactives et des péricaryons à POMC dans le noyau arqué hypothalamique.

La première réaction immunohistochimique qui visualisera les fibres nerveuses doit être révélée en bleu par le 4-chloro-1 naphtol. La seconde réaction qui visualisera les péricaryons est révélée en rouge par la 3-amino-9-éthylcarbazole. Cette seconde réaction doit cependant être effectuée en des temps courts (2 H) afin d'éviter un affaiblissement du premier marquage. L'éventualité de réactions croisées entre l'anticorps marqué de la première étape et l'anticorps spécifique de la seconde étape ne peut conduire qu'au renforcement de la coloration bleue (qui deviendra violette) du premier marquage ce qui ne gêne en rien l'interprétation des images. Ceci est surtout vrai quand l'anticorps marqué est une immunoglobuline entière. L'avantage de l'utilisation dans cette séquence de la 3-amino-9-éthylcarbazole plutôt que de la DAB réside dans le fait que le précipité de DAB peut être très foncé et difficilement distinguable du précipité de 4-chloro-1-naphtol. D'autre part, le précipité de DAB dénature l'immunogénicité à ses sites de dépôts ce qui y interdit l'éventuelle démonstration de la colocalisation de deux antigènes dans un double marquage successif après élution des anticorps (voir au IV, B, 5).

4) Intensification argentique du précipité de la DAB

Certains neuropeptides sont abondants dans le SNC car ils sont contenus en quantités importantes dans un petit nombre de neurones. D'autres par ce qu'ils sont contenus en faible quantité dans un grand nombre de neurones. Cela semble être le cas de la CCK dont la détection immunocytochimique conduit souvent à des marquages faibles. Cette pauvre visualisation des structures

immunoréactives, qui peut bien entendu avoir d'autres causes encore, rend difficile l'établissement de cartographies complètes. Les marquages les plus sensibles ont été obtenus avec le 4-chloro-1-naphtol. Cependant, sa solubilité dans le toluène ne permet pas la déshydratation des coupes et leur conservation prolongée, comme cela est possible avec des coupes traitées à la DAB qui est toutefois moins sensible.

C'est pourquoi différentes techniques d'intensification des précipités colorés ont été mises au point. Nous avons utilisé ici la technique d'intensification argentique du précipité de DAB proposée par GALLYAS et al. (1982).

a - Principe

Des particules microscopiques d'argent se déposent sur les tissus et sont rendues plus volumineuses (mieux visibles) à l'aide d'un révélateur physique vis-à-vis duquel elles agissent comme des foyers réactionnels.

C'est un procédé physicochimique reproductible qui permet un bon contrôle de l'intensité de la coloration.

Le produit de polymérisation de la 3,3'-diaminobenzidine tetra HCl catalyse la réaction entre les ions d'argent (apportés par AgNO_3) et un agent réducteur (le formaldéhyde).

La coloration du fond de coupe est éliminée par suppression de l'activité catalytique du tissu (argyrophilie) par estérification (acide thioglycolique) ou par oxydation (acide perchlorique), ce qui n'élimine pas le pouvoir catalyseur du polymère de DAB.

La production de particules d'argent par le tissu lui-même est évitée par un pH alcalin optimum (pH 10,3) assuré par le carbonate de sodium (Na_2CO_3).

La formation de précipités insolubles d'hydroxyde d'argent ou de carbonate d'argent est empêchée par le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3).

Un développement trop rapide de la coloration est évité par l'acide tungstosilicique qui ralentit la réduction des ions d'argent.

b - Réalisation

Après rélévation classique à la DAB

1°) Traiter les coupes :

* pendant 4 h par une solution composée de :

Acide thioglycolique (= mercaptoacétique, $\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{H}$) concentré	20 ml
HCl concentré (37 p 100)	5 ml

H₂O distillée

75 ml

* ou toute la nuit par une solution d'acide perchlorique (HClO₄) à 20p.100.

2°) Trois bains d'H₂O distillée de 20 mn chacun sous agitation.

3°) Un bain dans un révélateur physique jusqu'à l'obtention de la teinte désirée (contrôle au microscope).

Le révélateur physique est composé de deux solutions (A et B) stockables à température ambiante (solution B à l'obscurité), pendant plusieurs mois. Celles-ci sont mélangées de façon équivolument immédiatement avant l'emploi et le mélange est agité vigoureusement.

* solution A :

- Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃) 50 g
- H₂O distillée 1 000 ml

* solution B : dissoudre dans l'ordre ci-dessous, dans 1 000 ml d'H₂O distillées,

- Nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) 2,0 g
- Nitrate d'argent (Ag NO₃) 2,0 g
- Acide tungstosilicique sec (H₄ (Si(W₃O₁₀)₄ , nH₂O) 10,0 g
- Formaldéhyde à 37 p. 100 5 ml

4°) arrêter la réaction par trois bains d'acide acétique à 1 p.100 de 10 mn chacun.

Si la teinte obtenue est jugée trop faible, il est toujours possible de replonger les lames dans le révélateur physique. La réaction redémarre.

5) Réactions immunohistochimiques successives avec élution des anticorps (TRAMU et al., 1978)

La mise en évidence de plusieurs antigènes différents dans une même structure par des réactions immunohistochimiques successives utilisant des anticorps spécifiques produits dans la même espèce donne lieu à des réactions croisées entre les différentes immunoglobulines spécifiques et marquées (Fig. 2) qui rendent impossible l'interprétation des marquages.

Il s'agit donc d'éliminer, entre chacun des marquages successifs, à la fois le précipité coloré et le complexe immunologique précédemment formé.

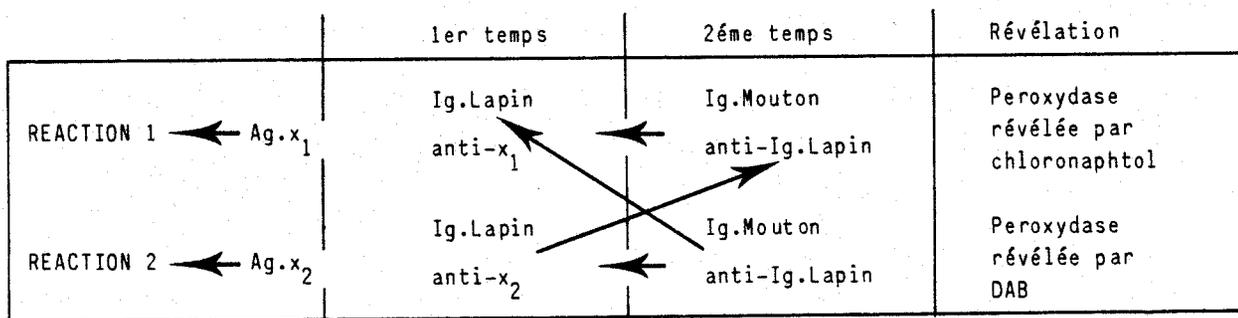


Fig 2 : Comportement des immunoglobulines en cas de double réaction sans élution.

La flèche indique la liaison qui représente la principale source d'erreur.

La flèche en pointillé indique une liaison moins probable.

a - principe

Le premier antigène (Ag1) est révélé et le marquage est photographié. Les coupes sont ensuite décolorées et subissent le traitement d'élution des anticorps fixés. Une seconde réaction immunohistochimique est ensuite effectuée qui révélera le second antigène (Ag2). Ce nouveau marquage est photographié et comparé au premier.

b - réalisation

- Ag1 révélé par la méthode indirecte et le 4-chloro-1-naphtol donnant un précipité bleu,
- montage des lamelles à la glycérine,
- microphotographies,
- démontage des lamelles,
- lames plongées dans de l'eau contenant 10 p.100 d'acétone, puis passage dans l'acétone pure (ces traitements éliminent totalement le précipité bleu),
- les coupes ramenées dans l'eau sont ensuite plongées sous légère agitation pendant 1 mn dans le mélange composé de 1 volume de $KMnO_4$ à 2,5 p.100, 1 volume de H_2SO_4 à 5 p.100, et un nombre variable de volumes d' H_2O distillée, ce dernier dépendant de l'affinité de l'anticorps pour l'Ag1 (ce traitement élue tous les anticorps de la coupe).

* à titre d'exemples, voici les concentrations du mélange permanganate-sulfurique suffisantes pour rompre la fixation des différents anticorps sur la coupe :

- . anticorps de l'IS 15/8 ou 86 : $(KMnO_4 + H_2SO_4) = (1+1) \text{ vol.}/H_2O = 400 \text{ vol.}$
- . anticorps de l'IS 81 : $(1+1) \text{ vol.}/200 \text{ vol.}$

- . anticorps de l'IS 20 (1+1) vol./100 vol.
- . anticorps de l'IS 12 (1+1) vol./ 80 vol.

- la légère teinte brune est éliminée par un bain rapide dans le métabisulfite de Sodium à 0,5 p.100,
- les lames sont amenées dans l'eau puis dans le tampon et prêtes pour la deuxième réaction,
- l'Ag 2 révélé par la méthode indirecte et l'un des deux chromogènes (DAB ou chloronaphtol).

Remarque : La révélation de la peroxydase dans la première réaction doit impérativement se faire avec le chloronaphtol. En effet, si le précipité bleu est facilement soluble dans les solvants organiques, celui que donne la DAB ne l'est pas.

c - Contrôle de l'efficacité de l'élution

Afin de savoir si tous les anticorps ont bien été élués, les coupes ayant subi le traitement sont soumises à une réaction immunohistochimique complète où l'immunsérum spécifique est remplacé par un sérum de Lapin non-immun. Ce protocole est le seul qui permette de savoir à la fois, si des sites non spécifiques d'absorption sont apparus, et si l'anticorps marqué est réellement éliminé.

C - Spécificité de la réaction immunohistochimique

Il s'agit de vérifier la spécificité des réactions : Ag-IgL et (Ag-IgL)-IgMAL.

Pour ce faire, des tests immunohistologiques et radioimmunologiques sont effectués.

1) Les tests immunohistologiques

Ils permettent de savoir si la réaction obtenue sur la coupe est due ou non à la détection de l'antigène recherché.

Chaque étape de la réaction immunohistochimique est éprouvée.

a - Spécificité de l'immunsérum de la première étape :

Elle est testée en effectuant une réaction immunohistochimique classique où la dilution d'IS utilisée en première étape est remplacée par une

dilution de ce même IS absorbé par l'antigène homologue ou par divers antigènes hétérologues.

Cette absorption en phase liquide de l'immunsérum spécifique est réalisée de la façon suivante :

- plusieurs dilutions identiques et de même volume de l'IS spécifique sont absorbées pendant au moins 12 H par des concentrations croissantes de l'antigène synthétique homologue ou hétérologue.

- chacune d'entre elles servent à incuber des coupes adjacentes qui subissent ensuite une réaction immunohistochimique classique. Le marquage est ou n'est pas éteint.

A titre d'exemple, nous détaillons ci-après le protocole des absorptions homologues et hétérologues des immunsérums 81 et 12 :

- les IS 81 (anti-hGHRF 1-44 NH₂) et 12 (anti-NPY) ont chacun été absorbés par du hpGHRF1-44NH₂ (Pm = 5.040,40 g), par du rGHRF1-430H (Pm = 5.232,63 g) ou par du pNPY (Pm = 4.254,21 g), ajoutés en dix doses de 0,5 ug à 5 mg/ml de sérum pur.

- on dispose donc ainsi pour chaque IS, de trois fois dix dilutions identiques contenant du hGHRF 1,98.10⁻³ à 7,94.10⁻⁸M, ou du rGHRF 1,91.10⁻³ à 9,55.10⁻⁸M, ou du pNPY 2,35.10⁻³ à 11,75.10⁻⁸M.

- utilisées sur coupes adjacentes de cerveau de Rat dans une réaction immunohistochimique par ailleurs classique, elles nous ont permis de constater que :

* le marquage de l'IS 81 :

- . est aboli par une concentration du hGHRF1-44 NH₂ comprise entre 3,26 et 7,72.10⁻⁶M.
- . est aboli par une concentration de rGHRF1-430H comprise entre 2,95 et 5,90.10⁻⁵M.
- . n'est pas affecté par du pNPY 2,35.10⁻³M.

* le marquage de l'IS 12 :

- . est aboli par une concentration de pNPY comprise entre 5,90 et 11,80.10⁻⁴M.
- . n'est affecté ni par du hGHRF1-44NH₂ 1,98.10⁻³M ni par du rGHRF1-430H 1,91.10⁻³M.

Ces résultats témoignent donc de la spécificité des marquages immunohistochimiques obtenus sur coupe grâce aux IS 81 et 12.

L'extinction du marquage de l'IS 81 produite par le rGHRF1-430H nous permet de plus de conclure que les IgG spécifiques de l'IS 81 sont dirigés contre des épitopes communs au hGHRF1-44 NH₂ et au rGHRF1-430H. En d'autres

termes, elles reconnaissent une ou plusieurs séquences identiques dans les molécules d'origine humaine et murine.

Des expérimentations similaires ont été effectuées avec les IS 15/8, 86, 81 et 12 sur des coupes de cerveau en utilisant les antigènes synthétiques suivants : CCK-8 et CCK-8ns, hG17I, hGHRF1-44 NH₂, pNPY et Neurotensine humaine. Les résultats de ses absorptions démontrent que les différents antisérums ne reconnaissent que le peptide synthétique homologue ou fortement apparenté. Les marquages 15/8 et 86 sont tous deux abolis par le CCK-8, le CCK-8NS et la hG17 I, comme le laisse prévoir la très forte homologie structurale touchant la portion C-terminale de ces molécules.

D'autre part, l'éventualité théorique de la reconnaissance par le sérum du Lapin d'une autre catégorie d'antigènes tissulaires ou de son absorption aspécifique sur la coupe est testée en remplaçant l'IS par du sérum de lapin non-immun, ou mieux, par le sérum pré-immun du lapin producteur. La poursuite de la réaction ne doit donner lieu à aucun marquage.

b - Spécificité du composé marqué

Elle est éprouvée par l'incubation directe des coupes (sans application préalable de l'IS spécifique) par la dilution classiquement employée d'Ig MAL. Aucune immunoréactivité ne doit être détectée.

c - Spécificité de la réaction enzymatique

L'existence très improbable d'une activité peroxydasique endogène est testée en effectuant la réaction immunohistochimique complète en remplaçant les dilutions des sérums spécifiques et marqués par le tampon de dilution. La révélation est faite en respectant les conditions classiques. L'examen microscopique des tissus ne doit pas révéler l'apparition de précipité coloré. Le cas échéant, certains auteurs préconisent le traitement préalable des coupes par une forte dilution d'H₂O₂ avant la réaction immunohistochimique (0,5 p. 100 pendant 2 H).

2) Les tests radioimmunologiques

Certaines des colocalisation entre peptides que nous avons observé ici nous ont conduits à préciser dans un système radioimmunologique la spécificité de certains de nos IS.

Les caractéristiques immunologiques des IS anti-CCK-8 ont été rapportées par J.M. STUDLER en 1985 et sont reproduites ici dans le Tableau N° 2.

Les caractéristiques immunologiques de l'IS 81 sont décrites dans le

Tableau N° 3. Les résultats des tests montrent que l'IS 81 ne reconnaît ni le pNPY ni la somatostatine (1-28). Les fragments 1-29NH₂ et 30-44NH₂ du hGHRF déplacent la radioactivité fixée à des concentrations élevées uniquement, mais avec une pente plus faible que le hGHRF 1-44NH₂. Les coefficients de réactions croisées à 50% de liaison ont été calculés en concentration molaire et sont de 0,02% pour le hGHRF 1-29NH₂ et de 0,07% pour le hGHRF 30-44NH₂.

L'IS anti-NPY (IS 12) ne reconnaît pas le hGHRF 1-44NH₂.

Peptides	AS 15/8	AS 86
CCK-8	100%	100%
CCK-8ns	233%	132%
CCK-4	non parallèle	8%
CCK-33	11%	NT
hGH17I	204%	600%

Tableau 2 : Réactivités croisées des différents peptides apparentés à la CCK par rapport au CCK-8 synthétique vis-à-vis des IS 15/8 et 86.

NT, non testé

non parallèle, courbe de dilution non parallèle à celle du CCK-8, le calcul des coefficients de réaction croisée est impossible.

De plus, aucune réaction croisée n'a été observée avec les peptides suivants, testés à des concentrations allant jusqu'à 10⁻³M = secrétine, glucagon, Leu- et Met-enképhaline, - et β-endorphine, FMRF-amide, somatostatine, substance P, (1-24) ACTH, (17-39) ACTH, et -MSH.

Références : STUDLER et al., 1984; STUDLER, 1985.

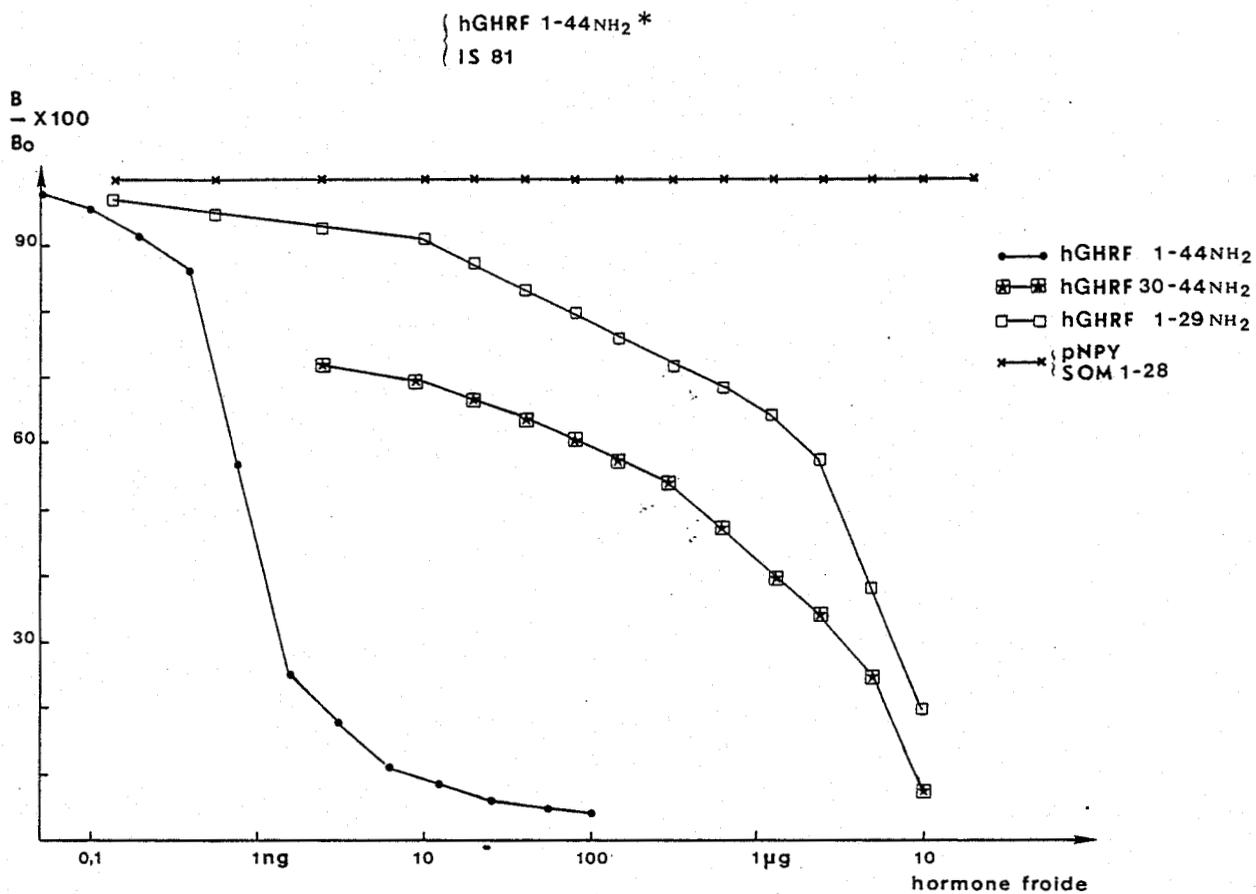


Tableau 3 : Déplacement du hGHRF 1-44NH₂ marqué (hGHRF 1-44NH₂^{*}) fixé à l'IS 81 par le hGHRF 1-44NH₂, ses fragments N-t (hGHRF 1-29NH₂) et C-t (hGHRF 30-44NH₂, le NPY porcine (pNPY) et la somatostatine (SOM 1-28) non marqués.

Le hGHRF 1-44NH₂ est marqué à l'¹²⁵I. En l'absence de toute hormone froide, l'IS 81, utilisé à la dilution de 1/640000, fixe 50% du hGHRF 1-44NH₂ marqué.

B, radioactivité liée aux anticorps en présence d'hormone froide.
 Bo, radioactivité liée aux anticorps en l'absence d'hormone froide.

NOTES

Note 1

Tampon phosphate 0,1M, pH 7,2

H₂O distillée.....100 ml
Na₂HPO₄ anhydre.....1,07 g
NaH₂PO₄, 2H₂O.....0,39 g

Note 2

Préparation du PAF

- 20 g de paraformaldéhyde sont dissous dans 150 ml d'acide picrique saturé (on procède à 60°C et en milieu basique par adjonction de NaOH 1N).
- le mélange obtenu est complété à 1 litre par du tampon phosphate (1) 0,1M pH 7,4, ce qui porte la concentration finale de paraformaldéhyde à 2%.

Note 3

Tampon de Coons dilué

- 5 litres d'eau distillée
- véronal sodique 20,6 g
- NaCl 85 g
- HCL normal 80,6 ml

La solution est diluée de moitié au moment de l'emploi.

Note 4

Obtention des lames gélatinées

Les lames soigneusement nettoyées et placées en paniers à coloration, sont plongées dans l'eau puis égouttées sans être séchées. Les paniers sont immergés quelques secondes dans une solution préparée à environ 60°C contenant pour 100 ml d'eau, 0,05 g d'alun de chrome et 0,5 g de gélatine. Les lames égouttées et séchées à l'étuve peuvent être conservées à - 20°C.

Note 5

Composition du tampon TRIS 0,1M, pH 7,6

- TRIS (hydroxyméthyl) aminométhane 12 g
- HCl normal 83 ml
- 1 litre d'eau distillée

PREMIERE PARTIE

Immunohistochimie de la cholecystokinine dans le système nerveux

central du Cobaye

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Historique

La cholécystokinine-pancréozymine (CCK-PZ) est une hormone polypeptidique de l'axe gastroentéropancréatique, qui présente de façon combinée les propriétés qui ont été attribuées à deux substances initialement considérées comme différentes. La première est la cholecystokinine (CCK), isolée originellement de la muqueuse duodénale de porc par IVY et OLBERG en 1928. La CCK agit principalement sur la contraction de la vésicule biliaire (OKADA et al., 1914 ; IVY, 1928 ; IVY et OLBERG, 1928). La seconde est la pancréozymine, dont l'action sur la sécrétion enzymatique pancréatique fut démontrée par HARPER et RAPER en 1943.

Ce n'est qu'en 1968 que MUTT et JORPES identifièrent chimiquement la CCK-PZ comme un peptide de 33 acides aminés (CCK-33) dont ils donnèrent partiellement la structure, et auquel ils reconnurent à la fois l'activité de la cholécystokinine et celle de la pancréozymine (voir bibliographie dans MUTT, 1979).

Il apparut alors que la CCK-PZ (ou plus simplement CCK) partage le même pentapeptide carboxyterminal (C-t) avec la gastrine, la caeruleine et la phyllocaeruleine (voir bibliographie dans REHFELD, 1981a).

Or, plusieurs équipes démontrèrent que cette portion C-t joue un rôle essentiel dans l'activité biologique aussi bien de la CCK (ONDETTI et al., 1970; REHFELD et al., 1980) que de la gastrine (TRACY et GREGORY, 1964 ; AMER, 1969), ce qui suggère, comme le proposent LARSSON et REHFELD (1977), une évolution de ces deux hormones à partir d'un ancêtre moléculaire commun apparenté à la caeruleine (voir bibliographie dans DOCKRAY, 1979 ; VIGNA, 1985; VIGNA et al., 1986). Enfin, ces deux peptides existent sous une forme sulfatée et non sulfatée, cette dernière étant moins active (CHOWDURY et al., 1976 ; voir bibliographie dans REHFELD, 1981b).

Bien que l'homologie structurale touchant CCK et gastrine limite la précision des méthodes immunochimiques, ce sont elles qui permirent la détection de peptides apparentées à ces hormones dans le système nerveux central (SNC).

C'est ainsi qu'en 1975 VANDERHAEGHEN et al. signalèrent au sein du SNC de Vertébrés (dont l'Homme) la présence d'une protéine réagissant avec des anticorps dirigés contre la gastrine, et dont la substance grise du cortex cérébral est très riche.

Une année plus tard, l'emploi de six anti-sérums différents dans le dosage radioimmunologique d'extraits de cerveau de plusieurs Vertébrés, permit à DOCKRAY (1976) d'identifier ce peptide comme apparenté à la cholécystokinine, essentiellement représentée par son octopeptide C-t sulfaté ou CCK-8 (DOCKRAY et al., 1978 ; ROBBERECHT et al., 1978).

La CCK rejoint ainsi, entre autres, la substance P, la somatostatine, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et la neurotensine dans le groupe des peptides neurodigestifs étayant le concept de cellule APUD (voir bibliographie dans PEARSE et TAKOR TAKOR, 1979).

Parallèlement, un (ou des) peptide (s) apparenté (s) à la "CCK-gastrine" furent détectés dans de nombreuses espèces d'Invertébrés (ENGELHARDT et al., 1982 ; voir bibliographie dans DHAINAUT-COURTOIS et al., 1985 ; ANDRIES et al., 1985).

D'autre part, la production d'anticorps dirigés contre la partie C-t de la CCK-33 porcine (REHFELD, 1978a) permit de montrer la présence de la molécule complète de 33 acides aminés (AA) ainsi que d'un ou plusieurs de ses fragments immunoréactifs chez plusieurs Vertébrés (VANDERHAEGHEN et al., 1975, DOCKRAY, 1976 et 1978 ; LARSSON et REHFELD, 1977 ; MULLER et al., 1977 ; REHFELD, 1978b ; HOLMQUIST et al., 1979 ; EMSON et al., 1982 ; BEINFELD et al., 1983 ; voir bibliographie dans BEINFELD, 1983 ; ADRIAN et al., 1985 ; BACCARESE-HAMILTON et al., 1985 ; GOLDMAN et al., 1985 ; REINER et BEINFELD, 1985).

Différents laboratoires démontrèrent aussi l'existence d'un peptide apparenté à la gastrine dans l'encéphale, de Mammifère (voir bibliographie dans REHFELD et al., 1984 ; DOCKRAY et al., 1985 ; WILLIAMS et al., 1986), mais dont la distribution est restreinte alors que la CCK semble largement distribuée.

Les différents systèmes de dosage radioimmunologique s'accordent tous à définir la CCK comme un des peptides les plus abondants du SNC. Dans le cerveau de Mammifère, ce sont les structures télencéphaliques (cortex frontal et pariétal) et limbiques (hypothalamus) qui en sont les plus riches (VANDERHAEGHEN et al., 1975 ; SIMON-ASSMAN et al., 1983). Au sein du SNC, la CCK se répartit donc en un gradient rostrocaudal.

La CCK neurotransmetteur

L'étude de la biochimie de la CCK révèle une remarquable hétérogénéité moléculaire.

Dans le génome, le gène codant pour la CCK existe en une copie unique transcrite identiquement, dans le SNC et le TD, en un ARNm d'environ 850 nucléotides. Celui-ci est traduit en un précurseur polypeptidique ou pré-pro-CCK de 114-115 AA, dont le métabolisme post-traductionnel peut conduire à la libération de plusieurs formes moléculaires de longueur variable portant ou non la séquence biologiquement active Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ à leur extrémité C-terminale (GUBLER et al., 1984 ; DESCHENES et al., 1985a et b ; FRIEDMAN et al., 1985 ; TAKAHASHI et al., 1985 ; LUND et al., 1986).

Conformément aux sites de coupure présumptifs de la pré-pro-CCK, représentés par des singlets ou doublets de résidus basiques, ainsi qu'en accord avec les données de chromatographie analytique, ces formes moléculaires ont 58, 39, 33, 25, 18, 12, 8, 7, 5 ou 4 AA (MUTT et JORPES, 1971 ; REHFELD, 1978b, 1980 et 1985 ; ENG et al., 1982 et 1983 ; EYSSELEIN et al., 1982 et 1984 ; JANSEN et LAMERS, 1983 ; TATEMOTO et al., 1984 ; REEVE et al., 1986 ; REHFELD et HANSEN, 1986).

Les grandes formes moléculaires (CCK-58, CCK-39 et CCK-33) auraient une activité faible et une durée de vie longue (ONDETTI, 1970 ; WALSH, 1975).

Les petites formes (CCK-12, CCK-8 et CCK-4) seraient trois à quatre fois plus actives que leurs homologues longue-chaîne (REHFELD et al., 1980).

Grandes et petites CCK seraient accompagnées dans la cellule par les fragments N-t et C-t résultant du clivage de la préproCCK à leur libération (RYDER et al., 1981 ; ENG et al., 1982 et 1983 ; BEINFELD, 1985a et b ; LLOYD et BEINFELD, 1985 ; REHFELD et HANSEN, 1986 ; VARRO et DOCKRAY, 1986).

La plus grande partie de la CCK neurale est sous la forme de CCK-8 (voir bibliographie dans BERESFORD et al., 1986), supposée intervenir dans des événements synaptiques comme un neuromodulateur ou un neurotransmetteur.

La présence de CCK (ou d'un peptide immunoréactif qui lui est apparenté) à l'intérieur des neurones fut démontrée pour la première fois par STRAUS et al., (1977) à l'aide de techniques immunohistochimiques. Ces travaux furent confirmés par de nombreux auteurs (INNIS et al., 1979 ; LOREN et al., 1979a ; VANDERHAEGHEN et al., 1980a et 1985) et les données neuromorphologiques qu'ils obtinrent corroborèrent les estimations radioimmunologiques menées parallèlement.

Cette CCK neurale est endogène (SIEGEL et YOUNG, 1985) : les régions corticales et subcorticales effectuent une synthèse active de CCK intacte qui est ensuite clivée en ses fragments les plus abondants (CCK-8 et CCK-4) (GOLTERMAN et al., 1980 a et b ; GOLTERMAN, 1985).

Le métabolisme post-traductionnel conduisant aux différentes CCK fut examiné par plusieurs auteurs qui mirent en évidence dans le cortex cérébral diverses activités enzymatiques (non dues à la trypsine endogène) convertissant la CCK-33 en CCK-12 et en CCK-8, sans toutefois recéler de spécificité hormonale stricte (STRAUS et al., 1978 ; MALESCI et al., 1980 ; RYDER et al., 1980). La localisation intracellulaire de ces enzymes n'est pas définitivement établie (STENGAARD-PEDERSEN et al., 1984).

Cependant, l'étude immunohistochimique de fractions synaptosomales d'homogénats de tissu cortical de rat, réalisée par PINGET et al. (1978) permit la localisation de CCK dans les vésicules des terminaisons nerveuses. Ces mêmes auteurs induisirent l'exocytose calcium-dépendante de la CCK vésiculaire par le potassium (PINGET et al., 1979). Plus tard, il fut démontré que le matériel immunoréactif excrété est en majeure partie constitué de CCK-8 (DODD et al., 1980 ; EMSON et al., 1980).

Synthétisée de novo, la CCK neurale (principalement les CCK-8 et CCK-4) s'accumule dans les vésicules synaptosomales, qui, convenablement stimulées en réalisent la cession (GOLTERMAN et al., 1981).

Par ailleurs, des expérimentations menées chez divers animaux conduisirent à l'identification de sites de liaison neuroniques spécifiques des CCK, différents des sites de liaison pancréatiques, et dont la distribution concorde avec les données morphologiques de l'immunohistochimie (voir bibliographie dans GAUDREAU et al., 1983). Le plus puissant ligand de ces récepteurs présumés est l'octopeptide C-t sulfaté (STEIGERWALT et WILLIAMS, 1984).

Plusieurs travaux montrèrent que des fragments membranaires de neurones sont capables de dégrader la CCK (DODD et al., 1980 ; DESCHODT-LANCKMAN et al., 1983). Cette faculté exercée par les membranes synaptiques démontre l'existence d'un mécanisme enzymatique de dégradation rapide de la CCK après exocytose (DESCHODT-LANCKMAN et al., 1984 ; DESCHODT-LANCKMAN, 1985 ; STEARDO et al., 1985 ; ZUZEL et al., 1985 ; DURIEUX et al., 1986).

Appliquée iontophorétiquement, la CCK exogène est capable de modifier l'activité électrique de neurones, et mime donc l'effet d'un neurotransmetteur (voir bibliographie dans KELLY et BROOKS, 1984).

De plus, la mise en évidence de la coexistence, dans un même neurone, de CCK avec un neurotransmetteur vrai (HOKFELT et al., 1980a et b ; HENDRY et al.,

1984; SOMOGYI et al., 1984 ; STUDLER et al., 1984 ; KOSAKA et al., 1985 ; LOOPUIJT et VAN DER KOOY, 1985), ou de CCK avec un peptide (VANDERHAEGHEN et al., 1981a ; SKIRBOLL et al., 1982 ; MARTIN et al., 1983 ; SUGIMOTO et al., 1985; CIOFI et TRAMU, 1986a, b et c ; MEZEY et al., 1986 ; GALL et al., 1987 ; JU et al., 1987), suggère l'intervention de cette molécule dans la modulation de l'action des neuromédiateurs (SKIRBOLL et al., 1981 ; HOMMER et al., 1986 ; LANE et al., 1986 ; YAKSH et al., 1987).

Parallèlement, la CCK présente un certain nombre de propriétés physiologiques et neuropharmacologiques. Des injections centrales de CCK modifient, par exemple, les schémas classiques de prise alimentaire ainsi que diverses attitudes comportementales (voir bibliographie dans MORLEY 1982, dans FINKELSTEIN et al., 1984 et dans ZADINA et al., 1986).

D'autre part, la CCK est capable de moduler les sécrétions antéhypophysaires, in vitro comme in vivo (voir bibliographie dans MORLEY, 1982 et dans MARLEY et al., 1984a), et est contenue dans des systèmes neuroniques hypophysiotropes qui certainement la libèrent dans le sang porte (ANHUT et al., 1983 ; MEZEY et al., 1986).

La grande quantité de CCK présente dans le cortex cérébral (VANDERHAEGHEN et al., 1975), sa synthèse à partir de précurseurs (ENG et al., 1982) dans le tissu nerveux (GOLTERMAN et al., 1980a), et plus précisément dans des neurones (STRAUS et al., 1977) où elle est concentrée dans des vésicules (PINGET et al., 1978 ; GOLTERMAN et al., 1981), sa libération par exocytose après stimulation adéquate (PINGET et al., 1979), sa capacité d'interaction spécifique avec des récepteurs neuroniques (SAITO et al., 1980), ses activités électrophysiologiques (OOMURA et al., 1978), et enfin, l'existence d'un mécanisme local d'inactivation après sa cession (DESCHODT-LANCKMAN et al., 1983), sont autant d'observations qui plaident en faveur du rôle synaptique de la CCK neurale.

Toutefois, malgré une connaissance croissante de son métabolisme, de sa distribution et de ses influences locales dans le SNC, les fonctions de la CCK neurale ne sont pas établies. De par la variété des mécanismes dans lesquels il est impliqué, ce neuropeptide peut être considéré comme un neurotransmetteur ou au moins comme un neuromodulateur.

De nombreuses études immunohistochimiques ont bien documenté la distribution de la CCK dans le SNC (VANDERHAEGHEN, 1985). Cependant, celles-ci furent essentiellement menées chez le Rat, seule espèce pour laquelle une central (SNC).

L'étude immunohistochimique comparative de la distribution de la CCK dans le SNC de diverses espèces fait pourtant apparaître des différences interspécifiques frappantes (REHFELD et al., 1984 ; CIOFI et TRAMU, 1985 et 1986a ; SUGIMOTO et al., 1985 ; WAHLE et ALBUS, 1985 ; MICELI et al., 1987 ; voir aussi MANTYH et MANTYH, 1985). Nous pensons que leur recensement et l'analyse de leur signification sont des étapes fructueuses et indispensables à l'élucidation des rôles de la CCK neurale.

La première partie du présent mémoire propose une cartographie de la distribution des neurones "CCKergiques" dans le diencéphale et les régions adjacentes du SNC du Cobaye tricolore (Cavia porcellus L.). Cet animal, quoiqu'étant un modèle souvent utilisé, demeure peu étudié à cet égard. Comme nous le montrons ici, cette espèce s'écarte en plusieurs points des descriptions faites chez le Rat, et c'est à l'un de ceux-ci que nous consacrons la seconde partie de notre exposé.

RESULTATS

RESULTATS

La portion du SNC que nous avons examinée s'étend de l'aire septopréoptique au faisceau habénulo-interpédunculaire. Elle comprend donc le diencéphale et les structures télencéphaliques qui lui sont adjacentes: le cortex, l'amygdale, les ganglions de la base, le septum, le complexe hypothalamo-hypophysaire et le thalamus. C'est dans cet ordre que nous décrirons la distribution de l'IR-CCK dans le SNC du Cobaye, sans toutefois nous intéresser aux formations hippocampiques déjà bien étudiées par ailleurs (KOHLER et CHAN-PALAY, 1982 ; GALL, 1984).

I - NOMENCLATURE ANATOMIQUE

Nos observations concernant la distribution des structures CCK-I ont été rapportées schématiquement sur des dessins tirés de l'atlas du SNC du Cobaye que nous avons établi au laboratoire. En ce qui concerne les structures télencéphaliques et septopréoptiques, notre terminologie effectue un compromis entre les appellations données par G. PAXINOS et C. WATSON (1982) chez le Rat et par T.N. JOHNSON (1957) et P. POULAIN (1974) chez le Cobaye. Les subdivisions nucléaires du complexe amygdalien sont celles rapportées par E. HALL et F.A. GENESER-JENSEN (1971) chez le Cobaye. Pour l'hypothalamus, nous avons utilisé les travaux de T.J. LUPARELLO et al. (1964) et ceux de P. POULAIN (1974) chez le Cobaye. Pour l'organisation anatomique du thalamus, nous nous sommes référés aux descriptions de G. PAXINOS et C. WATSON (1982) chez le Rat et à celles de A. HESS (1955) et J.S. TINDALL (1965) chez le Cobaye.

II - GENERALITES

Les marquages obtenus concernent les structures nerveuses. Dans le neurone, l'IR-CCK est surtout observée dans l'axone et le corps cellulaire, alors que l'appareil dendritique demeure le plus souvent immunonégatif. Dans le corps cellulaire, le marquage apparaît finement granulaire et diffus, réparti dans l'ensemble du cytoplasme. La zone nucléaire est toujours non marquée.

Chez l'animal normal, l'IR-CCK est détectée dans de nombreuses fibres et terminaisons nerveuses distribuées dans l'ensemble du SNC. Quelques péricaryons faiblement marqués sont aussi observés dans les régions télencéphaliques

(cortex, amygdale). La visualisation du plus grand nombre des neurones producteurs de matériel CCK-I nécessite l'emploi du traitement par la colchicine. Ce dernier n'altère en rien la distribution des prolongements nerveux immunoréactifs observés chez l'animal normal et permet de plus, de mettre en évidence de nombreux corps cellulaires dans le diencephale, et de renforcer le marquage des neurones corticaux.

Nos descriptions font la somme d'observations effectuées chez des animaux traités et non traités.

D'une façon générale, bien que les structures marquées soient abondantes dans le SNC, leur immunoréactivité anti-CCK est souvent modérée. Leur bonne visualisation nécessite l'emploi de techniques d'intensification du marquage immunocytochimique.

Les deux immunsérums dirigés contre l'octopeptide C-t de la CCK qui ont été utilisés ici donnent les mêmes marquages dans l'ensemble du SNC excepté dans le noyau arqué hypothalamique. Dans cette région, l'IS 86 (anti-CCK-8 sulfaté) ne marque pas de corps cellulaires. L'IS 15/8 (anti-CCK-8 non sulfaté) y visualise une vaste population neuronique. Des différences de marquage entre les IS 86 et 15/8 ailleurs dans le système limbique concernent des fibres nerveuses qui représentent probablement les projections de ce système, comme nous le discuterons dans la seconde partie de ce travail.

III - AIRES CORTICALES

Le cortex est riche en structures immunoréactives. Celles-ci sont plus abondantes dans les aires temporales et striées (Pl.Ib et c), et dans le cortex rétrospécial en général, que dans les régions les plus frontales (Pl.Ia).

Les fibres et terminaisons nerveuses à IR-CCK sont préférentiellement distribuées dans les couches II-III et VI. Superficiellement, ces fibres sont orientées en tous sens. Des arrangements apparemment périsonomatiques d'éléments punctiformes marqués y sont fréquemment observés (Pl.ic et f). Dans les couches IV et V, la densité en prolongements nerveux immunoréactifs est plus faible. On y rencontre toutefois des axones cheminant perpendiculairement à la surface corticale, souvent dans toute l'épaisseur d'une couche. Dans la couche VI, la majorité des fibres variqueuses marquées présente une orientation parallèle au corps calleux, dans lequel des tronçons d'axones CCK-I sont visibles. Des fibres intra-callosales marquées sont constamment observées dans le cingulum. Dans ses radiations, et sur toute l'étendue rostrocaudale du cortex, d'abondants prolongements nerveux très variqueux et de gros calibre se

distribuent en éventail dans le cortex pariétal et cingulaire (A1-9).

De nombreux péricaryons CCK-I sont présents dans le néocortex. Ces cellules sont absentes de la couche I. Il s'agit de neurones bipolaires et multipolaires dans les couches II-III, et en majorité de cellules multipolaires dans les autres couches (Pl.Ib, d et e). Quelquefois, les arborisations dendritiques des neurones multipolaires peuvent être suivies sur de courtes distances. L'orientation apparente de ces cellules varie, alors que les cellules bipolaires sont généralement orientées leur grand axe perpendiculaire à la surface piale du cortex. De très rares neurones faiblement marqués d'aspect pyramidal ont été observés dans la couche V du cortex pariétal.

Le claustrum présente une immunoréactivité semblable à celle des couches corticales profondes. Sa caractéristique la plus remarquable est la présence de fibres variqueuses CCK-I qu'il est possible de suivre de la capsule externe au neuropile. Des passages de fibres marquées entre les couches profondes du cortex et le corps calleux sont bien visibles dorsalement dans le toit du claustrum.

Quelques rares corps cellulaires circulaires et modérément immunoréactifs sont présents dans le claustrum, essentiellement dans sa portion caudale (A7,8 et 9).

Le gyrus cingulaire présente de nombreuses fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives dont la distribution rappelle ce qui est observé ailleurs dans le cortex. Des densités plus fortes de terminaisons marquées sont présentes dans l'induseum griseum. Comme le néocortex, le cortex cingulaire semble donner naissance à (ou recevoir de la part du cingulum) de grosses fibres nerveuses fortement immunopositives (A1-9).

La densité en éléments immunoréactifs du cortex insulaire est intermédiaire entre celle du cortex piriforme et celle des aires néocorticales. Des groupes de péricaryons marqués sont localisés autour de la fissure rhinale dans une région correspondant aux couches II-III de l'aire agranulaire insulaire postérieure décrite par KRETTEK et PRICE (1977) chez le Rat. A cet endroit, les corps cellulaires immunoréactifs sont accompagnés par de nombreuses formations sphéroïdes modérément marquées et de taille inférieure à celle d'un péricaryon. Celles-ci sont vraisemblablement les dilatations proximales d'expansions neuroniques émises par des corps cellulaires très peu réactifs et donc non visualisés. D'avant en arrière, ces structures se retrouvent autour de la fissure rhinale, du niveau du septum à celui de

l'hypothalamus antérieur (A1-4).

Quoique par ailleurs semblable à celle des aires néocorticales qui lui sont voisines, la distribution des structures immunoréactives dans le cortex suprarhinal est surtout remarquable par la présence de trajets axoniques depuis le toit calleux du claustrum vers les couches corticales superficielles dans lesquelles sont observées des images suggérant des contacts CCK-I axosomatiques sur des neurones négatifs (Pl.Ic et f).

Le cortex piriforme est le lobe cortical possédant l'IR-CCK la plus intense. Pauvre en éléments marqués, la couche plexiforme ne présente que quelques fibres variqueuses. Celles-ci cheminent parallèlement à la surface piaie et sont surtout concentrées dans la lèvre ventrale de la fissure rhinale ainsi qu'au voisinage de la fissure amygdalienne (A7-9). A cet endroit, ces fibres CCK-I semblent orientées vers les noyaux basaux de l'amygdale. Dans la couche pyramidale, les fibres immunoréactives sont extrêmement abondantes et entremêlées. Cette distribution masque partiellement l'arrangement périsonomatique de terminaisons marquées autour de corps cellulaires négatifs. De telles images qui suggèrent des contacts axosomatiques sont aussi fréquentes dans la couche polymorphe. Cependant cette dernière se caractérise plutôt par la présence de nombreux axones CCK-I rassemblés en deux faisceaux horizontaux. Ceux-ci sont orientés, le premier en direction du noyau endopiriforme et de la couche pyramidale sous la fissure rhinale, et le second en direction des noyaux basaux de l'amygdale et de la bordure amygdalienne de la couche pyramidale (A7,A9). D'une façon générale, l'innervation CCK-I du cortex olfactif primaire s'intensifie vers l'arrière (A1-9).

Les corps cellulaires à IR-CCK observés dans le cortex piriforme sont souvent de grande taille. Rostralement, ils sont localisés autour du tractus olfactif latéral (A1-3), et caudalement, ces neurones d'aspects bipolaire ou multipolaire, se répartissent dans l'ensemble des couches pyramidale et polymorphe, en restant toutefois absents de la couche plexiforme (A4-9).

Le noyau endopiriforme, quant à lui, présente une densité moyenne de structures CCK-I. Des fibres variqueuses marquées y sont observées courant parallèlement à la capsule externe sur toute son étendue dorsoventrale. La principale caractéristique du marquage anti-CCK-8 du noyau endopyriforme est la présence de nombreuses terminaisons périsonomatiques CCK-I autour de corps cellulaires non marqués (A6-8).

IV - COMPLEXE AMYGDALIEN

Dans l'aire amygdalienne antérieure, seules de faibles concentrations de fibres et terminaisons nerveuses CCK-I sont présentes (A2-4). Plus caudalement, une IR-CCK intense est observée dans le noyau médian (A5-8). Dans toute son étendue, ce dernier montre une extraordinaire concentration de terminaisons et fibres nerveuses immunoréactives rassemblées autour de corps cellulaires non marqués (Pl.IIa et b). Une innervation CCK-I apparemment périsonomatique de neurones non marqués a été aussi observée dans le noyau cortical (Pl.IIc et a, et 14-8), dans la partie parvicellulaire du noyau basal et dans la partie ventrale du noyau latéral (A7-9). D'autre part, de nombreux trajets axoniques ont été visualisés dans le complexe amygdalien, particulièrement en périphérie du noyau basal, dans sa portion magnocellulaire, ainsi que dans le prolongement de la capsule externe contre le noyau latéroventral. Ces fibres variqueuses CCK-I forment trois faisceaux qui sont orientés, dorsalement et médianement, en direction du noyau central et du bras ventral de la strie terminale (A6-7) ; ventralement, en direction de l'aire transitionnelle cortico-amygdalienne (A6) ; latéralement, en direction du noyau endopyriforme (A7). D'autres trajets axoniques ont été visualisés dans le fond du noyau latéroventral (A9), et en bordure du putamen et de la capsule interne dans la voie amygdalofuge ventrale (A6).

De nombreux corps cellulaires CCK-I sont présents dans l'amygdale et sont distribués en groupes qui respectent ses subdivisions nucléaires (Fig.3 et 4, A5-8). Ces corps cellulaires sont très immunoréactifs, de grande taille et d'aspect polymorphe dans les noyaux latéroventraux et basaux (magnocellulaires). Les cellules CCK-I sont de plus petite taille partout ailleurs dans l'amygdale. Les noyaux latérodorsaux et centraux ne présentent qu'un faible nombre de petits péricaryons circulaires essentiellement distribués dans leurs portions caudales (Fig.3 et 4, A7-9). Des péricaryons monopolaires, bipolaires ou de forme circulaire, très marqués, sont localisés en périphérie du noyau médian et dans sa partie très riche en terminaisons immunoréactives (Pl.IIa et b). Dans le noyau cortical, les neurones CCK-I sont bipolaires, multipolaires ou circulaires (Pl.IIc et d). Ils y sont distribués en périphérie de la couche pyramidale bien innervée dans sa partie antérieure, puis caudalement y sont plus uniformément répartis (Fig.3, A5-8).

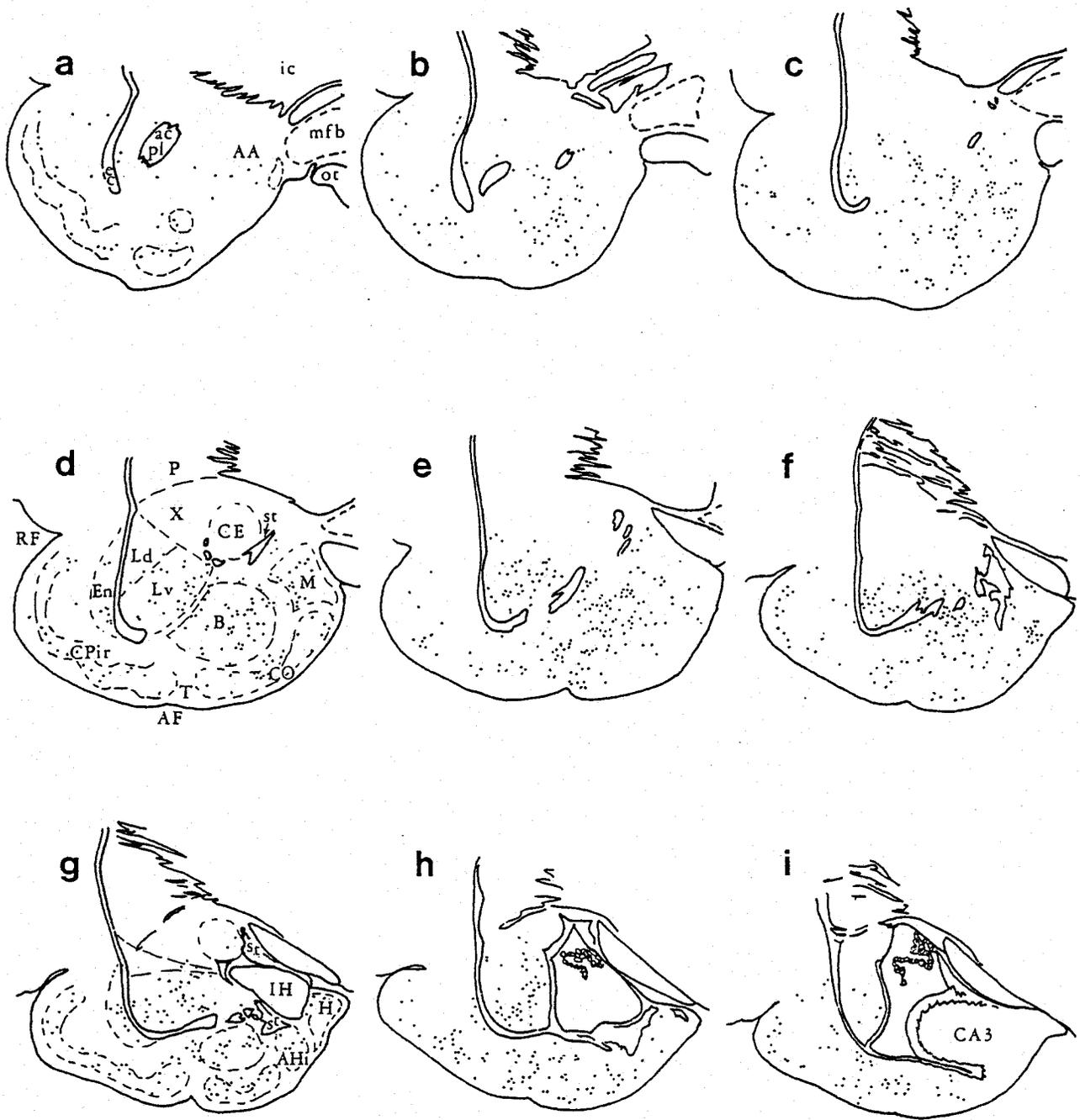


Fig.3 : DISTRIBUTION DES NEURONES CCK-I DANS L'AMYGDALÉ. (Cobaye mâle colchicinisé).

(a-i), dessins à la chambre claire de coupes frontales épaisses de 12 μ m et régulièrement espacées tous les 240 μ m.

Chaque point représente un neurone CCK-I.

Les péricaryons marqués sont abondants dans le noyau latéro-ventral (Lv), basal (B) et médian (M). Le noyau latéro-dorsal (Ld), le noyau central (CE) et le noyau cortical (CO) sont des aires pauvres en corps cellulaires immunoréactifs.

Abréviation utilisée dans cette figure uniquement : CA3, Champ A3 de la corne d'Ammon.

V - GANGLIONS DE LA BASE

Dans le noyau caudé rostral, seules quelques rares fibres et terminaisons nerveuses marquées sont détectées en bordure du ventricule latéral (A1-5).

C'est dans sa partie caudale que les plus fortes concentrations de structures CCK-I sont présentes, notamment des corps cellulaires polymorphes modérément marqués, bien qu'en faible nombre (Fig.4, A6-8).

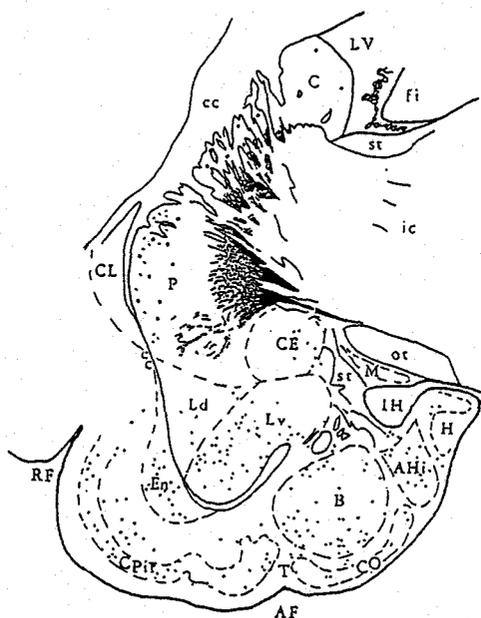


Fig. 4 : DISTRIBUTION DE L'IR-CCK DANS LE STRIATUM (Cobaye mâle colchicinisé)

Dessin à la chambre claire d'une coupe frontale de 12 μ m représentant de façon stylisée la distribution des structures marquées dans le striatum caudal. Les points représentent les corps cellulaires CCK-I, les macules jouxtant le claustrum des dilations axonales marquées, et le pointillé schématise le plexus de "fibres laineuses" occupant le globus pallidus, la poche ventrale du putamen (P), et s'insinuant entre la capsule interne (ic) et le tractus optique (ot).

Abréviation utilisée dans cette figure uniquement : B, noyaux basaux de l'amygdale.

Le putamen, de même que le noyau caudé, est pratiquement dépourvu de structures immunoréactives dans sa portion rostrale : sa partie ventrale est ponctuée çà et là par de rares fibres et terminaisons CCK-I et sa partie dorsale est dépourvue de marquage (A1-5). En revanche, le putamen caudal est strié par un réseau dense de matériel CCK-I semblant être l'extension dorsale d'un plexus nerveux particulièrement développé dans le globus pallidus et s'étendant ventralement entre la capsule interne et le tractus optique (Fig.4, A6-9). La poche ventrale du putamen, quant à elle, présente postérieurement des structures rubannées faiblement marquées et finement granulaires (Fig.4, A7-8). Celles-ci, observées à fort grossissement (Pl.IIIc), semblent être composées d'un enroulement de très fines varicosités autour d'un élément plus épais et non marqué. Ces structures forment un groupe qui s'étend centralement et dorsalement dans les portions caudales du globus pallidus et du putamen, pour apparemment contribuer à leur innervation dense déjà mentionnée (Fig.4).

Des péricaryons réagissent positivement dans le putamen. Ils sont

d'aspect monopolaire, bipolaire ou multipolaire, d'immunoréactivité très variable (Pl.IIIa, b et d), et distribués en faible nombre et uniformément dans le putamen antérieur. Ils sont presque absent de sa portion moyenne et sont plus nombreux postérieurement (A7-9). Dans le putamen caudal, des dilatations axoniques ou dendritiques très immunoréactives sont présentes au voisinage du claustrum (Fig.4).

Le globus pallidus antérieur est vide de structures CCK-I (A1-2). Sa partie postérieure est occupée par le plexus dense décrit plus haut (Fig.4, Pl.IIIc, A7-9). Antérieurement, quelques rares péricaryons marqués sont localisés contre la capsule interne.

Dans la partie caudale du pallidum ventral, une forte concentration de fibres et terminaisons CCK-I a été observée. Dans cette région, ces axones marqués ont une orientation horizontale et semblent faire partie d'un important faisceau de fibres immunoréactives courant le long de la capsule interne et s'étendant dans le lit de la strie terminale (A4-5). Aucun corps cellulaire n'a été observé dans le pallidum ventral.

Le noyau accumbens est très modérément immunoréactif. Pas de corps cellulaires, mais des fibres et terminaisons nerveuses de fin calibre y ont été détectées et ce, essentiellement dans sa portion postéromédiane (A1).

Des concentrations plus fortes de varicosités CCK-I sont présentes dans l'îlot majeur de Calleja (A1).

VI - NOYAUX DU LIT DE LA STRIE TERMINALE

Le noyau du lit de la strie terminale (NST) est très riche en fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives, dont la concentration augmente au fur et à mesure vers l'arrière (A2-6). Dans la portion antérieure du NST, les fibres et terminaisons nerveuses marquées sont distribuées autour du bras antérieur de la commissure antérieure et en une fine bande s'étendant de ce dernier à la pointe du ventricule latéral (A2-3). Plus postérieurement, ces éléments marqués sont rassemblés autour du bras transverse de la commissure antérieure et forment aussi un faisceau juxtacapsulaire dont les fibres variqueuses ont une orientation, verticale dans la partie médiane du NST, et oblique dans sa partie latérale (A4-5). Ces fibres CCK-I qui cheminent contre la capsule interne semblent s'étendre et se disperser ventralement dans le pallidum ventral et la substance innominée (A4). De très fortes concentrations de fibres et terminaisons nerveuses marquées ont été observées dans la portion postérieure du NST (Pl.IVc, A6). Les neurones de cette région subventriculaire,

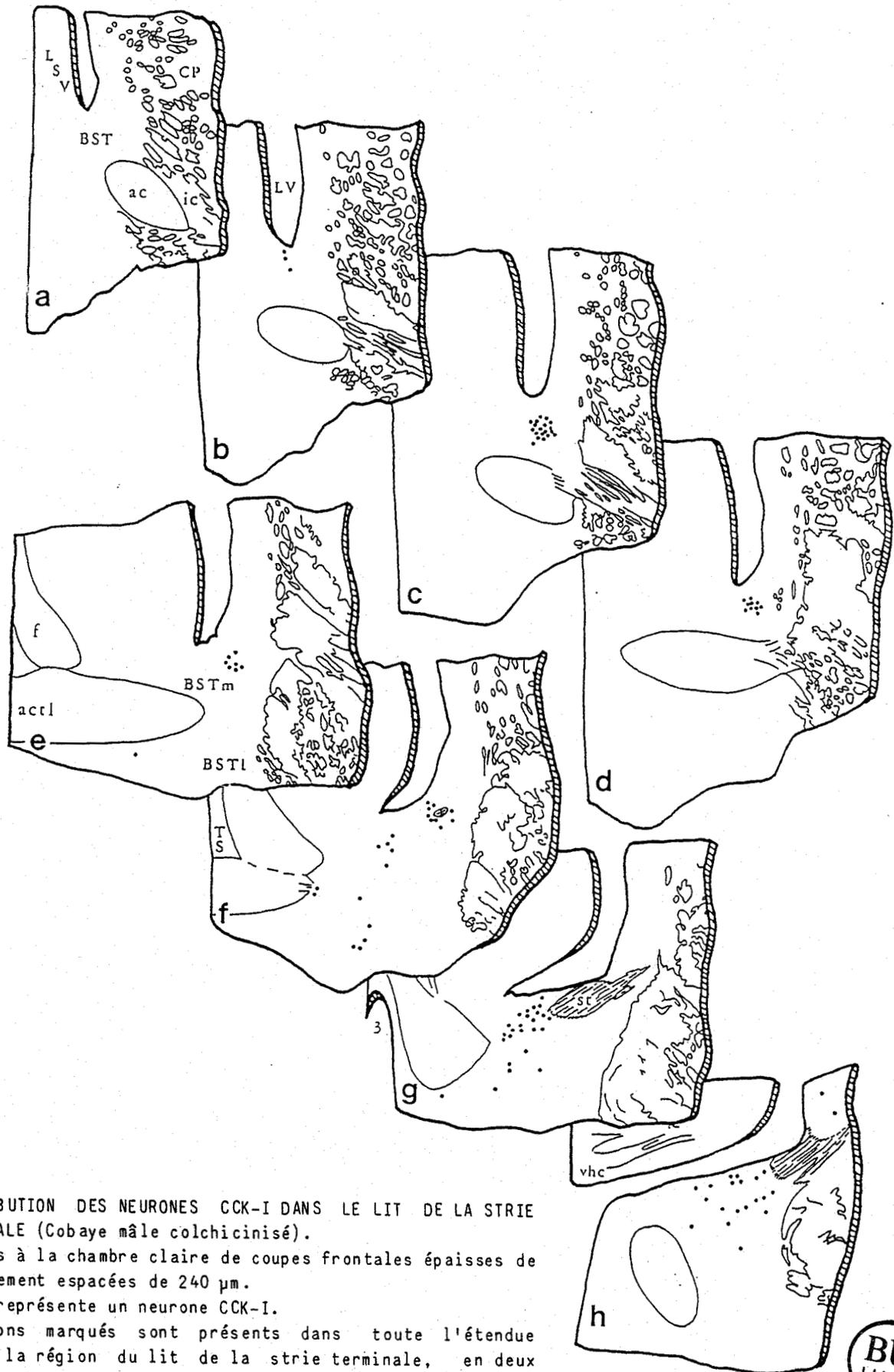


Fig. 5 : DISTRIBUTION DES NEURONES CCK-I DANS LE LIT DE LA STRIE TERMINALE (Cobaye mâle colchicinisé).

(a-h), dessins à la chambre claire de coupes frontales épaisses de 12 μm et régulièrement espacées de 240 μm .

Chaque point représente un neurone CCK-I.

Les péricaryons marqués sont présents dans toute l'étendue rostrocaudale de la région du lit de la strie terminale, en deux populations apparemment distinctes. La première occupe le noyau médian (BSTm) où elle forme un bouquet circulaire qui, postérieurement, entoure la strie terminale (st) naissante avant de disparaître (b-f). La seconde population est constituée de neurones qui, éparpillés dans le noyau latéral (BSTl) antérieur, se rassemblent plus caudalement en position sub-ventriculaire (f-h).

comprise entre la strie médullaire et la strie terminale, reçoivent apparemment de très nombreux contacts périsonomatiques CCK-I (Pl.IV b-e).

Un très grand nombre de péricaryons immunoréactifs a été détecté dans le NST (Fig.5). Ils constitueraient deux groupes de cellules qui diffèrent par leur morphologie et leur distribution. Le premier groupe comprend de petites cellules sphériques qui sont rassemblées en une formation circulaire localisée sous la pointe du ventricule latéral, et dont l'apparition en coupe frontale précède la décussation de la commissure antérieure (Fig.5 b-d, A3-4). Ce groupe de corps cellulaires marqués semble se désagréger postérieurement après avoir encerclé les premiers faisceaux de la strie terminale (Fig.5f, Pl.IVa, A5). Le second groupe de péricaryons CCK-I du NST est composé de neurones polymorphes plus épars qui sont distribués, dans la partie latérale de cette région, autour du bras transverse de la commissure antérieure et autour des colonnes ascendantes du fornix (Fig.5e-g, A5-6). Ces cellules immunoréactives semblent se rassembler postérieurement dans la région subventriculaire richement innervée du NST (Fig.5g et h, Pl. Vc, A6).

VII - SEPTUM

Le septum est dans l'ensemble assez pauvre en IR-CCK. Le noyau médian et le noyau septofimbrial ne renferment que de très rares fibres marquées. L'essentiel du matériel immunoréactif est constitué de trois groupes de fibres variqueuses et de terminaisons vraisemblablement périsonomatiques (Pl.Vd), distribués dans les noyaux latéraux et le noyau septohypothalamique (A1-6).

Le noyau triangulaire (ou partie postérieure du noyau préoptique médian) est la seule région septale à renfermer des corps cellulaires CCK-I (A5). Ceux-ci sont circulaires, faiblement marqués et de petite taille. Ils ressemblent fortement aux péricaryons qui réagissent dans le noyau préoptique médian rostral et font vraisemblablement partie de cette population neuronique CCK-I (A2-4).

VIII - REGIONS PREOPTIQUES

De nombreuses fibres et terminaisons immunoréactives ont été détectées dans la crête suprachiasmatique (A1). L'organe vasculaire de la lame terminale (ovlt) voisin, n'est que faiblement innervé par des axones CCK-I.

Des corps cellulaires de petite taille ont été visualisés dans la crête

suprachiasmatique. Ils sont localisés au voisinage de l'ovlt et contre le chiasma. Dans la région suprachiasmatique, des péricaryons CCK-I ont été observés, dans l'axe des extensions latérales du récessus suprachiasmatique du troisième ventricule, et dorsalement au noyau suprachiasmatique (A2), dans l'aire préoptique médiane, en un groupe circulaire de quelques neurones très marqués (Pl.Vf, A2). Le noyau suprachiasmatique lui-même n'est pas immunoréactif (A2-4).

L'aire préoptique médiane reçoit une très dense innervation CCK-I qui y dessine les contours de corps cellulaires non marqués (Pl.Vc, A2-4). Ce réseau dense de prolongements nerveux immunoréactifs s'estompe progressivement dans l'aire préoptique latérale. Cette dernière est parcourue d'axones CCK-I orientés vers le septum, le NST, le pallidum ventral et le faisceau médian du télencéphale (A4).

Quelques corps cellulaires faiblement marqués sont présents dans l'aire préoptique latérale. Ils sont localisés en bordure de l'aire préoptique médiane et sous le bras transverse de la commissure antérieure (A3-4).

Une formation remarquablement riche en terminaisons CCK-I de fort diamètre fait saillie dans le plafond de la portion préoptique du troisième ventricule (A3-4). Examinée à faible grossissement, cette formation s'avère richement vascularisée. Les contours des vaisseaux sont renforcés par l'accumulation de terminaisons nerveuses immunoréactives (Pl.V,b). Cette structure a l'agencement et la localisation d'un organe circumventriculaire. Elle se distingue cependant bien d'une part, de l'ovlt, plus ventral et rostral (A1), et d'autre part de l'organe sous-fornical bien plus postérieur (A7) et lui même bien innervé par des fibres CCK-I (Pl.V,a).

Dorsalement à cet organe "préoptico-commissural" un groupe ovale de nombreux péricaryons de petite taille et faiblement marqués occupe toute l'étendue du noyau préoptique médian jusqu'à la décussation de la commissure antérieure (A2-4).

Des concentrations modérées de fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives sont observées dans l'ensemble du continuum préoptico-hypothalamique périventriculaire (A4-7). Quelques corps cellulaires allongés sont détectés dans sa partie ventrale, ainsi qu'à la hauteur du noyau hypothalamique ventromédian (A6,7).

IX - HYPOTHALAMUS ET HYPOPHYSE

A - L'innervation CCK-I de l'hypothalamus

Le noyau supraoptique (NSO) reçoit une innervation CCK-I assez lâche. Celle-ci occupe surtout sa région dorsale ((A3-4).

Dans le noyau paraventriculaire (NPV), une abondante innervation CCK-I est distribuée dans toute l'étendue rostrocaudale de sa partie parvicellulaire. Peu de fibres et terminaisons marquées ont été observées dans la partie magnocellulaire du NPV (A4,7). Latéralement au NPV, des axones immunoréactifs cheminent dans l'aire périfornicale en direction de l'hypothalamus latéral (A7-8).

Des trajets axoniques ont aussi été visualisés dans toute la base de l'hypothalamus, de la région latérale du tuber, à travers l'aire hypothalamique latérobasale, le long du tractus optique, jusqu'au faisceau médian du télencéphale (A6-9).

L'aire hypothalamique latérale présente aussi des accumulations de fibres et terminaisons nerveuses marquées. Celles-ci constituent l'extension latérale d'un champ de structures CCK-I qui dessine une arche autour du noyau ventromédian et dont l'origine se situe dans l'aire périventriculaire (A7).

Les plus fortes concentrations de fibres et de terminaisons immunoréactives de l'hypothalamus ont été mises en évidence dans le noyau ventromédian (A6-8) et le noyau prémamillaire (A9). Ces deux régions reçoivent une fine innervation CCK-I qui souligne les contours de corps cellulaires non marqués, ce qui suggère de très nombreux contacts périsonomatiques et/ou péridendritiques.

De fortes densités d'éléments punctiformes CCK-I ont aussi été détectées dans le noyau dorsomédian (A9).

Les aires hypothalamiques dorsales et latérodorsales sont modérément innervées. On y observe des trajets de fibres variqueuses marquées orientées horizontalement en direction de la zona incerta (A8-9).

Dans le noyau arqué, l'innervation CCK-I est composée de fines varicosités et de segments dendritiques (P1.VI c). Ces éléments sont distribués préférentiellement dans la partie médiane de cette région, dans toute l'étendue rostrocaudale de celui-ci (A6-9).

B - Eminence médiane et neurohypophyse

Dans l'éminence médiane, les structures immunoréactives sont distribuées à la fois dans la zone externe (P1.VIb) et dans la zone interne (P1.Xa). Cette dernière contient une faible concentration de fibres et de terminaisons nerveuses qui ne sont marquées que par l'IS 15/8. On peut les suivre, en coupe

sagittale, dans la partie ventrale de la tige pituitaire et du lobe nerveux. Ces quelques fibres variqueuses représentent en fait l'unique innervation CCK-I de la neurohypophyse (Pl.VIIc).

Dans la zone externe de l'émittance médiane, des fibres et terminaisons immunoréactives sont rassemblées autour des capillaires de la vascularisation porte hypophysaire (Pl.VIb et Xa). Cette innervation périportale CCK-I, claisermée antérieurement, se concentre avec l'individualisation du récessus infundibulaire du troisième ventricule, et disparaît progressivement dans la tige pituitaire (Pl.Xa). Les anses longues comme les anses courtes des capillaires portes sont innervées (Pl.8a). Cette innervation périportale CCK-I est régionalisée. Elle est préférentiellement localisée dans les parties dorsales et médioventrales de la zone externe (Pl.VIIa, A8). Elle est visualisée de façon indentique par l'IS 15/8 et l'IS 86.

C - Distribution des péricaryons marqués dans l'hypothalamus

Dans les conditions expérimentales qui ont été les nôtres, il n'a pas été observé de neurones magnocellulaires indiscutablement marqués ni dans le NSO (A2-5) ni dans le NPV (A6-7). De grandes cellules immunoréactives ont été pourtant détectées dorsalement au NPV mais nettement en dehors de sa partie magnocellulaire. En revanche, de nombreux neurones parvocellulaires ont réagi dans le NPV. Ils sont particulièrement abondants au niveau du foramen interventriculaire (Fig.6e-h) et sont plus rares dans la portion caudale du NPV (Fig.6i, Pl.XIb1).

Une population de corps cellulaires faiblement marqués et d'aspect circulaire ou bipolaire, et s'étendant dans le sens antéropostérieur dans les limites du NPV, occupe l'aire périventriculofornicale (Fig.6e-j). Elle borde les limites dorsales et latérales du noyau ventromédian (Fig.6h, A6-8) et s'étend dans l'aire hypothalamique latérobasale (Fig.6j-k, A7-8).

De très nombreux neurones immunoréactifs ont été observés dans tout le développement rostrocaudal du noyau arqué (Fig.6). Apparaissant d'abord dans l'aire rétrochiasmatique (Pl.VIIa, Fig.6a, A5), ces péricaryons CCK-I se concentrent dans la partie médiane subventriculaire puis périventriculaire du noyau arqué en envahissant aussi la zone interne de la lèvre dorsale de l'émittance médiane (Pl.VIa, Fig.6a-1, A6-8). Ils sont de forme circulaire et sont modérément marqués. Des neurones de plus grande taille et plus immunoréactifs, monopolaires, bipolaires ou multipolaires d'aspect, sont localisés en extrême périphérie des parties latéroventrales et dorsales du

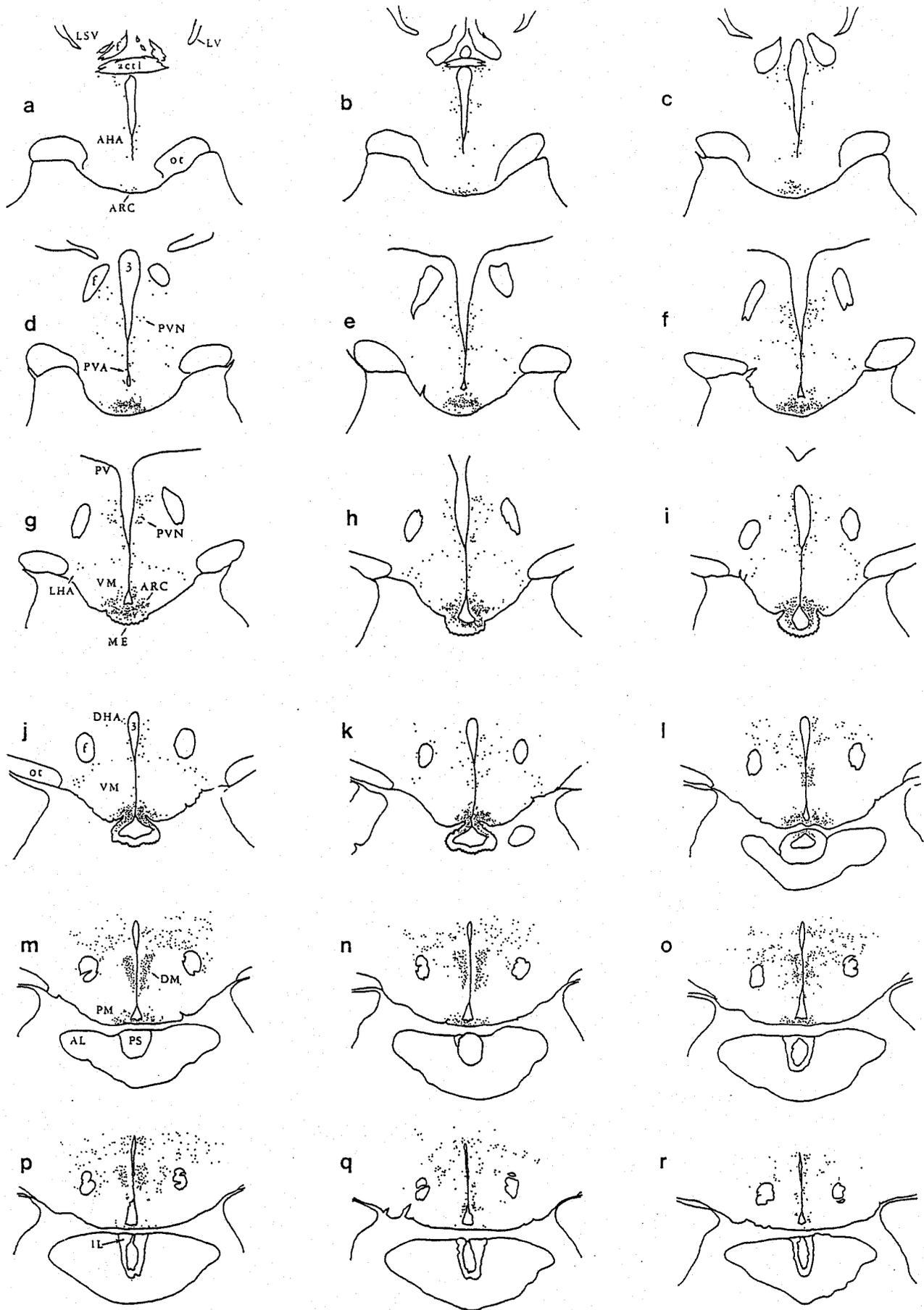


Fig.6 : DISTRIBUTION DES NEURONES CCK-I DANS L'HYPOTHALAMUS (Cobaye mâle colchicinisé).

(a-r), dessins à la chambre claire de coupes frontales épaisses de 12µm et régulièrement espacées de 120 µm.

Chaque point représente un neurone CCK-I.

Les corps cellulaires immunoréactifs sont distribués : dans l'hypothalamus antérieur (a-h), principalement dans l'aire périventriculaire (PVA), le noyau paraventriculaire (PVN) et dans l'aire périventriculofornicale en une population dessinant une arche autour du noyau ventromédian (VM), depuis la PVA jusque dans l'aire hypothalamique latérale (LHA) ; dans l'hypothalamus (i-r) médiobasal (noyau arqué, ARC) et dorsal (noyau dorsomédian, DM, et aire hypothalamique dorsale, DHA).

Abréviation utilisée dans cette figure uniquement : IL, lobe intermédiaire de l'hypophyse.

noyau arqué (Pl.VIc), qui sont elles mêmes vides de corps cellulaires marqués (Pl.VIa, A8). Ces neurones CCK-I se raréfient dans la portion rétroinfundibulaire de cette région où ils occupent surtout le plancher du récessus préamillaire du troisième ventricule (Pl.VIIb, Fig.6l-p, A9).

Deux autres groupes de neurones CCK-I sont présents dans l'hypothalamus médian. Le plus dense de ceux-ci est constitué de petits neurones modérément à fortement marqués et concentrés dans tout le noyau dorsomédian (Fig.6l-p, A9). Le second groupe de corps cellulaires immunoréactifs comprend de grands neurones multipolaires très abondants et dispersés dans l'hypothalamus dorsal et latérodorsal (Fig.6k-r, A9). Des neurones CCK-I qui appartiennent de façon évidente à cette population sont aussi présents dans l'hypothalamus postérieur. Peu nombreux dans cette région, ils sont les cellules CCK-I les plus caudales de l'hypothalamus (Fig.6r). Le complexe mamillaire ne contient pas de neurones immunoréactifs.

D - Adénohypophyse

Dans le lobe intermédiaire, toutes les cellules sont fortement marquées (Pl. VIIc). Deux types cellulaires différents réagissent dans le lobe antérieur. Les cellules CCK-I les plus abondantes sont de forme polygonale, et groupées en amas qui sont uniformément distribués dans l'ensemble du lobe antérieur (Pl.VIIc et d). Le deuxième type cellulaire immunoréactif est représenté par de grandes cellules aux contours arrondis (Pl.VIIIa). Ces cellules sont préférentiellement localisées dans la partie médioventrale de la moitié rostrale du lobe antérieur.

Ces deux types cellulaires CCK-I correspondent à des cellules sécrétrices connues. L'utilisation de la technique du double marquage avec élution des anticorps permet de mettre en évidence que les cellules marquées les plus abondantes sont les cellules corticotropes (Pl.VIII, b1-2). Les plus grandes cellules CCK-I ont été identifiées comme les cellules thyrotropes (non illustré). Le marquage concerne la majorité des deux populations. L'IR-CCK des cellules corticotropes est plus intense chez le mâle, celle des cellules thyrotropes chez la femelle.

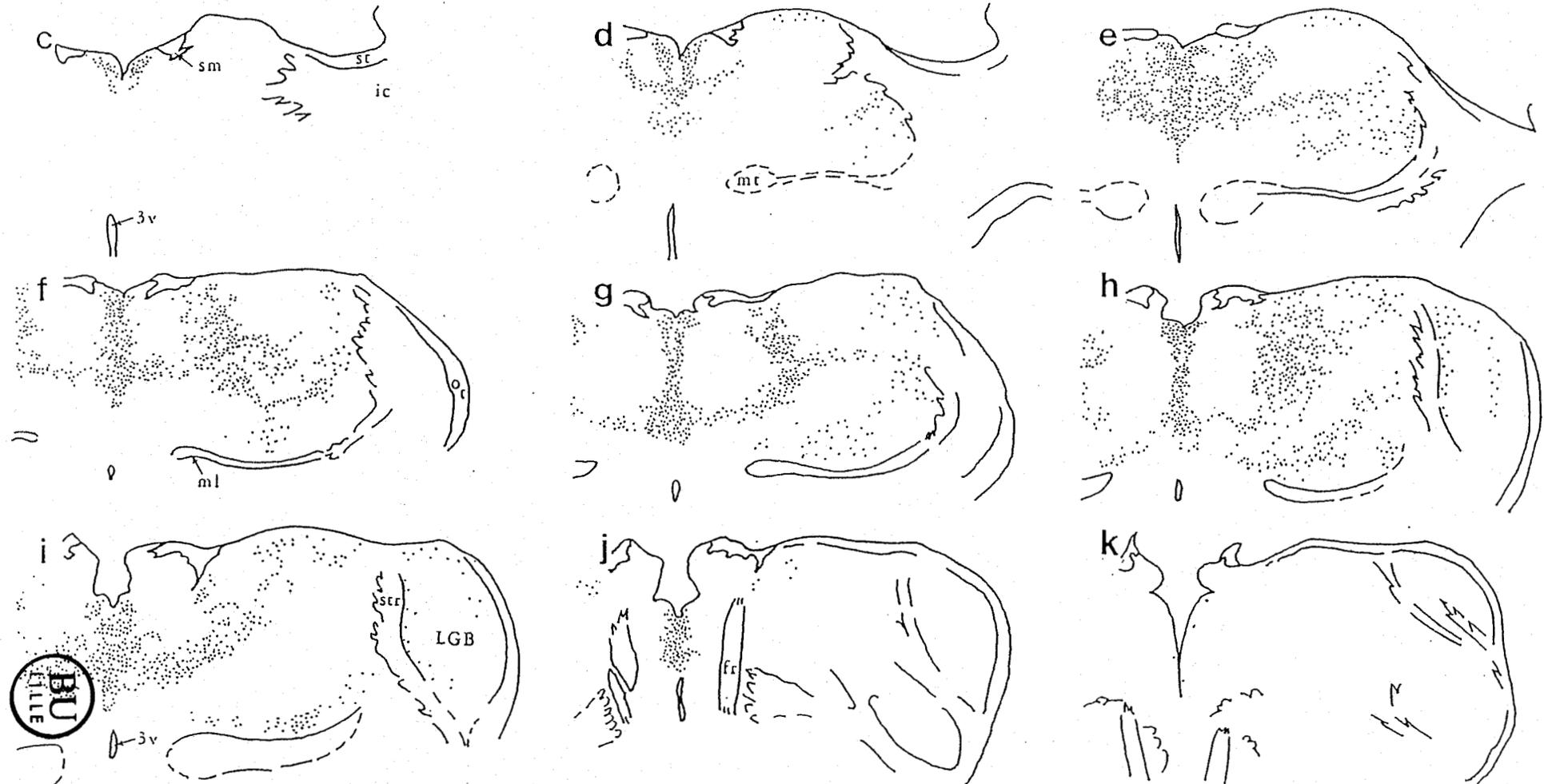
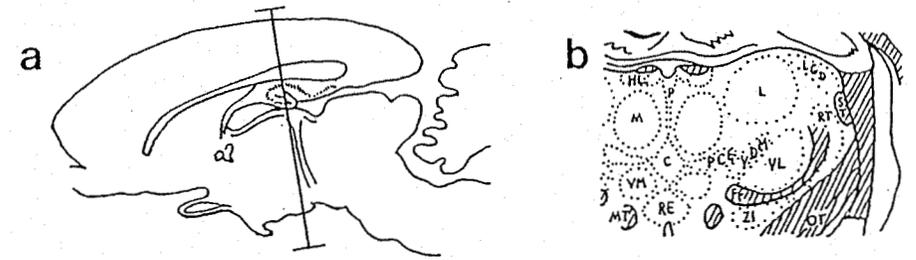
X - THALAMUS

Une densité modérée de fibres et terminaisons nerveuses a été détectée dans le thalamus. Ces structures marquées sont exclusivement localisées dans

Fig.7 : DISTRIBUTION DES NEURONES CCK-I DANS LE THALAMUS

(Cobaye mâle colchicinisé).

(a), vue parasagittale du SNC de Cobaye indiquant le plan de coupe respecté. (b), organisation anatomique du thalamus du cobaye, redessinée d'après J.S. TINDALL (1965) ; à comparer avec la coupe (g). (c-k), dessins à la chambre claire de coupes frontales épaisses de 12 µm et régulièrement espacées de 480 µm. Chaque point représente un neurone CCK-I. Les corps cellulaires immunoréactifs sont surtout abondants dans le thalamus médian (noyaux centraux, C, PCE et P). Le thalamus antérieur et postérieur présentent peu d'immunoréactivité, le réticulé est négatif.



Abréviations utilisées en (b) uniquement : FF, champs de Forel ; fr, faisceau habénulo-interpédonculaire ; HL, noyau latéral de l'habénula ; L, noyau thalamique latéral ; LGB, corps genouillé latéral ; LGD, corps genouillé latérodorsal ; M, noyau thalamique médian ; PCE, noyau thalamique paracentral ; RE, noyau reuniens ; VDM, partie dorsomédiane du noyau thalamique latéral ; VM, noyau thalamique ventromédian ; str, radiation thalamique supérieure ; 3V, troisième ventricule.

les régions contenant des corps cellulaires CCK-I, exception faite du thalamus antéromédian où des fibres immunoréactives courent du sommet du troisième ventricule au noyau paraventriculaire (A7-9). Dans ce dernier, les terminaisons marquées ont souvent un arrangement périsonomatique.

Le thalamus contient un très grand nombre de corps cellulaires immunoréactifs (Fig.7). Ceux-ci ont un aspect circulaire dans le noyau paraventriculaire (PV), ont des contours polygonaux dans le noyau intermédiobasal (IMD), le noyau centromédian (CT) et le noyau rhomboïdal (RM), et une forme ovoïde dans les noyaux paracentraux (PC) et centrolatéraux (CL) (Pl.IXb). Cette population neuronique CCK-I apparaît rostralement dans le PV (Fig.7c). Elle s'étend postérieurement dans l'IMD, le CT et le RH (Fig.7d), puis envahit la partie dorsale du noyau paraténial et le noyau médiodorsal antérieur (Fig.7e). Plus caudalement, ces neurones CCK-I disparaissent du noyau médiodorsal. Ils occupent le CT et le CL (Pl. IXa) et s'installent dans le noyau ventrolatéral, le noyau latérodorsal, le pulvinar rostral et le corps genouillé dorsolatéral (Fig.7f-i). D'une façon générale, les neurones du thalamus médian sont plus immunoréactifs que ceux distribués dans ses parties latérales et dorsales. Postérieurement au faisceau habénulointerpédonculaire, plus aucun neurone immunoréactif n'est détecté dans le thalamus postérieur (Fig.7i-k). Seul le complexe habénulaire médian contient encore quelques fibres immunoréactives.

XI - LES FAISCEAUX DE LA SUBSTANCE BLANCHE

Des fibres variqueuses CCK-I ont été observées cheminant dans le corps calleux et la capsule externe, dans les bras postérieurs de la commissure antérieure (Pl.Ve), dans les colonnes ascendantes du fornix, dans la strie terminale (A7-9) et le faisceau habénulointerpédonculaire. Il n'a pas été détecté de prolongements nerveux marqués dans le tractus optique, le faisceau mamillothalamique, le lemhnisque médian et la strie médullaire. Ces structures n'ont toutefois pas été systématiquement examinées en coupe sagittale.

XII - COEXISTENCE DES IR-CCK ET IR-CRF :

Les distributions des IR-CRF et IR-CCK dans le NPV et l'éminence médiane ont été comparées sur coupes adjacentes et sur les mêmes coupes après élution des anticorps.

A - Eminence médiane :

Dans l'éminence médiane d'animaux normaux non colchicinisés, les fibres et terminaisons nerveuses CRF-I et CCK-I sont rassemblées autour des anses intra-infundibulaires longues et courtes des capillaires du système porte hypophysaire (Pl.X).

Comparées sur coupes sagittales adjacentes, les innervations périportales CCK-I et CRF-I présentent une distribution remarquablement analogue (Pl.X). Toutes deux apparaissent très rostralement dans l'éminence médiane externe et sont observées dans toute son étendue rostrocaudale, jusqu'au début de la tige pituitaire, à la fois dans la lèvre dorsale et dans la lèvre ventrale.

La comparaison des marquages anti-CCK et anti-CRF effectuée sur coupes frontales adjacentes dans l'éminence médiane, révèle que les deux innervations périportales présentent une régionalisation identique. Rostralement, l'IR-CCK et l'IR-CRF sont localisées dans des fibres et terminaisons nerveuses essentiellement distribuées dans les parties médioventrales de la zone externe. Au niveau de l'individualisation du récessus infundibulaire du troisième ventricule, ces innervations périportales occupent aussi les régions les plus médianes de la lèvre dorsale. Elles restent toutefois absentes des parties latérales de l'éminence médiane externe.

Ces observations suggèrent fortement que l'IR-CCK et l'IR-CRF sont contenues dans une même innervation périportale dans l'éminence médiane.

Les marquages anti-CCK ont été comparés aux marquages anti-CRF effectués successivement sur les mêmes coupes après élution des anticorps.

Il est ainsi possible de mettre en évidence que l'essentiel de l'innervation périportale CCK-I représente en fait l'innervation à CRF du plexus porte, bien que les superpositions strictes soient difficiles à observer (Pl.XIa1 et 2). La coexistence d'IR-CCK et d'IR-CRF a pu être observée dans des fibres variqueuses cheminant dans l'épaisseur de l'éminence médiane. Cependant, quelques rares groupes de fibres et terminaisons périportales ne semblent contenir que l'une de ces deux immunoréactivités.

B - Le noyau paraventriculaire

La comparaison des marquages anti-CRF et anti-CCK effectués sur coupes frontales adjacentes dans l'hypothalamus révèle que les péricaryons CCK-I et

CRF-I sont distribués dans la partie parvicellulaire du NPV. Cependant, les neurones parvicellulaires CCK-I sont moins nombreux et plus faiblement marqués que les neurones CRF-I.

Les marquages anti-CCK ont été comparés aux marquages anti-CRF effectués successivement sur la même coupe après élution des anticorps.

Ce procédé révèle que certains neurones CCK-I sont aussi CRF-I (Pl.XIb1 et 2). Cependant, la faiblesse de l'IR-CCK de nombreuses cellules rend difficile la démonstration de la coexistence des deux immunoréactivités dans le plus grand nombre des neurones. Il est toutefois évident que certains neurones parvicellulaires ne contiennent que l'une des deux immunoréactivités.

La présence d'IR-CCK dans le système paraventriculo-infundibulaire à corticolibérine est révélée de la même façon par l'IS 15/8 et l'IS 86. Les deux antisérums donnent des marquages comparables à la fois dans le NPV et dans l'éminence médiane externe.

ATLAS DU PROSENCEPHALE DU COBAYE PRESENTANT UNE CARTOGRAPHIE DES STRUCTURES CCK-I.

Les subdivisions anatomiques sont indiquées sur la moitié droite des figures.

La moitié gauche des figures donne une représentation schématique de la distribution des fibres, terminaisons nerveuses (traits et pointillés) et corps cellulaires CCK-I (gros points).

Les dessins sont reproduits d'après des coupes frontales (plan de coupe donné dans la Fig. 7a). Les figures de A1 à A9 représentent des plans de coupes (espacés de 480 um) échelonnés d'avant en arrière.

Les abréviations sont données dans une liste alphabétique en tête d'ouvrage.

LISTE DES ABBREVIATIONS ANATOMIQUES
Utilisées dans toutes les figures et planches

A	
AA,	aire amygdalienne antérieure
AC,	noyau accumbens
AD,	noyau thalamique antérodorsal
AF,	fissure amygdalienne
AHA,	aire hypothalamique antérieure
AHi,	aire amygdalohippocampique
AL,	lobe antérieur de l'hypophyse
AM,	noyau thalamique antéromédian
ARC,	noyau arqué hypothalamique
AV,	noyau thalamique antéroventral
B	
Bl,t,s	noyau amygdalien basal (partie magnocellulaire, transitionnelle, parvicellulaire)
BST,l,m,p	noyau du lit de la strie terminale (partie latérale, médiane, postérieure)
C	
C,	noyau caudé
CE,	noyau amygdalien central
CIns,	cortex insulaire
Cg,	cortex cingulaire
CL,	claustrum
CO,	noyau amygdalien cortical
CP,	caudatoputamen
CPir,	cortex piriforme
CT,	noyau thalamique centromédian
D	
DBB,	bandelettes diagonales de Broca
DHA,	aire hypothalamique dorsale
DM,	noyau hypothalamique dorsomédian
DMa,	noyau hypothalamique magnocellulaire dorsal
E	
En,	noyau endopiriforme
F	
FL,	foramen de Luschka
FrPa,	cortex frontopariétal
FS,	fundus striati
G	
GP,	globus pallidus
H	
H	hippocampe
HDBB	bandelettes diagonales de Broca, bras horizontal

I

IAM, noyau thalamique interantéromédian
ICM, îlot majeur de Calleja
IG, induseum griseum
IH, corne inférieure du ventricule latéral
IM, masses intercalaires de l'amygdale
IR, recessus infundibulaire du troisième ventricule

L

Ld, noyau amygdalien latéral, partie dorsale
LDHA, aire hypothalamique latérodorsale
LHA, aire hypothalamique latérale
LPO, aire préoptique latérale
LSD, noyau latérodorsal du septum
LSI, noyau latéroiintermédiaire du septum
LSV, noyau latéroventral du septum
LV, ventricule latéral
Lv, noyau amygdalien latéral, partie ventrale

M

M, noyau amygdalien médian
ME, éminence médiane
MD, noyau thalamique médiadorsal
MPN, noyau préoptique médian
MPO, aire préoptique médiane
MS, noyau médian du septum

P

P, putamen
PC, noyau thalamique paracentral
PeF1, aire périvericulofoornicale
PFA, aire périfornicale
PM, noyau prémamillaire
PS, tige pituitaire
PT, noyau thalamique paraténial
PTub, pars tubérialis
PV, noyau thalamique paraventriculaire
PVA, aire hypothalamique périverriculaire
PVN,m,p, noyau hypothalamique paraventriculaire (partie magnocellulaire et parvicellulaire)

R

R, noyau réunis du thalamus
RCh, aire rétrochiasmatique
RF, fissure rhinale
RH, noyau thalamique rhomboïde
RI, recessus infundibulaire du troisième ventricule
RT, noyau thalamique réticulaire

S

SCC, crête suprachiasmatique
SCh, noyau suprachiasmatique
SFi, noyau septofimbrial
SH, noyau septohippocampique
SI, substance innommée
SON,r, noyau hypothalamique supraoptique, et partie diffuse
SR, cortex suprarhinal

T

T, aire de transition cortico-amygdalienne
TS, aire triangulaire du septum
Tu, tubercules olfactifs

V

VL, noyau thalamique ventrolatéral
VM, noyau hypothalamique ventromédian
VP, pallidum ventral

X

X, poche ventrale du putamen

Z

ZI, zona incerta

ac,pl,tl commissure blanche antérieure, bras postérieur et tranverse (décussation)

cc, corps calleux
cg, cingulum
cp, pédoncule cérébral

df, commissure dorsale du fornix

ec, capsule externe

f, fornix
fi, fimbria

ic, capsule interne

lot, tractus olfactif latéral

mfb, faisceau médian du télencéphale
ml, lemnisque médian
mt, faisceau mammillothalamique

oc, chiasma optique
ot, tractus optique
ovlt, organe vasculaire de la lame terminale

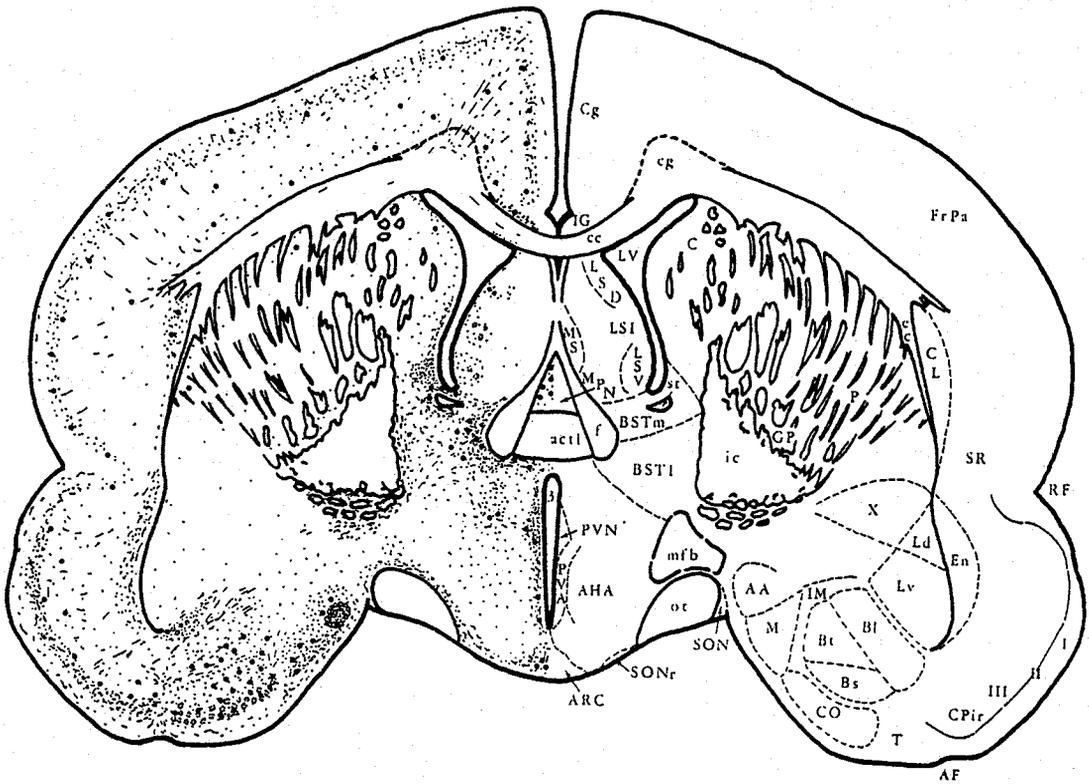
pco, organe préoptico-commissural

sfo, organ subfornical
sm, strie médulaire
st, strie terminale

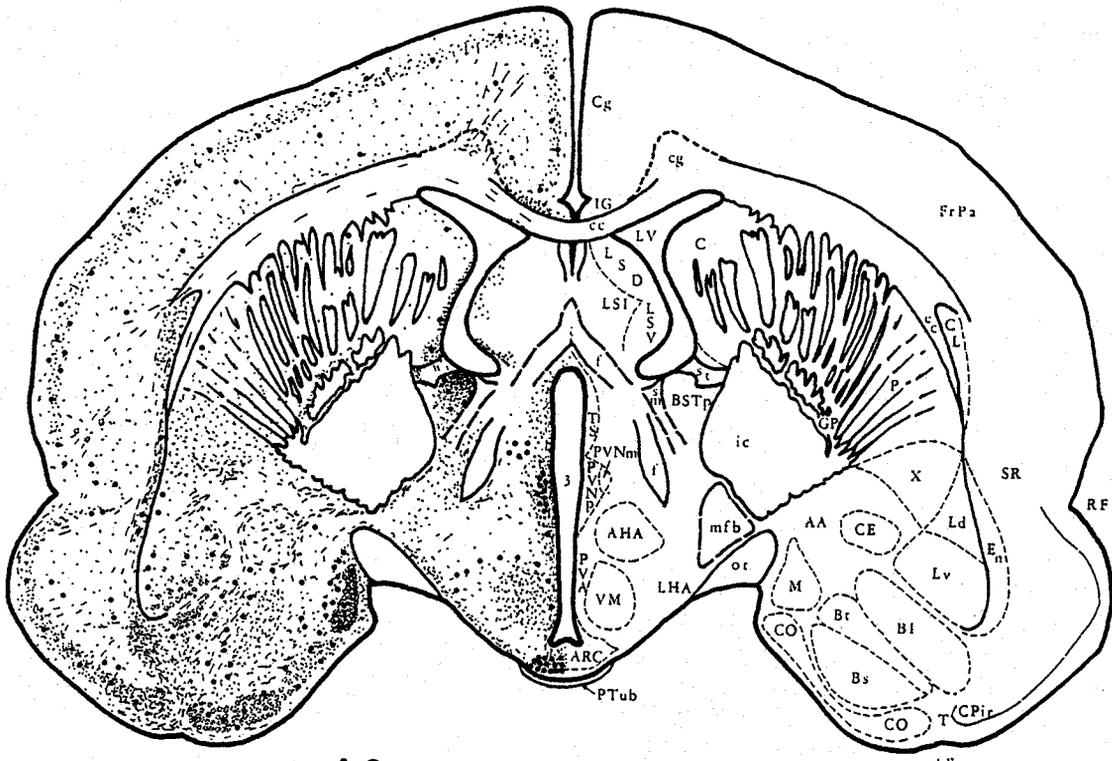
vhc, commissure ventrale du fornix

3, Var, troisième ventricule, récessus suprachiasmatique

I,II,III souches plexiforme (I), pyramidale (II) et polymorphe (III) du cortex pyriforme

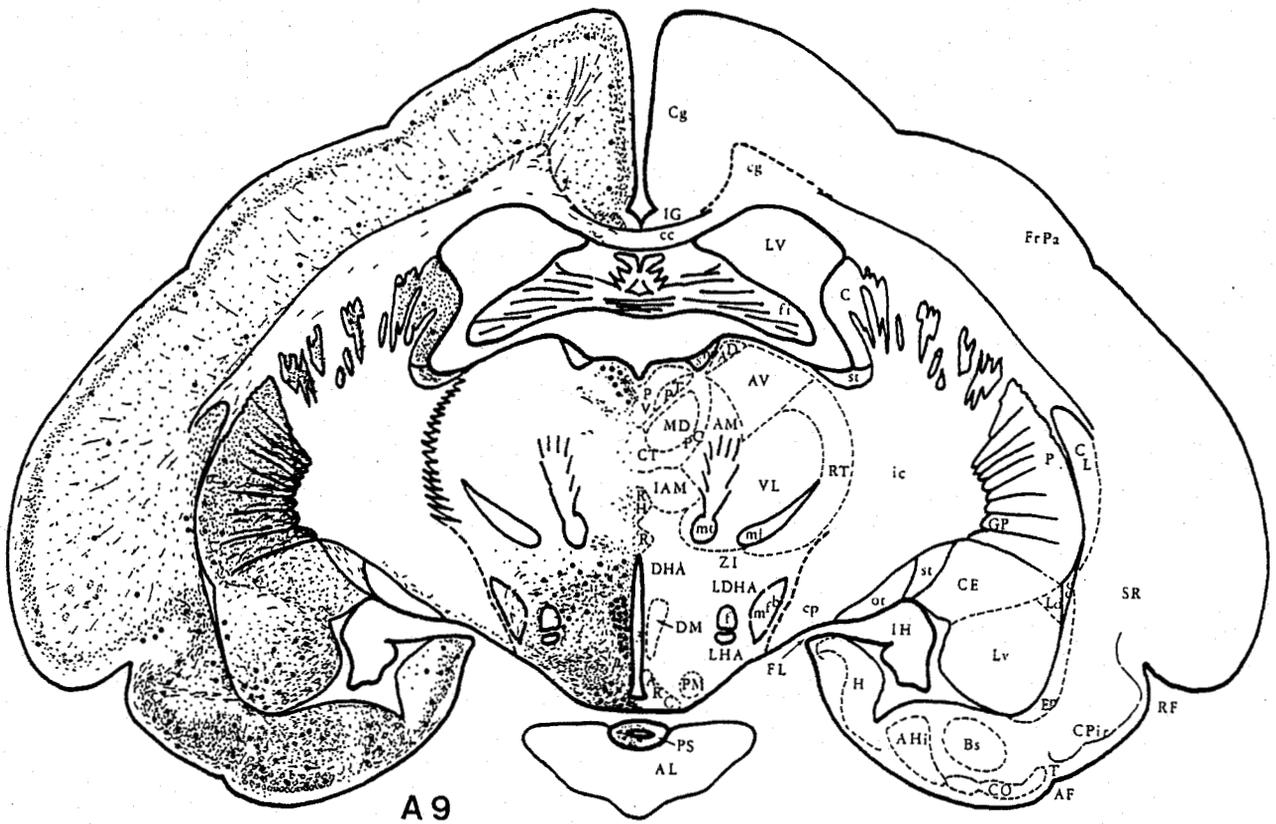


A 5



A 6





A9



DISCUSSION

DISCUSSION

Depuis la mise en évidence de la présence de CCK dans le SNC des Vertébrés par VANDERHAEGHEN et al. en 1975, les travaux relatifs à sa détection immunocytochimique furent essentiellement menés chez le Rat.

La distribution des structures CCK-I dans le SNC n'a été étudiée que de façon très ponctuelle chez d'autres espèces, ce qui explique que le Rat soit la seule pour laquelle une cartographie complète soit disponible.

En ce qui concerne le Cobaye, les travaux morphologiques de LARSSON et REHFELD (1979) et de STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON (1981a et b) se rapportent à des animaux non colchicinisés chez qui la plus grande partie des neurones producteurs de CCK ne sont pas visualisables. Plus récemment, deux articles ont donné une description précise de l'IR-CCK de l'archicortex de cobayes colchicinisés (KOHLER et CHAN-PALAY, 1982 ; GALL, 1984). Certaines de nos observations non mentionnées ici sont en parfait accord avec ces travaux que nous ne discuterons pas plus avant. Les résultats rassemblés dans le présent mémoire constituent en fait la première cartographie des structures CCK-I du diencephale d'une espèce autre que le Rat.

L'intérêt d'un tel travail réside dans l'établissement de comparaisons strictes entre les marquages obtenus dans les deux espèces, ce qui fait apparaître des différences interspécifiques frappantes dont nous discuterons la signification.

Aires corticales

Nous rapportons ici que nos immunosérums révèlent une innervation étendue ainsi que de nombreux corps cellulaires dans les aires néo- et allocorticales. Ces résultats sont en parfait accord avec de précédentes études effectuées chez le Cobaye (LARSSON et REHFELD, 1979 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON 1981a et b), et le Rat (LOREN et al., 1979a ; INNIS et al., 1979 ; VANDERHAEGHEN et al., 1980a et 1981b ; McDONALD et al., 1982 ; CHO et al., 1983 ; HENDRY et al., 1983 ; PETERS et al., 1983), et le Chat (DEMEULEMEESTER et al., 1985 ; FREUND et al., 1986) qui mentionnent aussi la détection dans ces régions de nombreux neurones bi- et multipolaires.

Chez le Rat et le Chat, ces neurones sont supposés être à l'origine d'une innervation essentiellement locale, en partie représentée par le plexus immunoréactif des couches II-III (PETERS et al., 1983 ; EMSON et HUNT, 1984 ;

SEROOGY et al., 1985 ; FREUND et al., 1986). Nos observations de corps cellulaires marqués émettant un axone se colatéralisant dans les couches sous-jacentes (Pl.Id), suggère en effet qu'une unique cellule corticale CCK-I puisse entrer en contact avec de nombreux autres neurones.

Cependant, la possibilité d'une origine partiellement extrinsèque de l'innervation corticale CCK-I chez le Cobaye doit aussi être envisagée. En effet, il a été récemment établi l'existence chez le Chat, d'un circuit thalamocortical CCKergique (SUGIMOTO et al., 1985), et chez le Rat, de circuits ascendants géniculocorticaux (FALLON et SEROOGY, 1984) et mésocorticaux (SEROOGY et al., 1985), ainsi que d'un circuit mineur corticocortical contralatéral (MEYER et al., 1982b).

Ce dernier évoque donc l'existence de projections CCKergiques qui empruntent le corps calleux et relient les deux hémisphères. Nos observations de nombreuses fibres marquées dans le corps calleux, dans les rayons du cingulum, ainsi que dans d'autres faisceaux de substance blanche sont des arguments morphologiques en faveur de l'hypothèse de l'origine variée de l'innervation corticale CCKergique chez le Cobaye. De même, chez le Rat, des fibres CCKergiques ont été détectées des faisceaux de substance blanche tels que le corps calleux (VANDERHAEGHEN et al., 1981b), la capsule externe (FALLON et al., 1983a), le fornix (ROBERTS et al., 1983), la commissure antérieure (VANDERHAEGHEN et al., 1981b ; CHO et al., 1984), la strie terminale (WOODHAMS et al., 1983) et le faisceau mamillothalamique (KIYAMA et al., 1984), ce qui suggère que des projections CCKergiques connectent des régions centrales éloignées, quelquefois même de façon contralatérale.

En ce qui concerne le corps calleux, la présence de corps cellulaires CCK-I dans cette structure a été récemment rapportée (HENDRY et al., 1984). Ces neurones pourraient être à l'origine des grandes concentrations de fibres CCK-I que l'on y visualise après lésion (VANDERHAEGHEN et al., 1981b). Nous avons parfois observé dans le corps calleux du Cobaye des éléments marqués ayant l'aspect de neurones immunoréactifs mais n'avons jamais pu indubitablement établir leur nature.

Nous avons mentionné l'existence dans le cortex temporal du Cobaye, de neurones marqués de forme pyramidale. De telles cellules n'ont pas été identifiées chez le Rat mais ont été trouvées dans les gyrus pré- et post-centraux du cortex humain (SAKAMOTO et al., 1984). Dans le cortex du Cobaye, des neurones CCK-I pyramidaux ne sont présents que dans la région rétrohippocampique (KÖHLER et CHAN-PALAY, 1982).

Les études biochimiques de LARSSON et REHFLED (1979) et de GOLDMAN et al. (1985) chez le Cobaye, attribuent essentiellement l'IR-CCK du cortex à la

présence de CCK-8 et, à un bien moindre degré, à celle de CCK-4. Toutefois l'existence du CCK-4 comme forme neurotransmettrice libre et naturelle dans le SNC demeure sujette à débats (DOCKRAY et al., 1980 et 1981; SAUTER et FRICK, 1983; MARLEY et al., 1984b; REHFELD, 1985). D'autres recherches ont montré que plusieurs formes moléculaires de longueur variable peuvent être extraites du cortex en concentrations non négligeables (ENG et al., 1983; REEVE et al., 1986; REHFELD et HANSEN, 1986). Leurs rôles sont inconnus. Le principal produit de la biosynthèse de la CCK dans le cortex serait le CCK-8 qui s'accumule dans les vésicules synaptiques (PINGET et al., 1979; GOLTERMAN et al., 1981). Les travaux morphologiques de microscopie électronique ont détecté une IR-CCK dans des terminaisons axoniques faisant synapse avec des neurones corticaux (HENDRY et al., 1983; PETERS et al., 1983). Cela suggère l'existence de récepteurs à CCK spécifiques, dont la distribution dans le cortex du Cobaye a été étudiée et semble bien coïncider avec les résultats de l'immunocytochimie (ZARBIN et al., 1981 et 1983). Dans le cortex du Rat, le CCK-8 a essentiellement une action stimulatrice (voir bibliographie dans KELLY et BROOKS, 1984). Remarquons que chez cette espèce, le CCK-8 a été localisé dans des neurones corticaux contenant du GABA, neurotransmetteur dont les fonctions inhibitrices sont notoires (HENDRY et al., 1984; SOMOGYI et al., 1984).

Nos descriptions de la distribution de l'IR-CCK dans le cortex piriforme corroborent parfaitement les observations précédemment effectuées chez le Cobaye et le Rat (voir bibliographie dans VANDERHAEGHEN, 1985 et dans GALL, 1984). Elles sont de plus en bon accord avec la répartition des sites de liaisons du ^{125}I -CCK-33 dans cette région chez le Cobaye (ZARBIN et al., 1983).

Examinons pour finir, la signification du marquage de nombreux prolongements nerveux apparemment dilatés qui ont été observés dans le cortex insulaire, et dans le putamen au voisinage du claustrum. Comme cela a été précédemment décrit (SEROOGY et al., 1985), ces formations bulbeuses immunoréactives sont induites par le traitement par la colchicine et représentent les segments proximaux dilatés et engorgés d'axones à CCK. Quelquefois, comme nous l'avons illustré dans le néocortex (Pl. Id et e), c'est un corps cellulaire plus faiblement marqué qui porte cette dilatation proximale souvent très réactive qui se termine de façon abrupte pour laisser place à une fibre variqueuse ayant l'aspect typique de l'axone. Ces images de formations bulbeuses révèlent donc la présence d'un péricaryon producteur de CCK. En conséquence, le striatum postérieur du Cobaye pourrait contenir beaucoup plus de neurones CCKergiques que nous n'en avons visualisés et donc bien plus que ce

qui est rapporté chez le Rat (1-2 cellules pour une coupe de 80 um contre ici au moins 10 pour une coupe de 12 um) (TAKAGI et al., 1984).

Complexe amygdalien

Les marquages que nous avons obtenus dans l'amygdale confirment de précédents travaux qui ont aussi souligné la très dense aggrégation de fibres CCK-I dans le noyau médian (LARSSON et REHFELD, 1979 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981a et b). De façon surprenante, et comme le discutent ZARBIN et al. (1983), cette région est pauvre en sites de liaison au ^{125}I -CCK-33. Certaines de nos images d'immunocytochimie montrent pourtant clairement, en périphérie du noyau médian, là où le marquage est moins dense, que certains corps cellulaires sont couverts d'éléments punctiformes immunoréactifs (Pl.IIb). Cela suggère que les structures marquées qui occupent le noyau médian sont des sections de tels péricaryons richement innervés. On doit donc s'attendre à ce que cette région soit au moins aussi riche en fibres CCK-I de passage qu'en terminaisons CCKergiques auxquelles doivent être associés de récepteurs. Ces récepteurs du noyau médian semblent avoir été récemment visualisés par DAY et al. (1986) à l'aide de ^{125}I -CCK-8. L'observation de coupes frontales dans la région amygdalienne ne nous a pas permis d'identifier les flux axonaux qui sont à l'origine de cette innervation CCK-I très dense dans le noyau médian. Cependant, celle-ci pourrait avoir une origine extrinsèque, comme le laisse à penser la présence de fibres marquées dans la strie terminale connue pour y projeter (WOODHAMS et al., 1983 ; De OLMOS et al., 1985). D'autres discordances immunocytochimie-autoradiographie sont frappantes. Nous ne détectons, par exemple, que peu de fibres immunoréactives dans la couche plexiforme du noyau cortical alors que de fortes densités de sites de liaison au ^{125}I -CCK-33 y sont mises en évidence (ZARBIN et al., 1983). Il en va de même pour le noyau latérodorsal. Ces faits qui demeurent inexplicables pourraient être des indices reflétant l'hétérogénéité des formes moléculaires de la CCK et leur participation différentielle à la neurotransmission dans tel ou tel circuit CCKergique.

La comparaison des marquages anti-CCK obtenus dans l'amygdale, chez le Cobaye et le Rat (ROBERTS et al., 1982), fait ressortir peu de différences interspécifiques, si ce n'est une plus faible immunoréactivité du noyau central chez le Cobaye. Celle-ci pourrait s'expliquer par la virtuelle absence de corps cellulaire CCK-I dans le tegmentum ventral du Cobaye. Un tel circuit mésoamygdalien CCKergique a en effet été suggéré chez le Rat (HOKFELT et al.,

1980b) qui, par ailleurs, présente un marquage très similaire à celui du Cobaye dans le lit de la strie terminale, région riche en neurones amygdalopêtes (WOODHAMS et al., 1983).

D'une façon générale, nos observations des trajets de fibres immunoréactives dans l'amygdale du Cobaye concordent avec celles effectuées dans cette région chez le Rat par ROBERTS et al. (1982). Toutefois, bien que plusieurs arguments expérimentaux obtenus chez le Rat soient en faveur d'une origine mixte, mésencéphalique (HOKFELT et al., 1980b; FALLON et al., 1983a), corticale (ROBERTS et al., 1982 ; FALLON et al., 1983a) et intrinsèque (FALLON et SEROOGY, 1985), de l'innervation CCKergique de l'amygdale, et bien que l'existence d'efferences CCKergiques amygdalostriatales ait été proposée (MEYER et al., 1982a ; GILLES et al., 1983 ; ZARBORSZKY et al., 1985), les connexions CCKergiques du complexe amygdalien restent à préciser.

Striatum

Nous décrivons ici un marquage très faible du striatum antérieur, et de grandes concentrations de structures marquées dans le striatum postérieur, à l'inverse de ce qui a été précédemment rapporté chez le Cobaye (LARSSON et REHFELD, 1979).

En fait, nous n'avons que rarement observé, dans l'ensemble du striatum, des fibres immunoréactives à l'aspect typiquement variqueux. Celles-ci sont très dispersées, alors que la majorité de l'IR-CCK du caudé-putamen apparaît comme un matériel finement granulaire réparti de façon diffuse dans sa partie caudale. C'est dans cette région et dans le globus pallidus postérieur que nous avons observé des structures immunoréactives rubanées (voir Pl.IIIc) qui ressemblent fortement aux images des "fibres laineuses" enképhalinerigiques du striatum du Rat (HABER et ELDE, 1981), du Singe (HABER et NAUTA, 1983) et de l'Homme (HABER et WATSON, 1985) qui sont interprétées comme l'assemblage de fines fibres variqueuses marquées d'origine striatale enroulées autour d'épaisses dendrites de neurones pallidaux négatifs. Puisque, jusqu'à ce jour, CCK et enképhalines sont tenues pour exister dans des systèmes neuroniques différents dans le striatum du Cobaye (STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981a et b), quelles peuvent être les origines et destinations de telles fibres laineuses CCKergiques ?

D'assez nombreux corps cellulaires CCK-I ont été détectés dans le caudé-putamen du Cobaye, alors qu'ils sont très rares chez le Rat (TAKAGI et al., 1984). Toutefois, des résultats préliminaires nous incitent à penser que

ces neurones CCK-I striataux sont les neurones à NPY. Ces derniers constituent un système d'interneurones locaux (CHRISTIE et al., 1986) donnant une innervation bien différente des "fibres laineuses" CCK-I. Celles-ci pourraient donc avoir une origine extrinsèque, c'est à dire provenir de corps cellulaires CCK-I localisés dans des régions connues pour projeter dans le néostriatum, comme le mésencéphale (FALLON et al., 1983b), le thalamus (SUGIMOTO et al., 1985) et diverses aires corticales (voir ZABORSZKY et al., 1985).

Chez le Rat, dont le caudé-putamen est pauvre en corps cellulaires CCK-I, l'origine de l'IR-CCK néostriatale a été très discutée.

Dans cette espèce, le tegmentum mésencéphalique est très riche en neurones CCK-I (HOKFELT et al., 1980a et b ; VANDERHAEGHEN et al., 1981b). Une grande partie de ceux-ci contiennent aussi de la dopamine (DA) et contribuent au circuit mésolimbique mixte à CCK-8/DA qui projette en particulier dans les tubercules olfactifs et le noyau accumbens (HOKFELT et al., 1980a et b ; STUDLER et al., 1981 et 1984 ; WILLIAMS et al., 1981 ; FALLON et al., 1983b ; LOOPUIJT et VAN DER KOY, 1985). Une petite partie seulement des neurones CCK-I du tegmentum ventral projetterait vers le caudé-putamen (FALLON et al., 1983b ; FALLON et SEROOGY, 1985).

Chez le Cobaye, nous n'avons jamais observé de neurones marqués dans l'aire tegmentale ventrale (comme le remarquent HOKFELT et al., 1986b), et seule la substance noire latérale contient de très rares péricaryons faiblement CCK-I. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec l'IR-CCK faible de l'accumbens et des tubercules olfactifs observée dans cette espèce. Cette IR-CCK pourrait correspondre aux afférences CCKergiques corticales et amygdaliennes de ces régions comme cela a été décrit chez le Rat (voir STUDLER et al., 1985 et ZABORSZKY et al., 1985). Il paraît donc peu vraisemblable que l'IR-CCK très dense du néostriatum du Cobaye soit d'origine tegmentale.

En fait, la littérature fait état de grandes différences interspécifiques relatives à la présence de CCK dans les circuits dopaminergiques tegmentofuges ascendants (HOKFELT et al., 1980a et b, 1984b, 1985 ; MARKSTEIN et HOKFELT, 1984 ; MICELI et al., 1987). D'autres origines ont été proposées chez le Rat pour la CCK néostriatale. Par des dosages de ses concentrations après diverses lésions chirurgicales, certains auteurs lui attribuent une origine essentiellement cortico-amygdalienne (MEYER et al., 1982a), et d'autres une origine mixte, mésencéphalique et corticale (MARLEY et al., 1982 ; GILLES et al., 1983).

L'hypothèse de projections denses cortico- et amygdalo-striatales demeure plausible chez le Cobaye puisque de très nombreux neurones CCK-I sont présents dans les aires néocorticales, le cortex piriforme et le complexe amygdalien.

Toutefois, une très vaste population de neurones CCK-I a été récemment mise en évidence dans le thalamus du Chat (WAHLE et ALBUS, 1985). Certains de ces neurones CCK-I projettent dans le striatum (SUGIMOTO et al., 1985). La population neuronique CCK-I que nous avons détectée dans le thalamus du Cobaye est très semblable à celle décrite chez le Chat, ce qui suggère l'existence de circuits CCKergiques thalamo-striataux chez le Cobaye et qui donc rend plausible l'hypothèse d'une origine mixte (corticale et thalamique) de la CCK néostriatale dans cette espèce. Notons cependant qu'il a été rapporté chez le Chat, avec la présence de nombreux neurones CCK-I dans le tegmentum mésencéphalique, ainsi que de fortes analogies entre les distributions des fibres CCK-I et dopaminergiques dans le striatum (MARKSTEIN et HOKFELT, 1984 ; HOKFELT et al., 1984b et 1985). Cela suggère que dans cette espèce, l'innervation CCKergique serait d'origine mixte, thalamique et mésencéphalique, et peut être même aussi en partie corticale puisque de nombreux corps cellulaires CCK-I sont présents dans le cortex du Chat (voir FREUND et al., 1986).

Le rôle de la CCK dans le striatum pourrait consister en une modulation complexe de l'activité dopaminergique (voir bibliographie dans MARTIN et al., 1986, dans FREEMAN et BUNNEY, 1987, et dans GYSLING et BEINFELD, 1987).

Noyaux du lit de la strie terminale

Les marquages que nous avons obtenus dans la région des noyaux du lit de la strie terminale du Cobaye sont tout à fait comparables à ceux décrits dans la même région chez le Rat (WOODHAMS et al., 1983). Peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne le rôle de la CCK dans cette région. Les connexions CCKergiques des noyaux du lit de la strie terminale sont elles aussi mal connues, bien que cette région soit très riche en structures CCK-I. Citons pour mémoire les aires amygdaliennes, septo-préoptiques et hypothalamiques antérieures comme territoires cibles des neurones du lit de la strie terminale (De OLMOS et al., 1985).

Septum

Nos résultats font état du marquage, dans le septum, de concentrations modérées de fibres variqueuses verticalement orientées et surtout visibles dans les parties latéroventrales de cette région, ainsi que de terminaisons

périsomatiques réparties dans le septum latéral en général. Ces deux observations suggèrent que des afférences CCKergiques d'origine ventrale innerveraient modérément le septum.

Chez le Rat, les fibres CCKergiques septales ont été interprétées comme étant issues de circuits mésolimbiques HOKFELT et al., 1980a et b) hippocampofuges (GREENWOOD et al., 1981 ; voir bibliographie dans TOTTERDELL et SMITH, 1986). Nous avons mentionné plus haut la non visualisation chez le Cobaye du circuit CCKergique mésolimbique. Cependant, chez cette espèce, de nombreux neurones sont présents dans le complexe hippocampique (GALL, 1984).

Toutefois, les marquages anti-CCK-8 obtenus dans le septum, de par leur ressemblance avec l'innervation POMCergique tubérofuge de cette région (KHACHATURIAN et al., 1985), évoquent plutôt l'éventuelle existence de circuits "CCKergiques" hypothalamo-septaux ascendants. Chez le Cobaye, des corps cellulaires CCK-I sont en effet localisés dans le noyau arqué (CIOFI et TRAMU, 1985) et pourraient donc être à l'origine des fibres et terminaisons visualisées dans le septum (voir la deuxième partie du mémoire).

Régions préoptiques

Nous avons décrit un marquage intense de la région préoptique lato sensu chez le Cobaye. Comme cela a été rapporté chez le Rat, l'ovlt est pauvre en IR-CCK. Celle-ci a surtout été détectée dans un organe circumventriculaire que nous avons nommé "préoptico-commissural" (pco) eu égard à sa localisation (Pl.Vb). Cette structure remarquable semble ne pas exister chez le Rat. L'origine de l'innervation CCKergique du pco du Cobaye nous est inconnue. Pourrait-elle être en relation avec l'important groupe de neurones visualisés dans le noyau préoptique médian? A notre connaissance, il n'a pas été mis en évidence de population neuronique CCK-I identiquement localisée dans l'aire préoptique du Rat (SIMERLY et SWANSON, 1987). L'IR-CCK du pco et de l'organe subfornical semblent être variables d'un animal à l'autre, ce qui reflète peut être les fluctuations de paramètres homéostasiques inconnus.

Si l'on excepte ces deux différences interspécifiques, ainsi que l'absence de marquage du noyau suprachiasmatique que nous avons constaté chez le Cobaye, les structures CCK-I sont apparemment identiquement distribuées chez le Cobaye et le Rat.

Chez cette dernière espèce, un des rôles exercés par la CCK dans l'aire préoptique serait la modulation des fonctions sexuelles. L'innervation CCK-I des régions riches en cellules gonadolibérinergiques (SIMERLY et al., 1986 ;

SIMERLY et SWANSON, 1987), l'existence d'un dimorphisme sexuel de la distribution des structures CCK-I dans l'aire préopticohypothalamique (MICEVYCH et al., 1987), ainsi que l'action sur la sécrétion de LH qu'a le CCK-8 injecté in vivo dans cette région (KIMURA et al., 1983 ; HASHIMOTO et KIMURA, 1986), sont autant d'arguments expérimentaux en faveur d'une telle hypothèse. Nous reprendrons cette discussion dans la seconde partie de ce travail.

Hypothalamus et neurohypophyse

Nos résultats relatifs à l'hypothalamus du Cobaye font état d'une IR-CCK intense, dont la distribution diffère par deux points de ce qui est décrit chez le Rat. Ces deux différences interspécifiques frappantes sont, d'une part la virtuelle absence de marquage anti-CCK-8 des neurones magnocellulaires du NPV et du NSO, et d'autre part la présence de nombreux corps cellulaires immunoréactifs dans l'ensemble de l'ARC (CIOFI et TRAMU, 1985 et 1986a, b et c).

La présence de CCK dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire du Rat est unanimement reconnue. Plusieurs auteurs font état chez cet animal, d'un marquage intense de nombreux neurones magnocellulaires à la fois dans le NPV et le NSO, et de la présence de fortes concentrations de fibres CCK-I dans le lobe nerveux de l'hypophyse (VANDERHAEGHEN et al., 1978, 1980a, 1981a et 1985 ; LOREN et al., 1979a ; VANDERHAEGHEN, 1981 ; DESCHEPPER et al., 1983 ; KISS et al., 1984a ; PALKOVITS et al., 1984 ; REHFELD et al., 1984 ; MICEVYCH et al., 1987). De fait, ces neurones magnocellulaires CCK-I projettent dans la neurohypophyse (BEINFELD et al., 1980 ; KISS et al., 1984a ; PALKOVITS et al., 1984), et sont, pour une grande partie d'entre eux, des cellules ocytocinergiques (VANDERHAEGHEN et al., 1981a ; MARTIN et al., 1983). Dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire du Rat, l'IR-CCK représente essentiellement le CCK-8 (BEINFELD et al., 1980 ; MARLEY et al., 1984b), qui semble intimement liée aux fonctions des systèmes à neurophysine (BEINFELD et al., 1980 ; ANHUT et al., 1983 ; DESCHEPPER et al., 1983 ; MARLEY et al., 1984a).

Chez le Cobaye, l'absence d'IR-CCK que nous avons constatée dans les neurones magnocellulaires doit être rapprochée du très faible nombre de fibres marquées dans le lobe nerveux. Ces observations ont été faites à la fois chez des animaux colchicinisés et chez des animaux normaux, ce qui permet d'exclure que cette absence de marquage soit due à un effet indésirable de la colchicine. D'autre part, nos immunosérums anti-CCK-8 marquent parfaitement l'axe

G17 Chat		?-----A-----
G34 Porc	---	L-----LA-----M-----
G33 Chinchilla	--EP-G-P--GT--S-----	A A-----
G33 Cobaye	---P-V-A--RT--S-----	A A-----
G34 Homme	§ <u>ELGPOGPPHLVADPSKKQGPWLEEEEEAY</u> ^s <u>GW</u> MDF*	
G17 Rat		?-R-P-----
G34 Chèvre	-----D---M---S-----	V---A-----
G17 Ov, Bov		?---V---A-----
G34 Chien	-----Q-----S-----	A-----

Fig 8 : SEQUENCES CONNUES DE DIFFERENTES GASTRINES, comparées à la gastrine humaine.

Les séquences données sont celles de molécules purifiées extraites du tube digestif.

Les aminoacides en position identique sont représentés par des tirets.

G17, "little gastrin" ; G34, "big gastrin".

G17 Ov, Bov : G17 ovine et bovine.

Les lettres soulignées indiquent la séquence commune avec la cholécystokinine (trait discontinu), la séquence utilisée comme haptène dans la préparation de l'IS-14 (trait continu) et l'IS-15 (points).

Noter que la G33 de Cobaye, et celle du Chinchilla, sont les molécules les plus éloignées structurellement de la G34 humaine (la "little gastrin" étant un hexadecapeptide), et que l'hexapeptide N-t de la G17 de Rat comporte deux substitutions par rapport à la molécule d'origine humaine.

§E, Acide pyroglutamique

* , Extrémité C- amidée

°, Radical = H ou SO₃H

?, Extension N-t de la G17 non séquencée après purification de l'hormone (Rat) ou inconnue (Chat, Boeuf et Mouton).

Références : BONATO et al., 1986a et b ; REEVE et al., 1981 ; SHINOMURA et al., 1987.

Abbréviations utilisées pour les acides aminés :

Ala, A : alanine ; Arg, R : arginine ; Asn, N : asparagine ; Asp, D : acide aspartique ; Asx, B : asparagine ou acide aspartique ; Cys, C : cystéine ; Gln, Q : glutamine ; Glu, E : acide glutamique ; Glx, Z : glutamine ou acide glutamique ; Gly, G : glycine ; His, H : histidine ; Ile, I : isoleucine ; Leu, L : leucine ; Lys, K : lysine ; Met, M : méthionine ; Phe, F : phénylalanine ; Pro, P : proline ; Ser, S : sérine ; Thr, T : thréonine ; Trp, W : tryptophane ; Tyr, Y : tyrosine ; Val, V : valine.

hypothalamo-neurohypophysaire du Rat, ainsi que celui de la Souris. Quelle est donc la signification de l'absence d'IR-CCK dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du Cobaye ?

Très récemment, MICELI et al. (1987) ont rapporté l'absence totale de marquage anti-CCK-8 dans les neurones parvi- et magnocellulaires du NPV chez le Hamster. En revanche, la présence d'IR-CCK a été décrite dans les neurones magnocellulaires hypothalamiques chez le Boeuf (VANDERHAEGHEN et al., 1980b, 1981a et b ; REHFELD et al., 1984), le Chien et le Singe (LOTSTRA et al., 1980), et dans une dense innervation de la neurohypophyse chez le Boeuf et le Chien (VANDERHAEGHEN et al., 1980b, 1981a et b), chez le Chat et le Porc (LARSSON et REHFELD, 1981 ; REHFELD et al., 1984).

Ces différences interspécifiques révélées par l'immunohistochimie sont de plus doublées de différences interspécifiques concernant la nature du matériel immunoréactif contenu dans le système magnocellulaire de chacun de ces mammifères. Ainsi, chez le Rat, le Boeuf et le Mouton, le lobe nerveux contient essentiellement de la CCK (BEINFELD et al., 1980 ; BEINFELD, 1982 ; REHFELD et al., 1984 ; BEINFELD et CIARLEGLIO, 1985). Il contient à la fois la CCK et son hormone apparentée, la gastrine, en concentrations relatives non négligeables chez le Singe Rhésus et l'Homme (REHFELD et al., 1984 ; BEINFELD et CIARLEGLIO, 1985), et renferme presque exclusivement de la gastrine chez le Chat et le Porc (LARSSON et REHFELD, 1981 ; REHFELD et al., 1984).

L'absence d'IR-CCK du système magnocellulaire du Cobaye reflète-t-elle donc la présence exclusive de gastrine dans ce chez cette espèce ?

Bien que LARSSON et REHFEL (1979a) aient détecté de faibles concentrations de gastrine dans le SNC du Cobaye, les résultats négatifs de l'immunocytochimie ne sauraient s'expliquer totalement de cette façon. En effet, conformément à l'homologie structurale notoire qui touche les pentapeptides C-t des deux molécules (DOCKRAY, 1976 et 1978 ; REHFELD, 1981a et b), nos anti-CCK-8 croisent avec la gastrine (voir Matériel et Méthodes), ce qui est illustré par les bons marquages du système hypothalamo-neurohypophysaire obtenus par leur emploi chez le Porc (non illustré). Toutefois, ces mêmes immunsérums ne donnent qu'un faible marquage du lobe nerveux chez le Chat, par ailleurs qualitativement comparable à celui observé chez le Cobaye. Des différences structurales entre les gastrines d'origine porcine (voir BONATO et al., 1986a), (voir REEVE et al., 1981) et cavine (voir BONATO et al., 1986b), en dehors du pentapeptide C-t portant l'essentiel de l'activité biologique de la molécule (voir Fig.8), pourraient engendrer des conformations stériques différentes des trois molécules qui seraient alors reconnues différenciellement par nos anticorps anti-CCK-8. Ce qui expliquerait

la non visualisation de l'hypothétique gastrine neurohypophysaire chez le Cobaye. Nous ne perdons pas non plus de vue que, dans telle ou telle espèce, la gastrine puisse conserver au moins une partie de l'extension C-t présente dans son précurseur (pro-gastrine), ou qu'elle puisse ne pas contenir la séquence commune à la CCK sous sa forme complète et amidée (REHFELD et LARSSON, 1981 ; REHFELD, 1986).

Ces remarques restent valables dans le cas où de la CCK non visualisée plutôt que de la gastrine serait présente dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du Cobaye. La CCK intestinale du Cobaye a été partiellement séquencée. Cette espèce est jusqu'à présent la seule chez laquelle l'on ait identifié une substitution d'acide aminé dans l'octopeptide C-t (ZHOU et al., 1985) (voir Fig.9). Puisque cela a toujours été le cas chez les autres mammifères (GUBLER et al., 1984); on peut s'attendre à ce que chez le Cobaye, CCK neurale et intestinale soient identiques. Cette substitution (Val au lieu de Met³) dans le CCK-8 du Cobaye ne semble pourtant pas gêner outre mesure sa détection immunocytochimique et immunologique dans l'ensemble du SNC si l'on s'en réfère aux travaux précédemment publiés ainsi qu'à nos propres résultats. Il est donc peu probable que, si tel en était le cas, cette substitution particulière au Cobaye soit la cause de l'absence d'IR-CCK dans les neurones magnocellulaires hypothalamiques.

Dans le but d'apporter une réponse aux questions posées par l'existence de telles différences interspécifiques dans la distribution de l'IR-CCK-8 dans le système hypothalamo-neurohypophysaire des mammifères, nous avons préparé deux immunsérums dirigés, l'un contre l'hexapeptide N-terminal de la gastrine 17 humaine, l'autre contre l'heptadecapeptide N-terminal de la gastrine 34 humaine (voir Tableau 1 et Fig.8). Aucun de ces immunsérums n'a donné de résultats positifs ni chez le Cobaye ni chez le Rat, alors qu'ils marquent tous deux parfaitement la neurohypophyse porcine (non illustré). Ces résultats suggèrent que l'hypothalamus du Cobaye ne contient pas de gastrine. Toutefois, la gastrine du Cobaye (ZHOU et al., 1985) est assez différente structuralement de la gastrine humaine (Fig.8) contre laquelle ont été produits nos immunsérums, ce qui expliquerait l'inefficacité de ces derniers chez un Rongeur.

Compte-tenu de l'existence de variantes dans le métabolisme post-traductionnel des pré-pro-hormones qui semble caractériser le système "gastrine/cholecystokinine" (ENG et al., 1982 ; GUBLER et al., 1984 ; REEVE et al., 1986 ; REHFELD et HANSEN, 1986), nos résultats immunocytochimiques ne nous permettent donc pas de conclure de façon définitive sur la signification de l'absence d'IR-CCK-8 constatée dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du

Cobaye.

Si nous n'avons pas pu marquer les neurones magnocellulaires chez le Cobaye, comment expliquer alors la présence de quelques fibres variqueuses CCK-I dans la tige pituitaire et le lobe nerveux ? Comme nous le verrons dans la seconde partie de ce mémoire, nous pensons pouvoir attribuer une origine précise (noyau arqué) à cette faible innervation CCK-I.

Si, dans le NPV, les neurones magnocellulaires ne sont pas marqués, en revanche, de nombreux neurones parvicellulaires ont réagi, confirmant chez le Cobaye les observations précédemment effectuées chez le Rat (LOREN et al., 1979a ; VANDERHAEGHEN et al., 1980a ; KISS et al., 1984a, PALKOVITS et al., 1984 ; MICEVYCH et al., 1987).

Dans cette dernière espèce, il a été montré que des neurones parvicellulaires CCK-I envoient leur axone au contact des vaisseaux portes dans la zone externe de l'émience médiane (KISS et al., 1984a), où une IR-CCK périportale modérément dense est décrite (HOKFELT et al., 1978 ; LOREN et al., 1979a ; ANHUT et al., 1983 ; DESCHEPPER et al., 1983 ; KISS, 1985 ; VANDERHAEGHEN et al., 1985). Celle-ci semble être sensible à des modifications physiologiques comme la surrénalectomie, qui provoque sa disparition (ANHUT et al., 1983 ; DESCHEPPER et al., 1983). Cette IR-CCK intraxonale de l'émience médiane externe représente bien de la CCK susceptible d'être exocytée (ANHUT et al., 1983), ce qui suggère donc l'existence d'un tractus paraventriculo-infundibulaire CCKergique à compétence très vraisemblablement hypophysiotrope. Ces vues sont renforcées par plusieurs études in vitro montrant que la CCK, et en particulier le CCK-8, possède des propriétés sécrétagogues intrinsèques. Nous retiendrons surtout ici son action stimulatrice sur la sécrétion d'ACTH (MEZEY et al., 1986 ; mais voir ITOH et al., 1979 et aussi SANDER et PORTER, 1982) et de β -endorphine (MEYER et al., 1982c ; MATSUMURA et al., 1983).

Dans leur ensemble, ces observations sont en faveur de l'intervention de la CCK dans l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien comme un co-facteur corticotrope, et rappellent donc de façon frappante les études relatives à la présence de vasopressine (VP) dans le circuit paraventriculo-infundibulaire corticolibérinergique chez le Rat surrénalectomisé (TRAMU et PILLEZ, 1982 ; TRAMU et al., 1983 et 1984 ; KISS et al., 1984b ; SAWCHENKO et al., 1984 ; ALONSO et al., 1986 ; MEZEY et al., 1986 ; PLOTSKY et SAWCHENKO, 1987 ; mais voir aussi WHITNALL et al., 1987).

Des travaux immunohistochimiques ont donc examiné l'éventualité de la coexistence de CCK et de corticolibérine (CRF) dans les neurones

parvicellulaires du NPV. Chez le Rat non surrénalectomisé, l'IR-CCK et l'IR-CRF sont apparemment contenues dans des systèmes différents. La surrénalectomie du Rat provoque l'apparition d'IR-VP et/ou d'IR-CCK dans de nombreux neurones à CRF, d'autres cellules parvicellulaires ne présentant que l'une des trois immunoréactivités (CRF, VP, ou CCK) (MEZEY et al., 1986). Les neurones parvicellulaires ne montrant que l'IR-CCK après et/ou avant surrénalectomie constituent peut être les circuits paraventriculo-infundibulaires CCKergiques responsables d'autres régulations qui sont reflétées par les actions in vitro de la CCK sur les sécrétions hypophysaires somatotrope (MORLEY et al., 1979 ; MATSUMURA et al., 1984), et mammothrope (MALARKEY et al., 1981 ; mais voir aussi VIJAYAN et al., 1978 et 1979).

Que ces fonctions hypophysaires soient régulées par de la CCK en provenance de neurones situés en dehors du NPV mais contribuant aussi au système hypothalamo-infundibulaire demeure cependant plausible. Obtenir une telle réponse chez le Rat à l'aide de l'immunocytochimie appliquée à l'étude de la coexistence CCK/CRF dans l'éminence médiane est une tâche rendue impossible par le fait qu'après surrénalectomie l'IR-CCK disparaît progressivement de la zone externe (ANHUT et al., 1983 ; DESCHEPPER et al., 1983 ; MEZEY et al., 1986).

Nous avons entrepris l'étude comparée de la distribution des IR-CRF et IR-CCK chez le Cobaye normal. Dans cette espèce, comme chez le Rat, la surrénalectomie provoque l'apparition d'IR-VP dans le système paraventriculo-infundibulaire à CRF (TRAMU et PILLEZ, 1982 ; TRAMU et al., 1983 et 1984). Chez l'animal normal colchicinisé, de nombreux neurones parvicellulaires CCK-I sont distribués dans le NPV et présentent une distribution très similaire à celle des cellules à CRF. Nous avons montré ici, grâce à la technique du double marquage avec élution des anticorps (TRAMU et al., 1978), que chez le Cobaye, la coexistence CCK/CRF pouvait être mise en évidence dans un faible nombre de neurones parvicellulaires sans surrénalectomie et donc dans des conditions où la fonction corticotrope n'est pas surstimulée. Nous avons de plus effectué des comparaisons des distributions respectives des innervations périportales CCKergiques et CRFergiques dans l'éminence médiane du Cobaye, celle-ci s'y prêtant bien car étant de plus grande taille et mieux régionalisée que celle du Rat. La parfaite identité des distributions des deux innervations périportales, ainsi que la démonstration de la coexistence d'IR-CCK et d'IR-CRF dans des fibres variqueuses dans la zone externe, sont des arguments morphologiques qui suggèrent très fortement que, chez le Cobaye, l'innervation périportale CCK-I est identique à et représente la plus grande partie de l'innervation CRFergique (CIOFI et TRAMU, 1986a). Toutefois la démonstration définitive de la

coexistence de CCK et de CRF dans les terminaisons périportales des axones paraventriculo-infundibulaires ne pourra bien sûr qu'être apportée par la microscopie électronique. D'autre part, savoir si, comme dans le cas de la coproduction de CRF et de VP (WHITNALL et al., 1985), les deux neuropeptides sont stockés dans les mêmes granules neurosécrétoires demeure aussi primordial.

Dans leur ensemble, les résultats immunohistochimiques que nous avons obtenus chez le Cobaye, confirment bien les observations effectuées chez le Rat (MEZEY et al., 1986), et de plus, tendent à attribuer une origine essentiellement paraventriculaire à l'innervation périportale CCKergique mise en évidence dans l'éminence médiane chez cette espèce.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la distribution de l'IR-CCK dans l'hypothalamus médiobasal du Cobaye diffère de ce qui est décrit chez le Rat par la présence de nombreux péricaryons CCK-I dans le noyau arqué. Ce marquage anti-"CCK/gastrine" que nous avons décrit pour la première fois chez un Mammifère (CIOFI et TRAMU, 1985 et 1986a) a aussi été rapporté chez un Poisson (DOERR-SCHOTT et al., 1979a et b), un Amphibien (NOTENBOOM et al., 1981) et un Reptile (REINER et BEINFELD, 1985), ce qui suggère qu'il n'est pas une exception, et que la mise en place d'un système "CCKergique" dans l'infundibulum s'est effectué relativement tôt chez les Vertébrés. Nous avons recherché si ce marquage pouvait être obtenu chez d'autres Mammifères et l'avons mis en évidence chez le Chat (CIOFI et TRAMU, 1986b et c), le Lapin (non illustré) et l'Homme, ce qui lui procure un caractère plus "universel".

C'est à l'étude de la signification de ce marquage anti-CCK-8 et à celle des projections du système neuronique visualisé, que nous avons consacré la seconde partie de ce mémoire. Nous y présentons des arguments qui nous conduisent à considérer que ces neurones constituent un système tubéro-extra-infundibulaire multipeptidergique vraisemblablement impliqué dans d'importantes rétroactions physiologiques centrales.

Hormis l'absence de l'IR-CCK dans le système hypothalamo-neurohypophysaire et sa présence dans un système neuronique du noyau arqué, la distribution des structures CCK-I dans l'hypothalamus du Cobaye reflète parfaitement ce qui est décrit chez le Rat (VANDERHAEGHEN, 1985).

La présence de péricaryons CCK-I est signalée chez le Rat, comme nous l'avons observé chez le Cobaye, dans l'aire hypothalamique dorsale, le noyau dorsomédian, l'hypothalamus latéral et postérieur (voir MICEVYCH et al., 1987).

Les fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives semblent être aussi détectées dans les mêmes régions hypothalamiques chez les deux espèces. On remarquera particulièrement la concentration importante de fibres et terminaisons marquées dans le noyau ventromédian. Chez le Rat, celles-ci sont des efférences CCKergiques du noyau parabrachial relayant des informations en provenance du complexe vagal (PALKOVITS et al., 1982 ; INAGAKI et al., 1984 ; YAMANO et al., 1984 ; ZABORSKY et al., 1984 ; FALLON et SEROOGY, 1985 ; DAY et al., 1986 ; AKESSON et al., 1987). Dans ce circuit, la CCK serait impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (FULWILLER et SAPER, 1985 ; KOW et PFAFF, 1986). Soulignons pour finir que, comme nous le verrons plus loin, une partie de l'innervation CCK-I du diencephale du Cobaye pourrait être issue des neurones du noyau arqué.

Adénohypophyse

Nous avons rapporté ici une IR-CCK très intense dans l'adénohypophyse du Cobaye. Celle-ci intéresse, comme nous l'avons démontré, la majorité des cellules corticomélanotropes. Des observations similaires ont été précédemment effectuées à l'aide d'anticorps reconnaissant la partie C-t de la CCK chez le Chien, le Chat, le Porc et l'Homme, alors qu'aucun marquage n'a été décrit dans l'adénohypophyse du Rat (LOTSTRA et al., 1980 ; LARSSON et REHFELD, 1981 ; VANDERHAEGHEN, 1981 et 1985 ; VANDERHAEGHEN et al., 1985). Suivant l'espèce, l'IR-CCK gastrine de l'adénohypophyse refléterait l'existence simultanée ou non de CCK et de gastrine, présentes en concentrations relatives variables, ou parfois non détectables immunocytochimiquement (REHFELD, 1978c et 1986 ; LARSSON et REHFELD, 1981 ; REHFELD et LARSSON, 1981 ; BEINFELD, 1982 ; REHFELD et al., 1984 et 1985 ; BEINFELD et CIARLEGLIO, 1985 ; VANDERHAEGHEN et al., 1985). Comme nous l'avons exposé plus haut, nous n'avons pu obtenir aucun marquage sur l'adénohypophyse du Cobaye à l'aide d'immunsérums anti-(1-6)hG17 et anti-(1-17)hG34, ce qui suggère que l'IR-CCK qu'on y détecte est due à la présence de CCK vraie.

Le rôle des différentes formes de CCK et de gastrine adénohypophysaires est encore inconnu. Pourraient-elles n'avoir que des actions intercellulaires locales ? Ou pourraient-elles être sécrétées vers des organes cibles lointains (et lesquels) comme les dérivés de la pro-opiomélanocortine qu'elles accompagnent ?

Si tel était le cas, la recherche d'un facteur hypophysiotrope spécifique devrait être entreprise. Pourrait-il s'agir du CRF ? De façon surprenante, la

présence de ces molécules dans l'adénohypophyse n'a pas suscité l'intérêt que l'on aurait pu attendre. Peut être est-ce dû en partie à leur virtuelle absence de l'adénohypophyse de Rat, seule à être couramment cultivée in vitro.

De même, que dire de l'existence d'IR-CCK dans les cellules thyroïotropes? Nous ne savons s'il s'agit ou non de la même entité moléculaire que celle présente dans les cellules corticomélanotropes, ni si elle est sécrétée, et si oui dans quelles conditions. La CCK/gastrine ne possède pas d'activité en tant que stimuline hypophysaire. Ce n'est pourtant pas le seul peptide à avoir été détecté dans la cellule thyroïdienne, puisque différents auteurs y ont mis en évidence des enképhalines (TRAMU et LEONARDELLI, 1979 ; BEAUVILLAIN et al., 1980) et de la substance P (DE PALATIS et al., 1982).

Très récemment, il a été implicitement suggéré que chez le Porc (REHFELD, 1986), la CCK adénohypophysaire se trouvait sous forme inactive car amputée de son octopeptide C-t, et qu'elle pourrait n'être pas sécrétée dans la circulation générale. A notre avis, rien n'indique que l'activité de ces formes de gastrine et de CCK supposées être sécrétées par l'hypophyse dans le sang périphérique soit aussi portée par cette fraction C-t dont l'existence n'est pas non plus à priori obligatoire.

Thalamus

De très nombreux corps cellulaires ont réagi dans le thalamus du Cobaye. Chez le Rat, aucun péricaryon CCK-I n'a pu être visualisé dans cette région (VANDERHAEGHEN, 1985). Cette différence interspécifique majeure est cependant retrouvée chez le Chat dans le thalamus duquel la même population neuronique CCK-I a été décrite (WAHLE et ALBUS, 1985). De plus, dans cette espèce, ces neurones contiendraient aussi, avec la CCK, la neurotensine et/ou les enképhalines (SUGIMOTO et al., 1985). Cette population de neurones multipéptidergiques projetterait, entre autres régions, dans le striatum et les couches profondes du cortex (SUGIMOTO et al., 1985). Chez le Hamster (MICELI et al., 1987), seul le noyau paraténial soutient quelques neurones CCK-I.

Comment expliquer l'absence d'IR-CCK dans un tel système chez le Rat ?

La réponse réside, nous semble-t-il, dans une étude autoradiographique récente de l'hybridation in situ d'une sonde ribonucléotidique complémentaire de l'ARN messager du CCK sur des coupes de cerveau de Rat. Les résultats présentés dans ce travail démontrent la liaison de cette sonde ribonucléotidique dans des neurones thalamiques (SIEGEL et YOUNG, 1985). Cela suggère fortement que dans ces neurones, le gène de la CCK est transcrit en un

ARN messenger qui doit être traduit en une pré-pro-CCK dont le métabolisme post-traductionnel ne conduit pas à un peptide reconnaissable par les anticorps utilisés jusqu'à présent par différents auteurs chez le Rat. Il existerait donc bien un système CCKergique dans le thalamus du Rat.

La même hypothèse pourrait être avancée pour expliquer d'une part chez le Cobaye, l'absence de marquage anti-CCK-8 des systèmes mésolimbiques et hypothalamoneuro-hypophysaires, et d'autre part, celle chez le Rat, des neurones du noyau arqué.

Cette interprétation rejoint les conclusions d'une étude biochimique récente montrant que différentes formes moléculaires de la CCK, portant des extensions ou/et des délétions N-t ou C-t importantes pouvaient être extraites du cerveau (REHFELD et HANSEN, 1986), ce qui reflète certainement, au delà de l'hétérogénéité moléculaire du neuromodulateur, l'hétérogénéité fonctionnelle des neurones CCKergiques du SNC.

CONCLUSION GENERALE

Pris dans leur ensemble, nos résultats morphologiques ont fait apparaître que la distribution de l'IR-CCK dans l'hypophyse, le système limbique et les aires corticales adjacentes du SNC du Cobaye tricolore (Cavia porcellus L.) s'écarte de ce qui est décrit chez le Rat de par :

* son absence :

- du système méso-limbique,
- du noyau suprachiasmatique,
- du système hypothalamo-neurohypophysaire,

* sa présence :

- dans des interneurons multipéptidergiques du néostriatum,
- dans des neurones du noyau préoptique médian,
- dans l'innervation d'une structure circumventriculaire particulière au Cobaye et dénommée ici "organe préoptico-commissural", dont le rôle reste à définir,
- dans des neurones multipéptidergiques tubéro-extra-infundibulaires du noyau arqué,
- dans des neurones thalamiques probablement en partie striatopètes et corticopètes,
- dans les cellules corticomélanotropes et thyroïdotropes de l'adénohypophyse.

De par ses limites, l'immunohistochimie, ne saurait bien entendu pas apporter, à elle seule, une signification définitive aux différences interspécifiques que nous avons mises en évidence.

L'absence d'IR-CCK dans tel ou tel système ne reflète pas forcément l'absence de synthèse du peptide neuromodulateur par le neurone.

En outre, comme nous en avons discuté déjà, il nous paraît raisonnable de penser, en s'appuyant sur des données biochimiques récentes (REHFELD et HANSEN, 1986) et sur des résultats d'hybridation in situ (SIEGEL et YOUNG, 1985), que les différences de marquages observées entre espèces révèlent plutôt des variantes du métabolisme post-traductionnel de la préprohormone d'un système neuronique et d'une espèce à l'autre.

SECONDE PARTIE

La cholécystokinine du noyau arqué: sa colocalisation avec divers neuropeptides
chez quelques Mammifères dont l'Homme.

INTRODUCTION

L'hypothalamus médiobasal a un rôle important dans le contrôle de l'activité hypophysaire.

Il est essentiellement représenté par le noyau arqué (NARC) et l'éminence médiane, qui constituent la région infundibulaire.

Celle-ci fut à l'origine considérée comme l'aire hypophysiotrope (HALASZ et al., 1962) contenant les neurones producteurs des facteurs hypothalamiques responsables du contrôle neuroendocrine de l'antéhypophyse (voir HARRIS, 1971).

Par la suite, la notion d'aire hypophysiotrope a dû être étendue à l'ensemble de l'hypothalamus. En effet, parmi les différents systèmes neuroniques neuroendocrines identifiés jusqu'à ce jour (pour une revue récente, voir HOFFMAN et al., 1986), seul le système somatolibérinergique, dernier caractérisé (BLOCH et al., 1984b), est localisé dans le NARC.

Il y constitue un système tubéro-infundibulaire peptidergique analogue au système tubéro-infundibulaire dopaminergique auquel il s'intègre partiellement (voir HOKFELT et al., 1986a).

De nombreux autres systèmes peptidergiques sont localisés dans le NARC (voir EVERITT et al., 1986). Leur participation aux projections peptidergiques périportales est de mieux en mieux définie (voir la discussion). Il ressort cependant des études actuelles de la neuroanatomie chimique du NARC que cette région contient de nombreux neurones peptidergiques qui projettent leurs axones non pas dans l'éminence médiane, mais en dehors de la région infundibulaire, comme le suggéraient d'ailleurs de plus anciens travaux électrophysiologiques (voir MAKARA et HODACZ, 1975).

C'est sur trois de ces systèmes tubéro-extra-infundibulaires du NARC que nous avons centré l'étude que nous présentons et discutons ici.

RESULTATS

Les observations rapportées ici sont le fruit d'une étude immunohistochimique comparée de la distribution de plusieurs immunoréactivités anti-neuropeptide dans l'aire hypophysiotrope (noyau arqué et éminence médiane) de quatre Mammifères.

La population neuronique du NARC à IR-CCK initialement mise en évidence chez le Cobaye a été comparée chez cet animal à d'autres systèmes neuroniques de la même région qui montrent des caractéristiques cytoarchitectoniques et topographiques semblables. Ces derniers sont représentés par les populations neuroniques marquées par des immunsérums anti-somatolibérine humaine (hGHR1-44NH₂, hGHRF), anti-neuropeptide Y (NPY), anti-somatostatine (SOM), ainsi que par les neurones contenant la pro-opiomélanocortine (POMC) et ses dérivés.

Cette étude comparée chez le Cobaye nous a permis, en particulier, de mettre évidence la colocalisation d'IR-CCK, IR-hGHRF et d'IR-NPY dans une même et vaste population neuronique du NARC, et a été par la suite étendue à d'autres espèces (Chat, Rat, Homme) dans le but de nous assurer qu'il ne s'agissait pas d'une particularité du Cobaye.

L'exposé des résultats obtenus commence par un bref rappel méthodologique qui sera suivi de remarques d'ordre général.

I - RAPPEL METHODOLOGIQUE

Quel que soit le tissu étudié, le même protocole est adopté. Des séries de coupes toutes adjacentes entre elles sont récupérées et traitées chacune par les immunsérums dont nous voulons comparer les marquages.

Pratiquement, trois séries de coupes adjacentes subissent deux réactions immunohistochimiques successives avec élution des anticorps, selon la séquence suivante : la première série subit une première réaction anti-NPY, puis, après élution des anticorps, une seconde réaction détectant la POMC ; la seconde et la troisième série sont respectivement incubées par des anti-CCK et des anti-hGHRF, puis, après élution, sont toutes deux traitées par des anti-NPY. Les marquages obtenus en premier temps, préalablement photographiés, sont comparés aux nouvelles réactions.

Dans des expérimentations parallèles, les marquages anti-NPY et

anti-hGHRF ont été comparés aux marquages, anti-CTPG, anti-SOM et anti-(ACTH/Bendorphine), sur coupes adjacentes ou sur les mêmes coupes après une, voire deux éluions (soit deux ou trois marquages successifs).

Précisons cependant, que la sensibilité des différents antigènes au traitement chimique de l'éluion est variable, ce qui détermine un ordre à suivre dans la réalisation des différentes réactions immunohistochimiques. Ainsi, les réactions anti-CCK et anti-hGHRF doivent impérativement être effectuées dans le premier temps. Les réactions anti-CTPG, anti-ACTH et anti- β -endorphine sont aisément effectuées après une première éluion, alors que les marquages anti-NPY et anti-SOM demeurent inchangés après deux éluions.

Les caractéristiques des différents immunosérums utilisés sont rapportées dans le chapitre Matériel et Méthodes (Tableau 1).

II - GENERALITES

Chez le Cobaye, le Chat et le Rat, la visualisation de péricaryons dans le NARC nécessite le traitement par la colchicine. Ce dernier n'altère par ailleurs en rien la distribution des fibres et terminaisons nerveuses dans le NARC et l'EM observée chez l'animal non traité. Les péricaryons de l'aire hypophysiotrope de l'hypothalamus humain sont spontanément immunoréactifs. Ils ne représentent toutefois certainement pas la totalité des neurones potentiellement producteurs des antigènes recherchés.

Comme nous l'avons précédemment mentionné, des deux antisérums anti-CCK-8 employés, seul l'IS 15/8 produit contre le CCK-8 non sulfaté, marque des péricaryons dans le NARC du Cobaye et de l'Homme dans les conditions classiques de l'immunohistochimie (sans traitement enzymatique préalable des coupes). Toutefois, l'IS 86, dirigé contre le CCK-8 sulfaté, détecte, comme l'IS 15/8, des péricaryons dans l'ARC chez le Chat et le Lapin (non illustré). Chez le Rat, l'IR-CCK de péricaryons dans l'ARC est toujours faible (parfois indétectable) et n'est visualisée que par l'IS 15/8. Tous les autres immunosérums utilisés ici ont donné de bons marquages de corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses dans l'aire hypophysiotrope du Cobaye, du Chat, du Rat et de l'Homme, que nous décrirons dans cet ordre.

Chez le Cobaye, les marquages anti-hGHRF, anti-CCK, anti-NPY et anti-ACTH, ont été comparés entre eux sur coupes adjacentes et sur les mêmes coupes après éluion des anticorps. De plus, le marquage anti-NPY a été comparé, après éluion des anticorps, d'une part au marquage anti-SOM, et d'autre part au marquage anti-CTPG.

Chez le Rat, les marquages anti-NPY, anti-CCK, anti-hGHRF, et anti-ACTH/B-endorphine ont été comparés sur coupes adjacentes et sur les mêmes coupes après élution des anticorps. De plus, les marquages anti-NPY et anti-hGHRF ont été comparés aux marquages anti-SOM.

Chez l'Homme, les marquages anti-CCK, anti-NPY et anti-hGHRF ont été comparés sur coupes adjacentes et sur les mêmes coupes après élution des anticorps. De plus, les marquages anti-hGHRF, anti-CTPG et anti-NPY ont été comparés sur les mêmes coupes après deux éluions, en trois réactions successives.

III - L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DU COBAYE

A - Distribution de l'IR-NPY

Chez l'animal non colchicinisé, l'IR-NPY est détectée dans de nombreuses fibres et terminaisons nerveuses distribuées dans l'ensemble du NARC et dans la zone interne subépendymaire de l'EM, alors qu'elle est virtuellement absente de la zone externe. Dans le NARC antérieur (rétrochiasmatique), les fibres NPY-I sont orientées en tous sens dans le neuropile, et en périphérie, semblent irradier vers l'hypothalamus latéral et périventriculaire. La densité des prolongements NPY-I augmente avec l'avancée caudale. Dans la portion infundibulaire et rétro-infundibulaire du NARC, les fibres et terminaisons nerveuses NPY-I semblent s'arranger autour de péricaryons non marqués localisés dans les parties latéroventrales de ces régions. La tige pituitaire contient des concentrations modérées de fibres NPY-I qui, uniformément distribuées dans sa portion rostrale, adoptent une localisation ventrale à l'approche du lobe nerveux de l'hypophyse.

Le traitement par la colchicine provoque l'apparition d'une IR-NPY très intense dans de très nombreux corps cellulaires de taille moyenne (20-25 um) distribués dans l'ensemble du NARC et dans la zone interne de la lèvre dorsale de l'EM.

Dans la portion rétrochiasmatique du NARC, ces péricaryons NPY-I occupent le tiers ventral de cette région (Pl. XIIa1). Dans les portions infundibulaires (Pl. XVa2 et XVIIb1) et rétro-infundibulaires de ce noyau (Pl. XIIa1), les corps cellulaires NPY-I sont aussi détectés, en faible nombre, en périphérie des régions dorsales et latérales. Ils sont toutefois plus rares, voire absents, dans les régions latéroventrales et dorsales périventriculaires du NARC, étant essentiellement concentrés dans les régions médianes périventriculaires. Dans

le NARC caudal, les péricaryons NPY-I occupent le plancher du récessus prémamillaire du troisième ventricule et s'étendent aussi latéralement dans la base de l'hypothalamus. Avec l'évagination de l'EM, les corps cellulaires NPY-I envahissent la zone interne subventriculaire de la lèvre dorsale (Pl.XVIIa1 et b1). Ils y sont détectés, en une population abondante et très compacte, dans toute l'étendue de l'EM jusqu'à l'individualisation de la tige pituitaire dont ils sont absents. Ces cellules NPY-I étant très semblables aux péricaryons NPY-I rencontrés dans le NARC, nous considérons qu'ils appartiennent à une même population neuronique qui peut, néanmoins, être fonctionnellement hétérogène.

Comme chez l'animal non-traité, l'IR-NPY de l'animal traité par la colchicine est virtuellement absente de la zone externe de l'EM (Pl.XVa2 et XVIIb1). Seules quelques fibres variqueuses NPY-I très éparses y sont rencontrées çà et là, et sont apparemment en léger retrait de l'espace périvasculaire.

B - Distribution de l'IR-CCK

L'IR-CCK, généralement modérée, est détectée dans des corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses présentant une distribution tout à fait identique à celles des structures NPY-I dans l'ARC et la zone interne de l'EM (Pl.XIIb1, XIIIa1 et XIVb1).

Cependant, et comme nous l'avons exposé dans la première partie de ce travail, l'IR-CCK est aussi détectée dans des concentrations modérées de fibres et terminaisons nerveuses périportales rassemblées autour des anses intra-infundibulaires longues et courtes des capillaires de la vascularisation porte-hypophysaire (Pl.VIa et b, Xa, XIa1, et XIIb1). Cette innervation périportale CCK-I présente une régionalisation caractéristique dans la zone externe, où elle occupe préférentiellement les plages dorsales et ventromédianes (Pl.XIIb1).

C - Distribution de l'IR-hGHRF

Comme les IR-NPY et IR-CCK, l'IR-hGHRF est détectée dans une innervation dense et de nombreux péricaryons dans le NARC et la lèvre dorsale de l'EM.

Dans le NARC, les péricaryons hGHRF-I sont distribués dans les mêmes aires que les neurones NPY-I (Pl.XIIc1, XIIIb1 et XIVc1), et sont de plus, localisés dans en position dorsale périventriculaire et latéroventrale dans

cette région (Pl.XIIIb1). Dans le NARC rétroinfundibulaire et caudal, quelques corps cellulaires hGHRF-I sont aussi distribués dorsalement ainsi qu'en périphérie du noyau (Pl.XIVc1).

Dans la zone externe de l'EM, de nombreuses fibres et terminaisons périportales réagissent. Cette innervation péricapillaire hGHRF-I dense apparaît clairement régionalisée. Elle occupe les plages latérales de l'EM externe, qui correspondent aux régions qui ne reçoivent pas d'innervation CCK-I, comme le montre l'examen de coupes adjacentes (comparer a1 et b1 dans la planche XIII).

E - Comparaisons des différents marquages après élution des anticorps

1) Comparaison des IR-NPY et IR- β -END

Les coupes ayant subi une première réaction anti-NPY ont été décolorées, éluées, puis traitées par un antiserum anti- β -END. Les marquages sont comparés.

Dans le NRC, les cellules β -END forment une population neuronique partageant la même distribution rostrocaudale que les neurones NPY-I. Cependant, les corps cellulaires ACTH-I constituent une population neuronique plus lâche qui, contrairement aux péricaryons NPY-I, occupe l'ensemble du NARC et tend aussi à envahir les régions adjacentes. La comparaison précise des documents photographiques permet de constater sans ambiguïté qu'aucune cellule NPY-I ne contient l'IR- β -END (comparer a1 et a2 de la Pl.XII et de la Pl.XIV). Le marquage anti- β -END du NARC effectué après élution des anticorps est comparable au marquage anti- β -END effectué en premier temps sur une coupe n'ayant pas subi le traitement d'élution des anticorps.

Dans l'EM, l'IR- β -END est essentiellement détectée dans une innervation périportale modérément dense constituée de fines fibres variqueuses périportales droites courant dans la zone externe (non illustré). Comme cela a précédemment été démontré chez le Cobaye (TRAMU et al., 1977) cette innervation représente l'innervation gonadolibérinergique d'origine septopréoptique. De même que dans le NARC, l'IR-NPY et l'IR- β -END sont contenues dans des structures différentes.

2) Comparaison des IR-CCK et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-CCK ont été

décolorées, éluées, et traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison des marquages successivement effectués sur les mêmes coupes révèle que dans le NARC et la lèvre dorsale de l'EM, tous les péricaryons et la majorité des fibres et terminaisons nerveuses CCK-I contiennent aussi l'IR-NPY (comparer b1 et b2 de la Pl.XII, a1 et a2 de la Pl.XIII et b1 et b2 de la Pl.XIV). Dans le NARC, les intensités des deux marquages d'un même neurone sont en général corrélées. Dans la lèvre dorsale de l'EM, l'IR-CCK des corps cellulaires est en général plus faible que l'IR-NPY des mêmes cellules (Pl.XIIIa1). La colocalisation de l'IR-CCK et l'IR-NPY est aussi retrouvée dans des fibres variqueuses courant dans la tige pituitaire et dans la partie ventrale du lobe nerveux de l'hypophyse (non illustré).

Dans la zone externe de l'EM, l'innervation périportale CCK-I n'a pas réagit, ce qui prouve l'efficacité du traitement d'éluition des anticorps. Comme cela est observé sur une coupe ayant subi une réaction anti-NPY en premier temps sans avoir été éluée, l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe de l'EM.

3) Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-hGHRF ont été décolorées, éluées, puis traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison des marquages effectués sur les mêmes coupes révèle que dans le NARC, la majorité des fibres et terminaisons nerveuses hGHRF-I présente aussi l'IR-NPY. De plus, tous les corps cellulaires hGHRF-I localisés dans les parties médianes du NARC, ainsi que les péricaryons distribués en son extrême périphérie dorsale et latérale, et ceux présents dans la zone interne de la lèvre dorsale de l'EM, contiennent aussi l'IR-NPY (comparer c1 et c2 de la Pl.XII et XIV et b1 et b2 de la Pl.XIII). Une minorité de neurones hGHRF-I ne contient pas l'IR-NPY. Ces cellules ne présentant que l'IR-hGHRF sont localisées dans les parties dorsales périventriculaires de l'ARC et dans sa région ventrolatérale où elles se groupent en formation ovoïde dense (Pl.XIIIb1). Quelques péricaryons à IR-hGHRF seule sont aussi distribués dans les régions dorsales du NARC rétro-infundibulaire (Pl.XIVc1).

Dans la zone externe de l'EM, l'IR-NPY est virtuellement absente, prouvant la réussite du traitement d'éluition des anticorps.

En conclusion, ces résultats démontrent la coexistence d'IR-CCK d'une

part, et d'IR-hGHRF d'autre part, dans tous les neurones NPY-I du NARC et de la lèvre dorsale de l'EM. Quelques neurones essentiellement localisés dans les parties dorsales et ventrolatérales du NARC circum-infundibulaire ne semblent contenir que l'IR-hGHRF et représentent environs le dixième de la population neuronique visualisée par notre immunsérum anti-hGHRF.

4) Comparaison des IR-CTPG et IR-NPY

Après que cette étude ait été achevée, nous avons eu l'occasion d'utiliser un immunsérum produit contre la partie C-terminale du pré-pro-GHRF humain ou CTPG (voir BLOCH et al., 1986). Il était donc intéressant de savoir si cet immunsérum produit à partir d'une molécule d'origine humaine et ne reconnaissant pas la séquence du hGHRF pouvait conduire à l'obtention de bons marquages chez le Cobaye, et lesquels.

L'anti-CTPG a donné de bons résultats chez le Cobaye colchicinisé, quoique l'intensité de l'IR-CTPG soit légèrement plus faible que l'IR-hGHRF chez cette espèce.

Dans le NARC de Cobayes colchicinisés, l'IR-CTPG est détectée dans une innervation très éparse restreinte aux régions riches en corps cellulaires immunoréactifs. Ceux-ci sont essentiellement localisés dans les régions dorsales périventriculaires et ventrolatérales de la portion circum-infundibulaire du noyau (Pl.XVa et XVIa1 et b1). Ces péricaryons CTPG-I sont d'assez grande taille et sont modérément à fortement immunoréactifs (Pl.XVIb1).

Dans l'EM, seule la zone externe est marquée. L'IR-CTPG est détectée dans une innervation périportale dense occupant préférentiellement les plages latérales de la zone externe (Pl.XVa1).

Les coupes ayant subi la réaction anti-CTPG ont été décolorées, éluées, puis traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison précise des marquages successifs effectués sur les mêmes coupes révèle que l'IR-CTPG et l'IR-NPY sont contenues dans des structures nerveuses différentes (Pl.XV et XVI).

La distribution des structures CTPG-I dans l'aire hypophysiotrope du Cobaye, rappelle fortement la distribution des structures ne contenant que l'IR-hGHRF dans cette région, comme le montre l'examen de coupes adjacentes (comparer Pl.XIIIb1 et Pl.XVa1). Ces observations suggèrent qu'il s'agit vraisemblablement des mêmes systèmes neuroniques (voir au VI).

5) Comparaison des IR-NPY et IR-SOM

La démonstration récente (CHRONWALL et al., 1984) de la coexistence de NPY et de SOM dans quelques neurones du NARC chez le Rat, puis sa mise en cause (EVERITT et al., 1986) nous ont incité à entreprendre une étude comparée de la distribution des IR-NPY et IR-SOM dans le NARC du Cobaye.

Nous avons comparé dans l'aire hypophysiotrope du Cobaye colchicinisé, la distribution de l'IR-NPY et de l'IR-SOM, cette dernière étant visualisée après élution des anticorps sur les mêmes coupes.

Dans le NARC et la zone interne de la lèvre dorsale de l'EM, l'IR-SOM est détectée dans une innervation modérément dense, surtout localisée dans le NARC ventro-latéral (Pl.XVIIa2). En revanche, une innervation périportale très dense est détectée dans toute l'étendue rostrocaudale et dorsoventrale de la zone externe de l'EM (Pl.XVIIa2 et b2). Les péricaryons SOM-I sont peu abondants. Ils sont essentiellement localisés dans les parties médianes périventriculaires du NARC et dans la région subépendymaire de la lèvre dorsale de l'EM (Pl.XVIIa2). Quelques très rares corps cellulaires SOM-I sont aussi visualisés en extrême périphérie du NARC latéral (Pl.XVIIa2 et b2). D'avant en arrière, les neurones SOM-I apparaissent, comme les neurones NPY-LI, dans le NARC rétrochiasmatique. Ils sont surtout localisés dans sa portion circum-infundibulaire et disparaissent progressivement dans sa portion rétro-infundibulaire alors que les neurones NPY-I sont encore abondants.

La comparaison des IR-NPY et IR-SOM révèle que quelques rares péricaryons contiennent les deux immunoréactivités. Ceux-ci sont localisés dans les parties périventriculaires du NARC, ainsi qu'en périphérie du noyau (Pl.XVII). Cependant, l'abondance extrême et la très grande concentration des péricaryons NPY-I rend souvent difficile l'interprétation des images. Cette difficulté se trouve de plus accrue par une localisation intracellulaire apparemment différente du matériel NPY-I et du matériel SOM-I, ce qui modifie l'aspect d'un même péricaryon d'un marquage à l'autre.

Il nous a été toutefois possible d'observer l'incontestable colocalisation d'IR-NPY et IR-SOM dans quelques péricaryons dans le NARC du Cobaye (Pl.XVII). Une estimation grossière du nombre des neurones doublement marqués indique qu'environ 5% des neurones SOM-I sont aussi NPY-I. Ils représentent vraisemblablement moins de 1% de la population neuronique à IR-NPY du NARC du Cobaye.

A - Distribution de l'IR-NPY

L'IR NPY est détectée dans de grandes concentrations de fibres et terminaisons nerveuses dans l'ensemble du NARC. De plus, des fibres variqueuses NPY-I ont été observées dans la zone subépendymaire de l'EM.

Dans la zone externe, seule sa partie la plus rostrale (rétrochiasmatic) contient une innervation NPY-I peu dense (non illustré). Celle-ci est constituée de fibres variqueuses orientées verticalement qui semblent se terminer en léger retrait de la vascularisation porte-hypophysaire. Partout ailleurs, l'IR-NPY est absente de la zone externe, ce qui est particulièrement évident lors de l'évagination totale de l'EM (Pl.XVIII).

Dans le NARC, de nombreux corps cellulaires NPY-I ont été observés. Ils sont distribués dans l'ensemble du noyau. Apparaissant en faible nombre dans sa portion rétrochiasmatic, plus postérieurement, ils envahissent rapidement ses parties médianes et dorsales périventriculaires. Ces péricaryons NPY-I sont retrouvés jusque dans la région prémillaire (Pl.XXc2). Quelques corps cellulaires NPY-I ont aussi été observés dans la zone subépendymaire de l'EM (Pl.XIII).

B - Distribution de l'IR-CCK

Dans le NARC, l'IR-CCK est modérée à faible. Elle est cependant très intense dans une innervation périportale dense distribuée dans toute la zone externe (Pl.XIXb1). La zone interne de l'EM et la neurohypophyse ne présentent pas d'innervation CCK-I notable (non illustré). Quelques axones CCK-I sont présents dans la zone subépendymaire de l'EM.

La région rétrochiasmatic contient de très nombreux neurones CCK-I qui forment une population périventriculaire qui s'éloigne progressivement du NARC pour coloniser le noyau dorsomédian (non illustré). Dans le NARC rétrochiasmatic, d'autres neurones CCK-I de taille légèrement supérieure constituent un groupe que l'on retrouve distribué, plus postérieurement, de façon identique au groupe de neurones NPY-I.

C - Distribution de l'IR-hGHRF

Exceptée une innervation périportale hGHRF-I dense observée dans l'EM externe (Pl.XXa1), l'innervation hGHRF-I de l'aire hypophysiotrope du chat

présente les mêmes caractéristiques que l'innervation NPY-I de cette région.

Dans le NARC, les corps cellulaires hGHRF-I sont, comme les péricaryons NPY-I, distribués dans toute l'étendue rostrocaudale du noyau. Ils sont toutefois plus abondants dans ses régions dorsolatérales et ventrolatérales.

E - Comparaison des différents marquages après élution des anticorps

1) Comparaison des IR-CCK et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-CCK ont été décolorées, éluées, puis traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que la plus grande partie des structures CCK-I du NARC et de la zone subépendymaire de l'EM contient aussi l'IR-NPY (Pl.XIXb2).

Dans la zone externe de l'EM, l'innervation périportale CCK-I n'a pas réagi (Pl.XIX).

Dans le NARC rétrochiasmatisque, n'ont pas réagi non plus les neurones CCK-I de l'aire périventriculaire, comme ceux du noyau dorsomédian. La majorité des neurones CCK-I du NARC sont aussi NPY-I. Cependant, quelques rares cellules distribuées de manière diffuse dans le NARC ne présentent que l'IR-CCK (Pl.XIXc1).

2) Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-hGHRF ont été décolorées, éluées, puis traitées par l'immunsérum anti-NPY.

Dans la zone externe de l'EM, les fibres et terminaisons périportales hGHRF-I n'ont pas réagi (Pl.XXa2).

Dans le NARC, l'essentiel de l'innervation hGHRF-I ainsi que la plupart des neurones marqués dans le premier temps contiennent aussi l'IR-NPY (Pl.XX). Cependant, quelques neurones hGHRF-I distribués de façon diffuse dans le NARC dorsolatéral et ventrolatéral (surtout dans sa région rétroinfundibulaire) ne sont pas NPY-I (Pl.XXc1).

La comparaison sur coupes adjacentes des marquages anti-NPY, anti-CCK et anti-hGHRF de la partie rétrochiasmatisque de l'EM montre que les innervations

CCK-I et hGHRF-I ont un aspect bien différent de celui présenté par la faible innervation NPY-I qu'on observe dans cette région uniquement (non illustré).

D'autre part, l'innervation CCK-I de la zone externe de l'EM est plus dense et présente un marquage plus fort que l'innervation périportale hGHRF-I (partiellement illustré en XIXb1 et XXa1). De plus, si, dans les plages latérales de la zone externe, ces deux innervations ont une distribution analogue, seules les fibres et terminaisons périportales CCK-I innervent abondamment les plages médioventrales de la zone externe (non illustré).

En conclusion, ces résultats démontrent la coexistence d'IR-CCK, d'une part, et d'IR-hGHRF, d'autre part, dans tous les neurones NPY-I de l'aire hypophysiotrope du Chat. Quelques péricaryons CCK-I, et de plus nombreux neurones hGHRF-I n'ont toutefois pas été marqués par l'anti-NPY.

V - L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DU RAT

A - Distribution de l'IR-NPY

Comme celles du Cobaye et du Chat, l'aire hypophysiotrope du Rat contient de grandes concentrations de corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses NPY-I. Les prolongements nerveux immunoréactifs sont extrêmement nombreux dans toute l'étendue rostro-caudale du NARC, et sont particulièrement concentrés en formations apparemment périsonatiques et/ou péricaryoniques dans les parties ventrolatérales de sa portion circum-infundibulaire (P1/XXIIIa2). Les péricaryons NPY-I sont présents en grand nombre, sans discontinuité, depuis la portion rétrochiasmatische du NARC (P1.XXIIa2) jusque dans sa portion la plus caudale où ils entourent le plancher du recessus prémamillaire du troisième ventricule. Ces neurones NPY-I sont de petites cellules essentiellement distribuées dans les parties médianes périventriculaires du NARC (P1.XXIIc2 et XXIIb2). Ils sont observés en faible nombre en périphérie du noyau ou latéralement dans la base de l'hypothalamus, et rarement en position dorsale.

Dans l'EM, la zone subépendymaire contient des concentrations faibles de fibres variqueuses NPY-I qui sont quelques fois accompagnées de corps cellulaires marqués (P1.XXIIb2). La zone interne, comme la zone externe, ne présentent virtuellement pas d'IR-NPY (P1.XXIIb2, XXIIb2 et XXIVa2).

B - Distribution de l'IR-CCK :

Les péricaryons CCK-I sont identiquement distribués aux neurones NPY-I.

C - Distribution de l'IR-hGHRF

L'IR-hGHRF, modérée à forte, est présente dans de grandes concentrations de péricaryons, fibres et terminaisons nerveuses distribuées dans toute l'étendue rostrocaudale du NARC. Les prolongements nerveux hGHRF-I sont distribués de façon identique aux structures NPY-I. Les corps cellulaires hGHRF-I présentent aussi une distribution très similaire à celle des péricaryons NPY-I (Pl.XXII, XXIII et XXIV), mais sont toutefois légèrement plus abondants que ceux-ci dans les parties dorsales et latéroventrales du NARC (Pl.XXIII et XXIV).

Dans l'EM, la zone subépendymaire contient de faibles concentrations de axones hGHRF-I et quelques rares corps cellulaires marqués (Pl.XXIb1 et XXIVa1). Des fibres variqueuses hGHRF-I sont observées dans la zone interne, courant en direction des capillaires portes hypophysaires qui reçoivent une innervation hGHRF-I très dense. Celle-ci est observée dans toute l'EM externe jusque dans la portion proximale de la tige pituitaire (Pl.XXIb1, XXIIIa1, XXIVa1, XXVa1 et b1, et XXVIb1). A cet endroit, les axones hGHRF-I sont souvent rassemblés autour de prolongements tanycytaires (Pl.XXIIIb1 et XXVIb1).

D - Comparaison des IR-CCK et IR-NPY

Tous les péricaryons CCK-I sont aussi NPY-I (voir Pl.XXI).

E - Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-hGHRF ont été décolorées, éluées, puis traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que la majorité des corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses hGHRF-I du NARC contient aussi l'IR-NPY (comparer a1 et a2, et c1 et c2 de la Pl.XXII, a1 et b1 et b2 de la Pl.XXIII). Seuls quelques péricaryons localisés dans les parties dorsales et latéroventrales de sa portion circum-infundibulaire ne contiennent pas l'IR-NPY (comparer a1 et a2 des Pl.XXIII et XXIV).

Dans la zone externe de l'EM, l'innervation périportale ayant présenté l'IR-hGHRF n'a pas réagi (Pl.XXII, XXIII et XXIV), prouvant l'efficacité du

traitement d'élution (non illustré). L'absence d'IR-NPY dans la zone externe de l'EM est observée aussi bien avant qu'après élution. La coexistence d'IR-hGHRF et IR-NPY est aussi retrouvée dans quelques péricaryons présents courant dans la zone subépendymaire (Pl.XXIb1 et b2).

F - Comparaison des IR-hGHRF et IR-SOM

Nous avons comparé, dans l'aire hypophysiotrope du Rat traité par la colchicine, la distribution de l'IR-hGHRF et l'IR-SOM, cette dernière étant visualisée sur les mêmes coupes après élution des anticorps.

Dans le NARC, l'IR-SOM est détectée dans une innervation très dense occupant toute son étendue rostrocaudale (Pl.XXV). De nombreux corps cellulaires SOM-I y ont aussi été observés. Ceux-ci sont localisés dans la partie la plus dorsale du NARC, et n'apparaissent que très postérieurement dans la portion infundibulaire de cette région (Pl.XXVb1 et c2).

Dans l'EM, l'IR-SOM est présente dans quelques fibres variqueuses cheminant dans la zone subépendymaire, et dans de plus nombreux axones courant dans la zone interne pour apparemment contribuer à l'innervation périportale très dense qui est visualisée dans toute l'étendue rostro-caudale de la zone externe (Pl.XXVb2).

La comparaison des marquages anti-hGHRF et anti-SOM montre que les régions du NARC contenant des péricaryons hGHRF-I sont richement innervées par des axones SOM-I (comparer dans la Pl.XXV, a1,b1 et c1 avec a2,b2 et c2).. Dans la zone externe de l'EM, les innervations périportales hGHRF-I et SOM-I présentent une distribution analogue mais constituent deux plexus nerveux dissociés (Pl.XXVIb1 et b2). Dans le NARC, les populations neuroniques hGHRF-I et SOM-I ont des distributions globalement différentes. Des aires de recouvrement ne sont observées que dans la partie dorsale du NARC rétroinfundibulaire et n'intéressent que les neurones les plus périphériques de chaque groupe immunoréactif ((Pl.XXVb1 et b2). Un examen minutieux des documents photographiques révèle que, bien que la très grande majorité des péricaryons de ce noyau ne contient que l'une ou l'autre immunoréactivité, de très rares neurones présentent à la fois l'IR-hGHRF et l'IR-SOM (Pl.XXV c1 et c2 et XXVI a1 et a2).

En conclusion, tous les péricaryons NPY-I de l'ARC du Rat contiennent l'IR-hGHRF. De plus, l'IR-SOM est aussi détectée dans moins d'un centième de la

population neuronique hGHRF-I.

VI - L'AIRE HYPOPHYSIOTROPE DE L'HOMME

A - Distribution de l'IR-NPY

Une IR-NPY très intense a été détectée dans de nombreux corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses répartis dans l'ensemble de l'aire hypophysiotrope.

Les prolongements nerveux NPY-I sont distribués dans le NARC et dans l'hypothalamus médiobasal en général. Les régions recevant une innervation NPY-I abondante sont le NARC, la partie latérale et ventromédiane du noyau ventromédian l'aire périventriculaire et la base du tuber cinereum. Cette innervation comprend des fibres variqueuses courant en tous sens dans le NARC et le noyau ventromédian, et des axones immunoréactifs orientés parallèlement au troisième ventricule dans l'aire périventriculaire. Des sections transversales et/ou des terminaisons nerveuses NPY-I sont surtout observées dans le NARC et le noyau ventromédian.

Les corps cellulaires NPY-I, en général très marqués et d'aspect polymorphe, sont essentiellement distribués dans les parties les plus ventrales et médianes du NARC (Pl.XXVIIa2). Ils sont plus rares dorsalement et dans le noyau ventromédian. Les péricaryons NPY-I sont aussi localisés en position sous-ventriculaire autour du plancher du troisième ventricule et du recessus infundibulaire (Pl.XXVIIIa2 et XXXb2). La concentration des neurones NPY-I dans le NARC augmente d'avant en arrière.

Dans l'EM, seules la zone la plus interne et la zone sous-ventriculaire contiennent une innervation NPY-I abondante (Pl.XXVIIa2 et XXXa2 et b2). Dans la zone neurovasculaire, les fibres variqueuses NPY-I sont très clairsemées et ne sont que très rarement observées au contact des vaisseaux (Pl.XXVIIIa2 et XXXIa3).

B - Distribution de l'IR-CCK

L'IR-CCK de l'hypothalamus médiobasal est faible à modérée. Comme l'IR-NPY, elle intéresse de nombreux péricaryons, fibres et terminaisons nerveuses observées dans toute l'étendue rostrocaudale du NARC. Leur distribution est

analogue à celle des structures NPY-I. De plus, quelques rassemblements de fibres et terminaisons marquées sont présents dans le noyau ventromédian et l'aire prémamillaire.

Dans l'EM, l'IR-CCK est détectée dans une innervation moyennement dense présente dans la zone sous-ventriculaire et la zone interne. Cependant, contrairement à l'IR-NPY, le marquage anti-CCK intéresse aussi des concentrations modérées de fibres et terminaisons nerveuses dans la zone neurovasculaire (non illustré).

C - Distribution de l'IR-hGHRF

Un marquage anti-hGHRF modéré à fort a été obtenu dans l'hypothalamus humain.

L'IR-hGHRF est détectée dans une innervation dense du NARC et du noyau ventromédian, ainsi que dans des axones cheminant dans l'aire périventriculaire et autour du recessus infundibulaire.

Les corps cellulaires hGHRF-I sont extrêmement nombreux et constituent une population neuronique occupant l'ensemble du NARC ainsi que la moitié basse du noyau ventromédian, sans discontinuité. Ces neurones hGHRF-I sont d'aspect polymorphe et sont distribués dans toute l'étendue rostrocaudale du tuber cinereum et autour du recessus infundibulaire du troisième ventricule.

Dans l'EM, l'IR-hGHRF est caractériser des fibres variqueuses cheminant dans la zone interne (Pl.XXXb1), et une dense innervation périportale occupant l'ensemble de la zone neurovasculaire (Pl.XXXIa1).

D - Distribution de l'IR-CTPG

L'IR-CTPG a été détectée dans une vaste population neuronique essentiellement distribuée dans les parties dorsales et latérales du NARC (Pl.XXVIIa1) ainsi que dans la portion basale du noyau ventromédian. Des péricaryons CTPG-I ont aussi été observés de façon occasionnelle dans le NARC médioventral, et en bordure du troisième ventricule à la hauteur du noyau ventromédian. Cette population neuronique occupe toute l'étendue rostrocaudale du NARC mais ne trouve son plein développement que dans la moitié postérieure de cette région.

L'innervation CTPG-I de l'hypothalamus médiobasal est peu abondante, n'est concentrée que dans les régions riches en corps cellulaires marqués et

est constituée de fines fibres variqueuses accompagnées de profils dendritiques (Pl.XXVIIa1).

Dans l'EM, de nombreuses fibres et terminaisons nerveuses sont rassemblées en périphérie des capillaires portes dans la zone neurovasculaire (Pl.XXVIIIa1 et XXXIa2).

E - Comparaison des IR-CCK et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-CCK ont été décolorées, éluées, et traitées par l'immunsérum anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que tous les corps cellulaires CCK-I contiennent aussi l'IR-NPY (comparer b1 et b2 dans la Pl.XXXI). Du fait de la faible intensité du marquage anti-CCK, la coexistence des deux immunoréactivités est difficile à observer dans les prolongements nerveux.

Dans la zone neurovasculaire de l'EM, l'innervation périportale précédemment visualisée par l'immunsérum anti-CCK n'a pas réagi.

F - Comparaison des IR-hGHRF, IR-CTPG et IR-NPY

Des coupes frontales, régulièrement espacées dans l'aire hypophysiotrope, ont subi trois réactions successives dans la séquence suivante : un premier marquage anti-hGHRF, suivi, après élution, d'une réaction anti-CTPG et, après une seconde élution, d'une réaction anti-NPY.

Les marquages anti-CTPG et anti-NPY obtenus après élution sont qualitativement et quantitativement comparables aux mêmes marquages effectués en un premier temps sur des coupes n'ayant pas subi le traitement d'élution (comparer a1 des Pl.XXVII et XXVIII avec, respectivement, a2 et b2 de la Pl.XXIX et a1 de la Pl.XXX).. L'examen minutieux des documents photographiques révèle, qu'environ 40% des péricaryons hGHRF-I contiennent l'IR-NPY mais pas l'IR-CTPG, que les 60% restants contiennent tous l'IR-CTPG, et que quelques rares neurones contiennent les trois immunoréactivités (comparer a1 et a2 de la Pl.XXVII, et voir Pl.XXIX).

Il apparaît en fait, que tous les neurones NPY-I contiennent l'IR-hGHRF. Au sein d'un même neurone, les intensités respectives des IR-hGHRF et IR-NPY ne sont pas toujours corrélées. Souvent, l'IR-hGHRF est ténue alors que l'IR-NPY est forte. Cette situation est rencontrée en particulier dans les neurones les

plus ventralement localisés dans le NARC (P1.XXX b1 et b2).

En revanche, les IR-hGHRF et IR-CTPG sont en général d'intensité identique dans la même cellule (voir P1.XXIX).

Comme le laissait prévoir la comparaison sur coupes adjacentes des trois immunoréactivités, les corps cellulaires (hGHRF, NPY)-I sont surtout localisés dans le NARC médioventral, les corps cellulaires (hGHRF, CTPG)-I sont distribués dans les parties dorsales et latérales de ce noyau ainsi que dans le noyau ventromédian, et les corps cellulaires (hGHRF, CTPG, NPY)-I sont observés à l'interface des deux populations neuroniques (P1.XXX).

Dans l'EM, la zone interne contient des fibres variqueuses (hGHRF, NPY)-I (P1.XXXb1 et b2) et quelques axones (CTPG, NPY)-I (P1.XXXa1 et a2). Dans la région péricapillaire de la zone neurovasculaire, la majorité des fibres et terminaisons périportales hGHRF-I sont aussi CTPG-I (P1.XXXIa1 et a2).

De plus, et bien qu'elles soient très rares dans la région péricapillaire, quelques fibres et terminaisons périportales NPY-I sont aussi (hGHRF,CTPG)-I (P1.XXXIa1, a2 et a3).. Précisons que de telles situations sont plus qu'occasionnelles. Elles sont toutefois bien conformes à l'observation, dans le NARC, de neurones (hGHRF, CTPG, NPY)-I. De plus, de très rares terminaisons périportales hGHRF-I ne contiennent pas l'IR-CTPG mais présentent l'IR-NPY (P1.XXXIa1 et a3).

En conclusion, ces résultats démontrent la coexistence d'IR-CCK d'une part, et d'IR-hGHRF d'autre part, dans les neurones NPY-I de l'aire hypophysiotrope de l'hypothalamus humain. De plus, quelques neurones de cette région contiennent à la fois l'IR-NPY, l'IR-hGHRF et l'IR-CTPG. Dans la zone neurovasculaire, les IR-hGHRF et IR-CTPG sont localisées dans une même innervation périportale.

VII - ETUDE DE LA COEXISTENCE DES IR-hGHRF et IR-NPY DANS LE CERVEAU DU RAT

La mise en évidence de la coexistence d'IR-hGHRF dans les neurones à NPY du NARC, rapprochée de l'observation du marquage, par l'immunsérum anti-hGHRF, de corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses à localisation extra-hypothalamique, nous a conduit à entreprendre une étude comparée systématique de la distribution des deux immunoréactivités dans l'ensemble du cerveau du Rat.

A - Distribution de l'IR-hGHRF extra-infundibulaire

L'immunsérum anti-hGHRF a détecté de nombreux corps cellulaires, fibres et terminaisons nerveuses dans l'ensemble du prosencéphale et dans quelques régions mésencéphaliques et pontiques.

Dans le cortex, une innervation modérée et de nombreux péricaryons ont réagi (Pl.XXXIIIa1, b1 et c1). Une innervation plus dense est observée dans le cortex piriforme, surtout dans la couche pyramidale (Pl.XXXIII f1). Quelques corps cellulaires hGHRF-I sont présents dans cette région.

Des corps cellulaires et des fibres variqueuses ont été marquées dans l'hippocampe.

Dans l'amygdale, l'innervation hGHRF-I est surtout distribuée dans le noyau médian et dans la portion postérieure des noyaux basaux et du noyau central. Des péricaryons hGHRF-I sont dispersés dans tous les noyaux amygdaliens mais sont surtout abondants dans le noyau médian.

De nombreux neurones immunoréactifs ainsi qu'une innervation marquée modérée à dense ont été observés dans les tubercules olfactifs et (Pl.XXXIII g1) dans l'ensemble du striatum (Pl.XXXIII d1).

Des concentrations plus élevées de fibres variqueuses et terminaisons nerveuses hGHRF-I sont présentes dans le lit de la strie terminale (Pl.XXXIII e1°, le noyau accumbens caudal et le septum latéroventral. Des corps cellulaires marqués ont été observés dans la portion postérieure du lit de la strie terminale.

Dans l'hypothalamus et la région préoptique, l'IR-hGHRF caractérise dans une innervation moyennement dense distribuée dans toute l'aire préoptique et dans l'hypothalamus antérieur. Dans l'aire périventriculaire, des axones marqués courent parallèlement au troisième ventricule. De très fortes concentrations de fibres et terminaisons nerveuses hGHRF-I sont présentes dans le noyau suprachiasmatique. Les plus fortes densités de prolongements immunoréactifs sont observés dans toute l'étendue rostrocaudale de la région parvicellulaire du noyau paraventriculaire. Les parties magnocellulaires reçoivent une innervation hGHRF-I plus claisermée (Pl.XXXIIa). De grandes quantités de fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives ont aussi été observées dans l'aire hypothalamique dorsale, le noyau dorsomédian et dans l'hypothalamus postérieur pour rejoindre la dense innervation du NARC caudal. Le noyau ventromédian est peu innervé.

En dehors de l'hypothalamus médiobasal, relativement peu de corps cellulaires marqués ont été détectés. Ils sont localisés dans l'aire préoptique latérale, dans et autour de, l'aire hypothalamique antérieure, dans les parties

ventrales de l'aire périventriculaire, dans l'hypothalamus latéral et dans l'aire périventriculofofnicale (Pl.XXXIIIh1). Quelques neurones parvicellulaires ont été marqués dans le NPV (Pl.XXXIIa).

Dans le thalamus, aucun péricaryon n'a réagi. Les seules régions contenant quelques fibres immunoréactives sont les noyaux centraux, le noyau paraventriculaire recevant une innervation hGHRF-I dense dans toute son étendue rostrocaudale.

En dehors du prosencéphale, l'IR-hGHRF n'a été détectée que dans quelques rares péricaryons faiblement marqués dans le locus coeruleus caudal et dans des neurones plus immunoréactifs distribués dans la formation réticulée latérale.

B - Comparaison des IR-hGHRF et IR-NPY

Les coupes ayant subi une première réaction anti-hGHRF ont été décolorées, éluées et traitées par l'immunsérum anti-NPY.

L'analyse fine des documents photographiques montre que la plus grande partie de l'innervation et des corps cellulaires hGHRF-I contient l'IR-NPY (voir Pl.XXXIII).

Dans les formation télencéphaliques, la majorité des structures hGHRF-I sont aussi NPY-I. Tous les neurones corticaux contiennent une IR-hGHRF forte à faible (Pl.XXXIIIa1 et a2, b1 et b2, c1 et c2). En revanche, certains neurones striataux présentant l'IR-NPY ne réagissent pas à l'anti-hGHRF (un neurone doublement marqué est présenté en d1 et d2 de la Pl.XXXIII). Ce qui est valable pour le striatum l'est aussi pour les régions préoptiques, diencéphaliques, mésencéphaliques et pontiques, exception faite de l'hypothalamus médian.

Dans cette région, quelques rares corps cellulaires hGHRF-I ne sont pas NPY-I (Pl.XXXIII h1 et h2). Ces neurones de petite taille d'aspect circulaire ou bipolaires, sont distribués en arrière du noyau ventromédian et occupent aussi l'aire hypothalamique latérobasale et dorsale. Dans l'hypothalamus en général, quelques fibres nerveuses ne contiennent que l'IR-hGHRF (voire pour le NPV la Pl.XXXII, b1). Des prolongements nerveux ne contenant que l'IR-NPY sont aussi observés (Pl.XXXIIb2), mais la plus grande partie des structures contient aussi l'IR-hGHRF (Pl.XXXIII).

En conclusion, ces observations démontrent la coexistence d'IR-hGHRF dans la majorité des systèmes NPYergiques du cerveau du Rat. Quelques fois, l'IR-hGHRF est forte, d'autres fois faible, voire indétectable. Les intensités des deux immunoréactivités au sein d'une même structure sont souvent corrélées,

mais ce n'est pas une règle générale.

C - Comparaison de la distribution des IR-NPY et IR-ACTH dans les régions limbiques du cerveau du Rat.

Deux séries de coupes adjacentes ont été traitées l'une par l'anti-NPY et l'autre par l'anti-ACTH.

Comme nous l'avons mentionné plus haut chez le Cobaye, l'IR-ACTH et l'IR-NPY sont contenues dans des structures différentes de l'hypothalamus médiobasal. C'est aussi le cas chez le Rat. Dans cette espèce, la population neuronique ACTH-I du NARC représente l'unique population POMCergique du prosencéphale, et donne naissance à l'essentiel de l'innervation ACTH-I visualisée dans cette région.

La comparaison des marquages anti-NPY et anti-ACTH effectués sur des coupes adjacentes met en évidence des analogies remarquables dans la distribution des innervations NPY-I et ACTH-I dans l'ensemble du diencephale (non illustré). Bien que l'innervation NPY-I soit plus abondante que l'innervation ACTH-I il est possible de discerner clairement des orientations similaires et des aires de co-distribution de ces deux plexus nerveux dans de nombreuses régions.

Les deux innervations sont détectées dans le noyau accumbens caudal, entourant la commissure blanche antérieure. Elles présentent des orientations semblables dans l'aire préoptique où elles paraissent se diriger vers le septum. Elles sont toutes deux présentes dans l'aire périventriculaire et, ont une localisation identique dans le NPV, où elles occupent essentiellement les parties parvicellulaires alors qu'elles sont plus lâches autour des neurones magnocellulaires. Dans l'hypothalamus médian, la co-distribution de l'IR-hGHRF et de l'IR-ACTH est tout à fait évidente dans le noyau dorsomédian et l'aire hypothalamique dorsale. Dans le thalamus, elles sont toutes deux retrouvées dans le noyau paraventriculaire. Citons pour finir une autre de leurs caractéristiques communes : leur virtuelle absence de la zone externe de l'éminence médiane alors qu'elles sont présentes dans de nombreux neurones du noyau arqué.

DISCUSSION

Les travaux rapportés ici s'intègrent dans le cadre général de l'étude de la coexistence de messagers chimiques différents dans un même neurone.

Depuis les premières démonstrations immunohistochimiques, il y a dix ans, de la colocalisation d'un peptide et d'une amine dans des neurones périphériques (HOKFELT et al., 1977b) et celle de deux neuropeptides différents dans des neurones centraux (TRAMU et al., 1977), le concept de co-transmission a suscité d'importants travaux et trouvé des confirmations multidisciplinaires aussi nombreuses que variées.

Il est en effet aujourd'hui admis que la plus grande partie des circuits neuroniques périphériques et centraux élaborent plusieurs substances potentiellement capables d'intervenir dans des événements synaptiques, en tant que neurotransmetteurs à effets rapides, ou en tant que neuromodulateurs ayant une action pré- et/ou postsynaptique différée (HOKFELT et al., 1980c ; TRAMU et al., 1982 ; LUNDBERG et HOKFELT, 1983 ; SWANSON, 1983 ; IVERSEN, 1984 ; ECCLES, 1986 ; HOKFELT et al., 1986a).

Chez le Rat, ne serait-ce que dans les circuits hypothalamiques à compétence hypophysiotrope, ce sont trois, quatre, voire même cinq neuropeptides différents qui ont été détectés par immunocytochimie dans un même neurone. Les neuropeptides colocalisés sont donc susceptibles d'être libérés ensemble dans le sang porte et en conséquence d'interagir soit dans l'éminence médiane, soit sur les cellules hypophysaires.

Le neurone paraventriculo-infundibulaire à corticolibérine contiendrait en effet, selon des arrangements non encore définitivement établis, la vasopressine (TRAMU et al., 1983 ; WHITNALL et al., 1985), la neurotensine (SAWCHENKO et al., 1984b), la cholécystokinine (MEZEY et al., 1986), l'enképhaline (HOKFELT et al., 1983 ; HISANO et al., 1986a) et les deux peptides du complexe VIP-PHI (HOKFELT et al., 1983 et 1986 ; voir aussi BERKENBOSCH et al., 1986).

Dans le neurone tubéro-infundibulaire du NARC, la coexistence de neuropeptides et/ou neurotransmetteurs classiques semble être aussi une règle. On y visualise en effet par immunocytochimie à la fois la tyrosine hydroxylase, la somatolibérine, la neurotensine et la galanine (IBATA et al., 1983 ; HOKFELT et al., 1984a et 1986a ; OKAMURA et al., 1985 ; SAWCHENKO et al., 1985 ; DAIKOKU et al., 1986 ; EVERITT et al., 1986b ; MEISTER et al., 1986a) ou encore

la tyrosine hydroxylase associée à la glutamate décarboxylase et la neurotensine (EVERITT et al., 1984 et 1986 ; HOKFELT et al., 1986).

En fait, parmi les neuropeptides découverts jusqu'à ce jour, plusieurs ont été mis en évidence dans des neurones du NARC. Ainsi, outre ceux qui ont déjà été cités, y ont été détectés, les dérivés de la POMC (WATSON et al., 1977 et 1978 ; BLOOM et al., 1978 ; JACOBOWITZ et O'DONOHUE, 1978 ; ZIMMERMAN et al., 1978 ; BLOCH et al., 1979 ; BUGNON et al., 1979 ; SOFRONIEV, 1979 ; voir KHACHATURIAN et al., 1985, et TRANCHAND-BUNEL et al., 1987) et ceux des précurseurs des enképhalines (HOKFELT et al., 1977a ; IBATA et al., 1980 ; VINCENT et al., 1982 ; WEBER et al., 1982 ; KHACHATURIAN et al., 1983 ; WATSON et al., 1983 ; WILLIAMS et DOCKRAY, 1983a ; YAMANO et al., 1985 ; FALLON et LESLIE, 1986 ; MERCHENTHALER et al., 1986b ; voir PETRUSZ et al., 1985), la substance P (TSUURO et al., 1983 et 1984a et b, et 1987 ; PANULA et al., 1984), la somatostatine (voir bibliographie dans JOHANSSON et al., 1984 et dans EVERITT et al., 1986), le facteur natriurétique auriculaire (KAWATA et al., 1985 ; SAPER et al., 1985 ; SKOFITSCH et al., 1985 ; STANDAERT et al., 1986), un peptide apparenté au glucagon (INOGUCHI et al., 1986), le DSIP (Delta Sleep Inducing Peptide) (FELDMAN et KASTIN, 1984), le peptide auriculaire natriurétique (FMRF-NH₂) (WEBER et al., 1981 ; WILLIAMS et DOCKRAY, 1983b ; CHRONWALL et al., 1984 ; voir EVERITT et al., 1986) et le neuropeptide Y (EVERITT et al., 1984a ; BAI et al., 1985 ; CHRONWALL et al., 1985 ; NAKAGAWA et al., 1985 ; WOODHAMS et al., 1985 ; DE QUIDT et EMSON, 1986b).

Dans le NARC, le nombre de neuropeptides présents dans des corps cellulaires excède donc la dizaine, ce qui laisse prévoir de multiples cas de coexistence dont certains ont déjà été rapportés dans la littérature.

Dans ce contexte, quelle place attribuer à nos propres observations ? Nous allons discuter, dans la suite de cet exposé, de la co-localisation et de la nature des antigènes détectés, et des projections et de l'éventuelle fonction des neurones qui les contiennent.

A - La co-localisation des IR-CCK, IR-hGHRF et IR-NPY dans le NARC :

Nous avons montré ici la colocalisation d'IR-CCK et d'IR-hGHRF dans tous les neurones NPY-I du NARC de l'hypothalamus de quatre Mammifères, le Cobaye, le Chat, le Rat et l'Homme.

En ce qui concerne la colocalisation des IR-CCK et IR-NPY, la comparaison précise des marquages immunohistochimiques obtenus dans chaque espèce fait apparaître certaines particularités dans leur association. Chez le Cobaye et

chez l'Homme, les IR-CCK et IR-NPY sont constamment associées dans les neurones du NARC. Chez le Chat, quelques rares péricaryons CCK-I ne sont pas NPY-I alors que tous les péricaryons NPY-I contiennent l'IR-CCK. Chez le Rat, l'IR-CCK est en général peu visualisable dans des péricaryons du NARC, mais, quand elle est observée, intéresse aussi les neurones NPY-I. Dans ces espèces, les péricaryons (CCK,NPY)-I sont toujours localisés dans les parties médianes et périventriculaires du noyau.

En revanche, aucune différence interspécifique n'est observée en ce qui concerne la colocalisation des IR-hGHRF et IR-NPY dans des péricaryons du NARC. Dans chaque espèce, c'est-à-dire à la fois chez le Cobaye, le Rat, le Chat et l'Homme, l'analyse des marquages successivement effectués sur les mêmes coupes après élution des anticorps, montre que tous les neurones NPY-I contiennent l'IR-hGHRF. Ces neurones (hGHRF,NPY)-I ont toujours une localisation médiane et périventriculaire dans le NARC. Cependant, chez tous les animaux étudiés, une proportion variable de la population neuronique du NARC visualisée par notre IS anti-hGHRF (aux environs de 10% chez le Cobaye, de 40% chez l'Homme, et de 5% chez le Rat et le Chat), ne contient que l'IR-hGHRF. Ces neurones à IR-hGHRF seule sont toujours localisés dans les parties ventrolatérales du NARC et représentent très vraisemblablement le système tubéro-infundibulaire hypophysiotrope à somatolibérine à l'origine de l'innervation périportale hGHRF-I que nous avons visualisée dans la zone externe de l'éminence médiane.

Pris dans leur ensemble, nos résultats morphologiques démontrent la coexistence de trois immunoréactivités anti-neuropeptide (la CCK, le hGHRF et le NPY) dans une importante population neuronique à localisation médiane dans le NARC de l'aire hypophysiotrope de quatre Mammifères.

L'étude comparée de la distribution des IR-CCK, IR-hGHRF et IR-NPY dans l'éminence médiane voisine révèle que, dans les quatre espèces étudiées, l'IR-CCK et l'IR-hGHRF sont contenues dans des innervations périportales différentes, et que l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe.

La confrontation des marquages obtenus, d'une part dans le NARC, et d'autre part dans l'éminence médiane qui lui est adjacente, nous permet de conclure à l'absence de projections périportales des neurones (CCK,hGHRF, NPY)-I du NARC. Ces neurones constituent donc un système que nous baptiserons, à défaut de terme consacré par la littérature, tubéro-extra-infundibulaire, afin de bien le distinguer du système tubéro-infundibulaire hypophysiotrope à somatolibérine avec lequel il voisine dans le NARC.

Quelle est donc, en regard de l'abondante bibliographie relative à la neurochimie du NARC, la signification des marquages que nous avons obtenus dans l'aire hypophysiotrope des Mammifères ?

B - Le marquage anti-NPY de l'aire hypophysiotrope :

Le neuropeptide Y ou NPY, ainsi dénommé car riche en résidus tyrosyls, est une molécule de 36 AA, originellement isolée du cortex cérébral de Porc (TATEMOTO, 1982b ; TATEMOTO et al., 1982 ; MINTH et al., 1984). Il appartient à la famille des polypeptides pancréatiques représentée par le polypeptide pancréatique (PP) (KIMMEL et al., 1975) et le peptide YY (PYY) (TATEMOTO et MUTT, 1980 ; TATEMOTO, 1982a) auxquels il est structuralement fortement apparenté.

Avant que le NPY n'ait été isolé du SNC d'un Mammifère, plusieurs études immunohistochimiques ont décrit dans le SNC du Rat la distribution de vastes systèmes neuroniques révélés par des antisérums dirigés contre le PP d'origine aviaire (APP) (LOREN et al., 1979b ; CARD et al., 1983) ou bovine (BPP) (OLSCHOWKA et al., 1981 ; JACOBOWITZ et OLSCHOWKA, 1982a et b), et en particulier une dense population neuronique immunoréactive dans le NARC (HUNT et al., 1981 ; OLSCHOWKA et al., 1981 ; JACOBOWITZ et OLSCHOWKA, 1982a et b ; CARD et al., 1983). Il a ensuite été reconnu que l'IR-APP et l'IR-BPP du SNC du Rat représentaient en fait la présence de NPY (TATEMOTO, 1982b ; TATEMOTO et al., 1982 ; ALLEN et al., 1983 ; MOORE et al., 1984 ; DI MAGGIO et al., 1985 ; O'DONOHUE et al., 1985 ; DE QUIDT et EMSON, 1986 ; voir bibliographie dans GRAY et MORLEY, 1986), présent en grande quantité dans le NARC, comme le rapportent tous les auteurs ayant cartographié les systèmes neuroniques NPY-I centraux dans cette espèce (ALLEN et al., 1983 ; BAI et al., 1985 ; CHRONWALL et al., 1985 ; NAKAGAWA et al., 1985 ; WOODHAMS et al., 1985 ; DE QUIDT et EMSON, 1986b), comme chez la Grenouille (DANGER et al., 1985 ; CAILLIEZ et al., 1987), le Cobaye (CIOFI et TRAMU, 1986b et c), le Hamster (SABATINO et al., 1987), le Chat (CIOFI et TRAMU, 1986b et c ; LEGER et al., 1987), le Singe-Ecureuil (SMITH et al., 1985) et l'Homme (ADRIAN et al., 1983 ; PELLETIER et al., 1984a ; CIOFI et al., 1987b et c).

Récemment toutefois, la présence d'un peptide spécifiquement apparenté au PYY a été signalé dans des neurones centraux chez le Rat (EKMAN et al., 1986). En effet la distribution du PYY diffère en plusieurs points de celle du NPY, en particulier par son absence du NARC.

Comme en témoignent les résultats des tests radioimmunologiques et immunohistochimiques de spécificité, rapportés dans le chapitre consacré aux matériel et méthodes, nos marquages sont spécifiques et révèlent vraisemblablement la présence de NPY dans le NARC chez les Mammifères étudiés. La qualité des marquages obtenus chez l'Homme à l'aide d'un immunosérum anti-NPY porcin démontre bien que les anticorps utilisés reconnaissent le peptide

d'origine humaine, comme le laissait prévoir la grande homologie structurale des deux molécules (MINTH et al., 1984). Nous avons de plus étudié la distribution du fragment C-t du pré-pro-NPY (C-PON) à l'aide d'un immunsérum ne reconnaissant pas le NPY (ALLEN et al., 1985). Dans toutes les espèces examinées, toutes les structures NPY-I sont aussi C-PON-I, ce qui confirme de précédents travaux (GULBEKIAN et al., 1985 ; CAILLEZ et al., 1987) et montre bien que nos réactions anti-NPY détectent bien la présence de NPY vrai.

Nos descriptions de l'importante population neuronique NPY-I du NARC chez le Rat, le Chat et l'Homme, sont en parfait accord avec les études précédemment effectuées dans ces mêmes espèces (ADRIAN et al., 1983 ; ALLEN et al., 1983 ; PELLETIER et al., 1984a ; voir DE QUIDT et EMSON, 1986b et EVERITT et al., 1986 ; LEGER et al., 1987). Toutefois, l'absence d'IR-NPY de la zone externe de l'émittance médiane, que nous avons rapportée ici chez quatre Mammifères et que nous avons aussi occasionnellement constatée chez le Lapin et la Souris, et ce, chez des animaux traités ou non par la colchicine, n'a semble-t-il pas attiré l'attention de tous les auteurs. Certaines études immunohistochimiques chez le Rat utilisant des antisérums anti-NPY ne mentionnent pas cette particularité frappante (ALLEN et al., 1983 ; CHRONWALL et al., 1985 ; NAGAKAWA et al., 1985 ; WOODHAMS et al., 1985) alors que d'autres, utilisant des antisérums anti-APP (CARD et al., 1983) ou anti-NPY (DE QUIDT et EMSON, 1986b ; EVERITT et al., 1986 ; CIOFI et al., 1987a) l'illustrent et la discutent. Comme nous l'avons déjà exposé, ces neurones NPY-I du NARC constituent un système tubéro-extra-infundibulaire n'innervant l'émittance médiane que dans la zone subépendymaire. Celle-ci contient des corps cellulaires (dont certains sont NPY-I) qui représentent l'extension la plus ventrale du NARC, comme l'a suggéré RETHELYI (1975) chez le Rat. Des observations semblables ont été effectuées chez le Hamster (SABATINO et al., 1987) et le Singe-Ecureuil (SMITH et al., 1985). L'innervation NPY-I de la zone subépendymaire pourrait être en relation avec les capillaires du plexus vasculaire irrigant cette région, mais seule une étude en microscopie électronique peut apporter une telle information. L'essentiel des projections du système neuronique NPYergique du NARC intéresse donc le NARC lui-même et d'autres territoires centraux, comme nous en discuterons plus loin.

C - Le marquage anti-CCK de l'aire hypophysiotrope :

Les résultats des tests radioimmunologiques et immunohistochimiques de spécificité démontrent que les marquages des IS 15/8 et IS 86 ne sont pas dus à

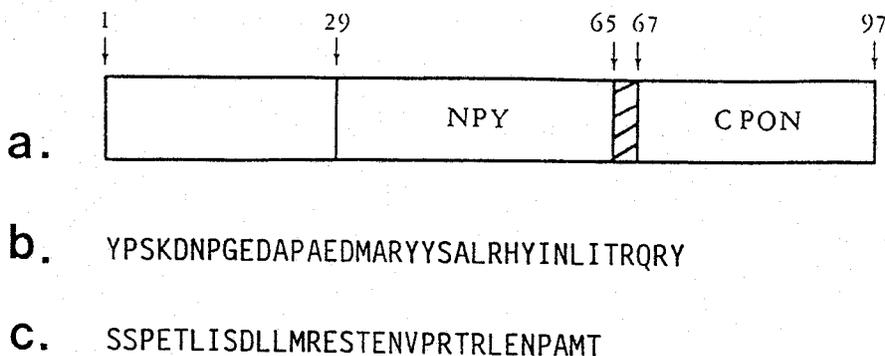


Fig.10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRE-PRO-NPY HUMAIN.

La molécule complète, déduite de l'ADN possède 97 AA (Ref. 4).

a, position du neuropeptide Y (NPY) et son extension C-t (C-PON) dans le précurseur. La partie hachurée représente la séquence (Gly⁶⁵-Lys⁶⁶-Arg⁶⁷) donneuse d'amide lors du clivage post-traductionnel libérant le NPY.

b, séquence du NPY humain. La molécule d'origine porcine, qui a servi d'haptène dans la production de l'immunsérum anti-NPY (Ref.2), ne s'écarte que d'un seul AA de la molécule humaine (Leu au lieu de Met⁴⁵) (Ref. 4).

c, séquence utilisée comme haptène dans la production de l'immunsérum anti-C-PON employée dans la présente étude (Ref. 1 et 3).

Références :

1. ALLEN et al., Neuropeptides, 6 (1985) 95-100.
2. CIOFI et al., Neuroendocrinology, 45 (1987) 425-428.
3. GULBEKIAN et al., Peptides, 6 (1985) 1237-1243.
4. MINTH et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 4577-4581.

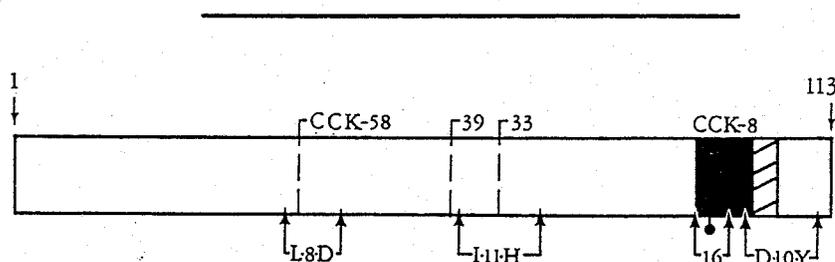


Fig.11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PRE-PRO-CCK DU RAT.

La molécule complète, déduite de l'ADN, possède 113 AA (Ref. 5).

La position dans le précurseur, des différentes séquences utilisées comme haptènes dans la production des immunsérums dirigés contre les extrémités N-t de la CCK-58 (L-8-D, Réf. 1), de la CCK-33 (I-11-H, Ref. 1) du CCK-8 (IS 16), et contre l'extension C-t du CCK-8 (D-10-Y, Ref. 2 et 3), est indiquée entre crochets.

La partie noircie représente le CCK-8 contre lequel les immunsérums 15/8 (Ref. 4,6,8) et 86 (Ref.7) ont été produits, et la partie hachurée la séquence (Gly¹⁰⁴-Arg¹⁰⁵-Arg¹⁰⁶) donneuse d'amide lors du clivage post-traductionnel de la pré-pro-CCK.

, tyrosine sulfatée.

Références :

1. A notre connaissance, jusqu'à ce jour, aucune étude faisant état de l'emploi de ces immunsérums (obtenus auprès de M.C. Beinfeld, St.Louis, U.S.A.) n'est disponible dans la littérature.
2. ALLARD et BEINFELD, Neuropeptides, 6 (1985b) 239-245.
3. BEINFELD, M.C., Peptides, 6 (1985b) 857-860.
4. CIOFI et TRAMU, Neurosci. Lett., 62 (1985) 293-298.
5. DESCHENES et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984) 726-730.
6. ENGELHARDT et al., Cell Tissue Res., 227 (1982) 401-411.
7. STUDLER, J.M., Thèse de Sciences, Paris VI, 1985.
8. STUDLER et al., Brain Res., 298 (1984) 91-97.

une réaction croisée avec le NPY ou le hGHRF.

Jusqu'à ce jour, notre étude chez le Cobaye (CIOFI et TRAMU, 1985) est la seule à décrire un marquage anti-CCK dans des neurones du NARC dans le cerveau de Mammifère. L'abondante bibliographie relative à la détection immunohistochimique de la CCK dans le cerveau du Rat (revue dans VANDERHAEGHEN, 1985) ne fait pas état de telles observations dans cette espèce. Ce marquage particulier n'est pas non plus rapporté chez le Hamster (MICELI et al., 1987). De même, chez le Cobaye (LARSSON et REHFELD, 1979) cette particularité n'est pas notée, mais il est possible que l'absence de marquage soit due au fait que l'étude a été effectuée chez des animaux non colchicinisés.

Toutefois, comme nous l'avons précisé dans la première partie de ce mémoire, un marquage anti-CCK/gastrine a été décrit dans des neurones de l'infundibulum chez un Poisson (la Truite arc-en-ciel, NOTENBOOM et al., 1981), un Amphibien (le Xénope, DOERR-SCHOTT et al., 1979a et b) et chez un Reptile (la Tortue, REINER et BEINFELD, 1985). Ces travaux ont été réalisés grâce à l'emploi d'IS reconnaissant la gastrine et le CCK-8 dans leur région C-t. En particulier, DOERR-SCHOTT et al., (1979a et b) insistent bien sur le fait que chez le Xénope, les corps cellulaires infundibulaires G/CCK-I, qui sont les seuls corps cellulaires à avoir réagi dans le cerveau de cet Amphibien, ne sont pas marqués par un immunosérum anti-(2-17)hG17I ne croisant pas avec la cholécystokinine. Ces observations doivent être rapprochés d'une étude biochimique plus récente (DIMALINE, 1983) suggérant que le matériel CCK-I du cerveau de Batracien représente du CCK-8. C'est également ce qui est aussi rapporté chez la Tortue (REINER et BEINFELD, 1985). Les neurones G/CCK-I de l'infundibulum chez ces animaux pourraient donc contenir du CCK-8 vrai.

Nos propres résultats mettent en évidence de fortes différences interspécifiques quant à la présence d'IR-CCK dans des neurones infundibulaires chez les Mammifères. Ainsi, chez le Rat, seul l'IS 15/8 visualise, et très faiblement, des corps cellulaires dans le NARC. Cette IR-CCK n'est révélée que si l'IS 15/8 est appliqué faiblement dilué (1/50) en incubation longue (12H ou plus). Cela suggère que cet IS a une faible affinité pour l'antigène présent dans ces corps cellulaires ou bien que l'antigène est présent en faible quantité. L'IS 15/8 donne par ailleurs des marquages dans l'ensemble du cerveau du Rat qui sont en bon accord avec la littérature (voir la première partie). Chez l'Homme comme chez le Cobaye, seul l'IS 15/8 marque des neurones dans le NARC, et ce de façon modérée, mais bien plus intense que chez le Rat. Chez le Chat et le Lapin, les deux IS détectent des corps cellulaires dans le NARC, alors qu'aucun deux ne visualise ces neurones chez la Souris.

Ces observations à première vue contradictoires nous ont conduit à nous

demander si un traitement enzymatique des coupes avant réaction chez le Cobaye serait pas susceptible de démasquer une IR-CCK dans le NARC, comme cela a été observé en particulier pour la substance P par KREAM et al. (1985) chez le Hamster. Reprenant les conditions techniques décrites par ces auteurs, nous avons recherché si une trypsinisation douce des coupes de cerveau de Cobaye ne modifiait pas la distribution des marquages donnés par les IS 15/8 et IS 86 dans le NARC chez cet animal. Effectivement, ce traitement (1 ug de trypsine/ml de tampon de Coons pendant une heure) conduit à la détection de neurones dans le NARC par l'IS 86. Le marquage obtenu demeure d'intensité inférieure à celui donné par l'IS 15/8 (raison pour laquelle nous ne l'avons pas illustré) mais intéresse apparemment la même population neuronique. La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques formées par les résidus lysyl et arginyl. Dans la CCK du Cobaye (voir Fig.9 et 11), seule l'extension N-t du CCK-8 est connue (ZHOU et al., 1985). Celle-ci débute par un résidu arginyl. Si l'on considère que la phenylalanine C-t du CCK-8 est amidée, on peut s'attendre à ce que les acides aminés suivants soient, comme dans la CCK de l'Homme, du Porc, du Rat et de la Souris, un résidu glycyli lié à un doublet d'arginines. Le traitement enzymatique des coupes de cerveau de Cobaye auraient donc libéré du CCK-8-Gly à partir d'une molécule de plus grande taille portant une extension C-t masquant l'épitope reconnu par l'IS 86. Ainsi les différences de marquage obtenues d'une espèce à l'autre dans les neurones du NARC, pourraient s'expliquer par une variation du métabolisme post-traductionnel de la pré-pro-CCK. Chez le Chat et le Lapin la CCK du système tubéro-extra-infundibulaire du NARC serait en grande partie présente sous la forme de CCK-8 alors que chez le Rat, le Cobaye et l'Homme, les formes moléculaires de CCK dans ce système seraient de plus grande taille. Comme nous l'avons mentionné dans la première partie du présent mémoire, de telles entités moléculaires ont été extraites du cerveau du Rat (ALLARD et BEINFELD, 1985a et b ; BEINFELD, 1985a et b) et du cortex cérébral du Porc (ENG et al., 1983 ; REHFELD et HANSEN, 1986), ce qui renforce cette idée. Toutefois, nous n'avons obtenu aucun marquage, ni chez le Cobaye ni chez le Rat, en utilisant des IS dirigés contre les extensions N-t et C-t du CCK-8 (BEINFELD, 1985a) de la pré-pro-CCK d'origine murine (voir Fig.11). De même, des IS anti-(1-17)hG34I, anti-(1-6)hG17I (voir Fig.8) et anti-(26-29)pCCK-33 (voir Fig.11) n'ont donné aucun marquage chez le Cobaye, le Rat ou chez le Chat.

Il ne nous est donc pas possible de conclure sur la signification de l'IR-CCK détectée dans les neurones du NARC chez les Mammifères étudiés. Des données d'hybridation in situ pourraient apporter un élément de réponse, mais la littérature est très pauvre à ce sujet, et ne concerne que le thalamus (SIEGEL et YOUNG, 1985).

D - Le marquage anti-hGHRF de l'aire hypophysiotrope :

La recherche du facteur hypothalamique responsable de la stimulation de la sécrétion hypophysaire somatotrope, ou somatolibérine (GHRF), a abouti à l'extraction en 1982 par Guillemin et al. et par Rivier et al. de peptides montrant une forte activité sécrétagogue vis à vis de la GH hypophysaire in vitro (BRAZEAU et al., 1982 ; GUILLEMIN et al., 1982 ; RIVIER et al., 1982) comme in vivo (GUILLEMIN et al., 1982 ; RIVIER et al., 1982 ; WEHREBERG et al., 1983) à partir de tumeurs pancréatiques provenant de patients présentant des symptômes d'acromégalie. Ces GHRF ont été isolés sous trois formes moléculaires de 44 (GHRF1-44NH₂ ; GUILLEMIN et al., 1982 ; BOHLEN et al., 1983a), 40 (GHRF1-40OH ; ESCH et al., 1982 ; GUILLEMIN et al., 1982 ; RIVIER et al., 1982 ; BOHLEN et al., 1983a) et de 37 acides aminés (ESCH et al., 1981 ; GUILLEMIN et al., 1982 ; BOHLEN et al., 1983a) qui furent retrouvées dans l'hypothalamus humain (BOHLEN et al., 1983b ; LING et al., 1984) et reconnues comme différents fragments de la somatolibérine humaine, possédant 44 AA et ayant son extrémité C-t amidée, ou hGHRF1-44NH₂ (hGHRF) (pour une revue récente, voir THORNER et al., 1986 et WEHREBERG et al., 1986). Chez le Rat, la somatolibérine n'a été extraite que sous une seule forme de 43 AA (rGHRF1-43OH, rGHRF) possédant 67% d'homologie structurale avec le hGHRF1-44NH₂ (SPIESS et al., 1983).

Les études immunohistochimiques de la distribution de la somatolibérine dans le cerveau ont montré qu'elle était contenue dans des neurones du NARC hypothalamique et dans une dense innervation périportale de l'émence médiane, chez l'Homme (BLOCH et al., 1983b et 1984a) comme chez le Rat (BLOCH et al., 1984b), le Cobaye (TRAMU et al., 1983) et le Chat (BUGNON et al., 1983). Chez le Rat, l'induction de lésions chimiques électives du NARC par le traitement néonatal au glutamate monosodique a permis de démontrer que les neurones du NARC sont à l'origine de l'innervation périportale visualisée dans l'émence médiane (BLOCH et al., 1984b), définissant ainsi le système hypophysiotrope tubéro-infundibulaire somatolibérinergique (BLOCH et al., 1984b ; DAIKOKU et al., 1986 ; MERCHENTHALER et al., 1986) libérant le GHRF dans le sang porte hypophysaire (WEHREBERG et al., 1982 ; TANNENBAUM et LING, 1984 ; PLOTSKY et VALE, 1985).

La littérature relative à la détection immunohistochimique de la somatolibérine dans le cerveau des Mammifères est abondante, et comme nous

		10	20	30	40
		↓	↓	↓	↓
rGHRF	<u>H</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>N</u>				
hGHRF	<u>Y</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>*</u>				
PHI-27	<u>H</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>*</u>				
VIP	<u>H</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>*</u>				
Glucagon	<u>H</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u>				
Secretin	<u>H</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>*</u>				
GIP	<u>Y</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>Q</u>				

Fig 12 : COMPARAISON DES SEQUENCES DES GHRF d'origine humaine (hGHRF) et murine (rGHRF) avec les membres de la famille glucagon-sécrétine d'origine porcine.

Les aminoacides en position identique sont soulignés.

* , Extrémité C-t amidée

- PHI27 , Peptide Histine-Isoleucine ;
 VIP , Peptide Vasoactif Intestinal ;
 GIP , Gastric Inhibitory Peptide.
 (d'après SPIESS et al., 1983).

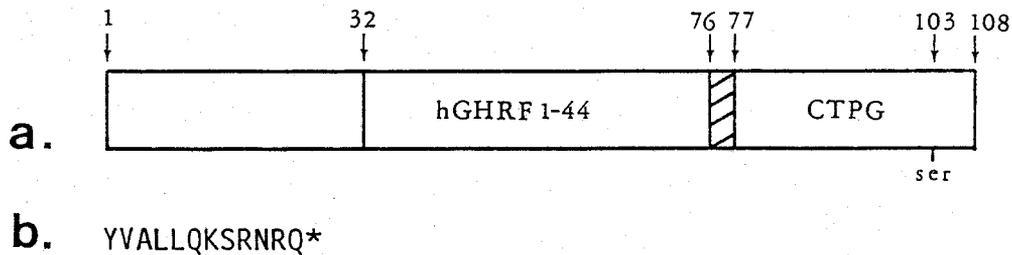


Fig.13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PRE-PRO-GHRF HUMAIN.

La molécule complète, déduite de l'ADN possède 107 ou 108 AA (Ref. 2 et 3).

a, position de la somatolibérine (hGHRF₁₋₄₄) et de son extension C-t (CTPG) dans le précurseur. La partie hachurée représente le doublet (Gly₇₆-Arg₇₇) donneur d'amide lors du clivage post-traductionnel libérant le hGHRF 1-44 NH₂.

b, séquence utilisée comme haptène (Tyr¹⁸CTPG(19-30)NH₂) dans la production de l'immunsérum anti-CTPG employé dans la présente étude (Ref. 1).

L'immunsérum anti-GHRF a été produit contre le hGHRF1-44 NH₂ (Ref. 4).

* , extrémité C-t amidée

Références :

1. BLOCH et al., Endocrinology, 118 (1986) 156-162.
2. GUBLER et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 4311-4314.
3. MAYO et al., Nature, 306 (1983) 86-88.
4. TRAMU et al., C.R. Acad. Sci. Paris., 297 (1983) 435-440.

allons en discuter, les marquages anti-hGHRF que nous avons rapportés ici entrent par certains points, en contradiction avec plusieurs études précédemment publiées.

Nos résultats font état du marquage, dans toutes les espèces étudiées, de nombreux neurones distribués dans l'ensemble du NARC ainsi que d'un plexus nerveux dense dans la zone externe de l'éminence médiane, à l'aide d'un immunsérum dirigé contre le hGHRF 1-44 NH₂.

La détection de terminaisons périportales dans l'éminence médiane externe que nous avons décrite ici est en bon accord avec les précédents travaux utilisant des IS anti-hGHRF aussi bien chez l'Homme en réaction antigène-anticorps homologue (BLOCH et al., 1983b, 1984a et 1986 ; BRESSON et al., 1984 ; PELLETIER et al., 1986) qu'hétérologue chez le Chat (BUGNON et al., 1983) ou le Rat (JACOBOWITZ et al., 1983 ; DAIKOKU et al., 1985). Des marquages similaires ont été obtenus par de nombreux auteurs en utilisant des IS anti-rGHRF1-43OH chez le Rat (voir CIOFI et al., 1987a). Nos résultats montrent que l'IS 81 utilisé ici reconnaît la molécule à destinée hypophysaire qui est contenue dans les terminaisons périportales de la zone externe. De plus, et comme nous l'avons illustré chez l'Homme, les axones hGHRF-I péricapillaires que nous visualisons sont aussi CTPG-I, ce qui suggère qu'ils appartiennent au système tubéro-infundibulaire somatolibérinergique. Comme nous l'avons exposé dans le chapitre consacré aux matériel et méthodes, les tests de spécificité démontrent que l'IS 81 reconnaît parfaitement le hGHRF1-44NH₂ et le rGHRF1-43 OH qui éteignent à faible dose toute IR-hGHRF dans l'ensemble du cerveau, comme nous l'avons constaté en particulier chez le Rat. Ces données nous permettent de considérer que l'IR-hGHRF que nous avons détectée en réaction homologue ou hétérologue (chez le Chat, le Cobaye, et le Rat) dans l'éminence médiane est spécifiquement due à la présence de somatolibérine dans le système tubéro-infundibulaire de ces Mammifères. A cet égard, précisons que l'obtention de bons marquages dans des espèces aussi diverses que le Chat, le Cobaye, le Rat et l'Homme suggère que l'IS 81 est dirigé contre un épitope commun à la somatolibérine du Chat, du Cobaye, du Rat et de l'Homme. Les séquences des GHRF du Cobaye et du Chat ne sont pas connues. Toutefois, les bons marquages anti-CTPG que nous avons obtenus chez le Cobaye et le Chat (résultats non illustrés), plaident pour l'existence d'une étroite parenté du précurseur du GHRF de l'Homme et de ces deux espèces. Aucune IR-CTPG n'a pu être obtenue chez le Rat, ce qui paraît être dû aux notables différences structurales existant entre le pré-pro-GHRF de l'Homme et celui du Rat dans leur portion C-t (GUBLER et al., 1983 ; MAYO et al., 1983 et 1985a et b).

Comme nous en avons discuté plus haut, les neurones hGHRF-I que nous

avons visualisés dans les parties ventrolatérales et dorsales du NARC chez les quatre Mammifères étudiés, constituent très vraisemblablement la population neuronique à l'origine de l'innervation périportale hGHRF-I détectée conjointement dans la zone externe de l'éminence médiane. Contrairement aux péricaryons hGHRF-I localisés dans le NARC médian, ils ne contiennent ni l'IR-NPY ni l'IR-CCK.

Chez le Rat, leur distribution toujours ventrolatérale dans le NARC est très similaire à celle des neurones qu'ont décrite de nombreux auteurs dans cette espèce à l'aide d'IS anti-rGHRF1-43OH (BLOCH et al., 1984b ; DAIKOKU et al., 1985 et 1986 ; MERCHENTHALER et ARIMURA, 1985 ; MERCHENTHALER et al., 1984a et 1986 ; OKAMURA et al., 1985 ; SAWCHENKO et al., 1985 ; DE GENNARO et al., 1986 ; EVERITT et al., 1986 ; HOKFELT et al., 1986 IBATA et al., 1986 ; ISHIKAWA et al., 1986 ; MEISTER et al., 1986 ; VANDE POL et al., 1986) ou anti-hGHRF (JACOBOWITZ et al., 1983 ; MERCHENTHALER et al., 1984b).

Chez le Cobaye, les neurones du NARC hGHRF-I, en position ventrolatérale et dorsale, qui ne contiennent ni l'IR-NPY ni l'IR-CCK sont distribués dans la même zone que les neurones CTPG-I, comme le montre l'examen de coupes adjacentes. Cela suggère fortement qu'ils représentent une population neuronique précise constituant aussi chez cet animal le système hypophysiotrope somatolibérinergique.

Une telle conclusion peut aussi être avancée en ce qui concerne les marquages obtenus chez le Chat.

Chez l'Homme, les marquages anti-hGHRF ont été comparés sur les mêmes coupes après élution des anticorps aux marquages anti-CTPG et anti-NPY. Seules les cellules les plus dorsales du NARC, ainsi que celles distribuées dans le noyau ventromédian, contiennent l'IR-CTPG qui n'est en général pas associée à l'IR-NPY. En accord avec de précédents travaux (BLOCH et al., 1986), l'IR-CTPG a toujours été trouvée associée à l'IR-hGHRF. La coexistence des IR-hGHRF et IR-CTPG ayant été constatée à la fois dans des neurones du NARC et dans des terminaisons péricapillaires de la zone neurovasculaire, nous concluons que l'IR-hGHRF obtenue chez l'Homme intéresse très vraisemblablement la totalité du système tubéro-infundibulaire somatolibérinergique de l'aire hypophysiotrope.

Cependant, comme nous l'avons montré chez l'Homme et le Cobaye, la réciproque n'est pas vraie. En effet, l'IS anti-hGHRF1-44NH₂ utilisé ici marque à la fois le système somatolibérinergique et le système à IR-(NPY, CCK). Ce dernier est constitué de neurones localisés dans les régions médianes du NARC, et cela dans toutes les espèces étudiées.

Ces observations d'un marquage anti-hGHRF dans des neurones à localisation périventriculaire dans le NARC, au moins chez le Rat (CIOFI et

TRAMU, 1986b et c ; CIOFI et al., 1987a), ne constituent pas un exemple isolé dans la littérature. Un tel marquage dans cette espèce a été rapporté précédemment par SMITH et al. (1984) à l'aide d'un IS anti-hGHRF1-400H, et par DAIKOKU et al. (1985) à l'aide d'un anti-hGHRF1-44NH₂. Dans le dernier cas, les auteurs montrent que trois IS, tous produits contre le hGHRF1-44NH₂, détectent des structures différentes de l'hypothalamus médiobasal du Rat. Parmi ces trois IS, l'un marque faiblement la zone externe de l'éminence médiane et quelques péricaryons dans l'hypothalamus médiobasal ; un autre ne marque pas l'éminence médiane mais de nombreux péricaryons dans l'hypothalamus dorsal ; le dernier enfin donne un marquage tout à fait semblable à celui que nous obtenons dans cette espèce avec notre propre IS, c'est-à-dire un marquage de l'éminence médiane, de nombreux péricaryons dans le NARC médian et de quelques neurones ailleurs dans l'hypothalamus (selon les auteurs, cet IS reconnaîtrait un épitope porté par la séquence (27-44) du hGHRF1-44NH₂.

Chez le Rat, la distribution de la somatolibérine a été étudiée à l'aide d'IS dirigés contre, soit le hGHRF (JACOBOWITZ et al., 1983 ; MERCHENTHALER et al., 1984b ; SMITH et al., 1984 ; DAIKOKU et al., 1985 ; FELLMANN et al., 1985 et 1986), soit le rGHRF1-430H (BLOCH et al., 1984b ; DAIKOKU et al., 1985 et 1986 ; MERCHENTHALER et ARIMURA, 1985 ; MERCHENTHALER et al., 1984a et 1985 ; OKAMURA et al., 1985 ; SAWCHENKO et al., 1985 ; DE GENNARO et al., 1986 ; EVERITT et al., 1986 ; HOKFELT et al., 1986a ; IBATA et al., 1986 ; ISHIKAWA et al., 1986 ; MEISTER et al., 1986 ; VANDE POL et al., 1986).

Tous les marquages anti-rGHRF1-430H intéressent de façon similaires des neurones distribués dans le NARC ventrolatéral et dans la région péri-ventromédiane et sous-fornicale de l'hypothalamus médio-basal.

Les marquages obtenus à l'aide d'IS dirigés contre la molécule complète de hGHRF ou un de ses fragments naturels, sont plus différents entre eux. L'utilisation chez le Rat d'IS anti-hGHRF1-370H permet (FELLMANN et al., 1985) ou ne permet pas (FELLMANN et al., 1986) la visualisation de neurones dans le NARC latéroventral. Cependant dans ces deux publications, les auteurs rapportent le marquage de nombreux neurones dans l'hypothalamus dorsal (FELLMAN et al., 1985 et 1986) et dans des régions extra-hypothalamiques (FELLMANN et al., 1985). Des IS anti-hGHRF1-400H ou anti-hGHRF1-44NH₂ ne marquent pas (BLOCH et al., 1983b ; DAIKOKU et al., 1985 ; FELLMANN et al., 1986) ou marquent, préférentiellement, des neurones dans le NARC latéroventral (JACOBOWITZ et al., 1983 ; MERCHENTHALER et al., 1984b ; FELLMANN et al., 1985) ou dans le NARC médian (SMITH et al., 1984 ; DAIKOKU et al., 1985 ; CIOFI et al., 1987a), avec, dans ce dernier cas, un marquage de structures extra-hypothalamiques (SMITH et al., 1984) qui a été aussi décrit chez le Chat (BUGNON et al., 1983).

L'ensemble de ces résultats suggère que des substances inconnues apparentées au hGHRF sont présentes dans le cerveau du Rat et que leur visualisation préférentielle ou exclusive dépend, en partie au moins, de la nature des populations d'immunoglobulines spécifiques contenues dans chaque IS polyclonal utilisé. L'une de ces substances, apparentée au hGHRF1-37 OH, a été détectée dans un système de neurones peptidergiques préalablement identifié et correspondant au groupe de cellules à -mélanotropine de l'hypothalamus dorsal (FELLMANN et al., 1985, 1986 et 1987). Dans ce système d'interneurones qui, comme le système tubéro-extra-infundibulaire à IR-(CCK,hGHRF, NPY), est sans relation avec l'émittance médiane, la substance apparentée au hGHRF pourrait exercer un rôle de neuromodulateur.

Les descriptions de la distribution des structures hGHRF-I que nous donnons dans l'hypothalamus médiobasal du Chat sont en parfait accord avec les précédents travaux effectués dans cette espèce par BUGNON et al. (1983). Ces auteurs rapportent que l'IS anti-hGHRF1-44NH₂ qu'ils ont utilisé marque, en dehors de la région infundibulaire, de nombreux péricaryons et une innervation dense dans les régions limbiques et striatales. C'est ce que nous avons aussi observé avec notre propre IS. De plus, la distribution des structures hGHRF-I "extra-infundibulaires" chez le Chat ressemble fortement à ce que SMITH et al. (1984) et nous même avons observé chez le Rat. Comme nous l'avons montré, ces systèmes hGHRF-I sont identiques aux systèmes neuroniques à NPY. Ces données suggèrent que différents IS anti-hGHRF1-44NH₂ (BUGNON et al., 1983 et la présente étude) ou anti-hGHRF1-400H (SMITH et al., 1984) sont susceptibles de marquer les mêmes structures, en détectant peut être la même substance.

Chez les Primates, les études immunohistochimiques de la distribution de la somatolibérine ont été réalisées à l'aide d'IS anti-hGHRF1-400H (BLOCH et al., 1983a et b et 1984a et 1986) et anti-hGHRF1-44NH₂ (BLOCH et al., 1984b et 1986 ; LECHAN et al., 1984). Ces travaux, réalisés chez le Singe-Ecureuil et le Macaque (BLOCH et al., 1983a), le Singe Rhésus (LECHAN et al., 1984) et chez l'Homme (BLOCH et al., 1984a), font état d'un marquage de neurones localisés dans les parties basses du noyau ventromédian et dans les régions dorsales et latérales du NARC. Les documents présentés mettent bien en évidence l'absence de neurones immunoréactifs en position médiane ventrale et périventriculaire dans le NARC, régions dans lesquelles sont distribués les neurones que nous montrons contenir l'IR-(CCK,hGHRF, NPY). La substance que nous détectons chez l'Homme n'a semble-t-il donc pas été visualisée par les IS précédemment utilisés chez les Primates. Seul l'un d'entre eux a, à notre connaissance, été testé chez le Rat (BLOCH et al., 1983a), espèce dans laquelle il n'a conduit à aucun marquage. De même, aucun des auteurs ayant utilisé un IS anti-hGHRF en

immunohistochimie "hétérologue" chez le Rat ne précise le comportement de ce même IS sur matériel humain. Ces données incomplètes rendent donc impossible les parallèles, si tant est qu'ils puissent avoir une quelconque signification, entre la présence ou l'absence corrélées du marquage de neurones dans le NARC médian chez l'Homme et chez le Rat. Notre IS visualise ces neurones dans toutes les espèces étudiées (Cobaye, Rat, Chat, Lapin, Homme) sauf chez la Souris. La signification de cette différence interspécifique demeure obscure.

Comme nous l'avons rapporté dans le chapitre consacré aux matériel et méthodes, les tests radioimmunologiques et immunohistochimiques démontrent la spécificité des marquages obtenus avec notre IS anti-hGHRF1-44NH₂ (IS 81). Ils excluent en particulier toute éventualité de réaction croisée avec le NPY. Afin de savoir quelle est la séquence reconnue par l'IS 81, nous avons testé en RIA son l'affinité pour deux fragments du hGHRF commercialisés par Peninsula, les fragments 1-29NH₂ et 30-44NH₂, soit en les portions N-t et C-t de la somatolibérine humaine. Les résultats montrent que si l'IS 81 a une forte affinité pour le hGHRF1-44NH₂, il présente peu d'affinité pour les fragments 1-29NH₂ et 30-44NH₂ (0,02% et 0,07%, respectivement). Ces données montrent que la présence de la séquence complète du hGHRF1-44NH₂ est essentielle à la bonne liaison des anticorps et donc que l'IS 81 pourrait reconnaître un motif résultant de la structure tertiaire de la molécule. Il se peut aussi, que l'IS 81 soit dirigé contre une séquence dont l'intégrité n'est respectée dans aucun des deux fragments, par exemple, la séquence (28-32). La question de la nature de l'IR-hGHRF présente dans les neurones du NARC chez les Mammifères étudiés recevra certainement un élément de réponse intéressant lorsque nous préciserons dans l'avenir le site moléculaire reconnu par notre IS 81.

Deux études récemment publiées sont à considérer dans cette optique. DAIKOKU et al. (1985) ont montré, comme nous l'avons déjà mentionné, qu'un IS produit contre le hGHRF1-44NH₂ (codé anti-hpGRF-MC), ne croisant ni avec le hGHRF1-37OH ni avec le hGHRF1-40OH et reconnaissant la séquence (27-44) du hGHRF1-44NH₂, visualise chez le Rat de nombreux péricaryons localisés dans les régions médianes du NARC, donnant donc un marquage parfaitement identique à celui que nous avons décrit dans cette espèce. Utilisé par SHIBASAKI et al. (1984) dans le dosage de l'IR-hGHRF de l'hypothalamus humain, ce même IS (codé TR 1223) ne détecte qu'un seul pic d'immunoréactivité dans les extraits. Ce pic élue, de façon identique au hGHRF1-44NH₂. De façon très indirecte, les résultats suggèrent que l'IR-hGHRF abondante que nous détectons chez l'Homme dans le système tubéro-extra-infundibulaire est due à la présence d'hGHRF vrai. Il faut cependant souligner que cette possibilité entre en contradiction avec l'absence apparente d'immunoréactivité de ce système chez les Primates, d'une

part à d'autres IS dirigés également contre le hGHRF (BLOCH et al., 1983a et b, 1984a ; LECHAN et al., 1984) et d'autre part à l'IS anti-CTPG.

En conclusion, l'analyse de la bibliographie relative à l'immunohistochimie (homologue et hétérologue) du GHRF chez le Rat comme chez le Primate, ne fait apparaître aucun consensus. Les études d'hybridation in situ en cours (Bertrand BLOCH, communication personnelle) et à venir apporteront certainement des éléments de réponse qui permettront d'interpréter les divergences actuelles.

E - Les projections des neurones (CCK, hGHRF, NPY)-I :

Si les connexions nerveuses du NARC sont en général connue (voir VAN DEN POL et CASSIDY, 1982 ; CHRONWALL, 1985 et PALKOVITS, 1986), sauf en ce qui concerne le système neuronique POMCergique (voir KHACHATURIAN et al., 1985), peu d'informations sont disponibles sur les projections centrales de telle ou telle population neuronique peptidergique qu'il contient.

Les éfferences NPYergiques du NARC sont encore mal définies. Par l'emploi, chez le Rat, de techniques de marquage rétrograde combinées à l'immunocytochimie, deux études ont rapporté l'existence de projections "arcofuges" NPYergiques vers l'aire préoptique médiane et la substance grise périaqueducale (CHRONWALL, 1985 ; YAMANO et al., 1985). D'autres auteurs ont montré qu'après lésion électrolytique (BAI et al., 1985) ou chimique (JACOBOWITZ et OLSCHOWKA, 1982a et b) du NARC, la majorité de l'innervation NPY-I et BPP-I des noyaux hypothalamiques paraventriculaires et dorsomédians est fortement réduite. Cela suggère que les neurones NPYergiques du NARC, comme les neurones POMCergiques (SAWCHENKO et al., 1982), projettent dans le NPV et l'aire hypothalamique dorsale. NAGAKAWA et al. (1985) proposent que le système NPYergique du NARC est à l'origine d'une grande partie de l'innervation NPYergique de l'hypothalamus.

Dans le cerveau du Rat, la comparaison de la distribution des innervations NPY-I et ACTH-I fait ressortir, comme nous l'avons rapporté, l'existence d'analogies frappantes. Ces deux innervations sont très similaires par leur distribution et leur orientation apparente dans tout le système limbique. De plus, comme les neurones à NPY, les neurones à POMC ne projettent pas dans l'éminence médiane externe (JOSEPH, 1980 ; KNIGGE et JOSEPH, 1981 ; KNIGGE et al., 1981 ; TRAMU et al., 1982). Cela laisse à penser que les neurones NPYergiques et les neurones POMCergiques du NARC constituent deux systèmes tubéro-extra-infundibulaires innervant conjointement les mêmes régions centrales.

Comme le système POMCergique qui élabore plusieurs molécules susceptibles d'agir en tant que neuromodulateurs dans le SNC (voir TRANCHAND-BUNEL et al., 1987), le système NPYergique du NARC élaborerait des substances apparentées à la cholécystokinine (CIOFI et TRAMU, 1985 et 1986b et c), à la somatolibérine humaine (CIOFI et al., 1987a,b,c et d), à la somatostatine (CHRONWALL et al., 1985, et la présente étude) et aux enképhalines (EVERITT et al., 1986). L'arrangement précis de ces différents neuropeptides dans les neurones NPYergiques du NARC n'est pas encore définitivement établi. Ces multiples cas de coexistence entre neuromodulateurs font néanmoins penser à l'existence dans ce système de sous-populations neuroniques distinctes pouvant chacune exercer des fonctions particulières.

Les neurones POMCergiques et NPYergiques du NARC ne constituent pas les deux seules populations neuroniques peptidergiques tubéro-extra-infundibulaires de cette région. Il a en effet été montré que les neurones à somatostatine du NARC ne projettent pas dans l'éminence médiane externe (EPELBAUM et al., 1981 ; KAWANO et al., 1982 ; MAKARA et al., 1983). Ces données suggèrent, qu'en partie au moins, les neurones somatostatinerigiques du NARC auraient des projections analogues à celles des neurones POMCergiques et NPYergiques de cette région.

Ainsi, le NARC serait constitué d'une composante tubéro-infundibulaire hypophysiotrope, représentée par les neurones multipeptidergiques et aminergiques distribués dans ses régions dorsales périventriculaires et latéroventrales, et d'une composante tubéro-extra-infundibulaire, représentée par les neurones élaborant - de façon combinée ou non - le NPY, la somatostatine, les dérivés de la POMC et des précurseurs des enképhalines, ainsi que des peptides apparentés à la somatolibérine humaine et à la cholécystokinine (voir Figure).

Quelle pourrait être la fonction de tels systèmes tubéro-extra-infundibulaires ?

F - Hypothèse relative à la fonction des neurones (CCK, hGHRF, NPY)-I :

L'innervation NPY-I de l'hypothalamus est abondante. Elle est en particulier distribuée dans les régions constituant l'aire hypophysiotrope au sens large, contenant les neurones lilibérinergiques de la région septopréoptique, les neurones somatostatinerigiques de l'aire périventriculaire, les neurones corticolibérinergiques et thyrolibérinergiques du noyau paraventriculaire et les neurones somatolibérinergiques du noyau arqué. Il

semble donc que les neurones à NPY du NARC envoient leurs axones dans toutes les régions contenant des neurones projetant dans l'éminence médiane, comme le remarque MEZEY et al. (1985) pour les neurones à POMC.

Nous avons effectué des réactions immunohistochimiques visualisant, chez le Rat colchicinisé, en un premier temps, l'innervation NPY-I en bleu par le 4-chloro-1-naphtol, et en un second temps, les différents neurones hypothalamo-infundibulaires en rouge par la 3-amino-9-éthylcarbazole (BOORSMA, 1984, voir Matériel et Méthodes au IV, B, 3). Les images obtenues montrent que des axones NPY-I se trouvent dans l'environnement immédiat, autour et vraisemblablement au contact, de neurones producteurs de facteurs hypophysiotropes dans toutes les régions examinées. Ces observations, suggérant l'existence de synapses NPYergiques sur les corps cellulaires et/ou les dendrites proximales des neurones hypophysiotropes, doivent bien entendu être confirmées (ou infirmées) par des études de microscopie électronique.

En accord avec ces observations en microscopie photonique, une étude récente en microscopie électronique chez le Rat, rapporte l'existence de synapses axo-dendritiques NPYergiques dans l'aire périventriculaire et le NARC (PELLETIER et al., 1984b). Ces résultats doivent être rapprochés de travaux récents montrant que le NPY injecté dans les ventricules cérébraux influe sur la fonction neuroendocrine au niveau hypothalamique (KERKERIAN et al., 1985 ; McDONALD et al., 1985 ; HARFSTRAND et al., 1986 et 1987).

Deux études immunohistochimiques effectuées au laboratoire chez le Cobaye à l'aide de l'IS 81 en microscopie électronique ont décrit la présence d'IR-hGHRF dans des terminaisons axoniques dans le NARC (BEAUVILLAIN et al., 1987a) et dans le NPV (BEAUVILLAIN et al., 1987b). Dans ces deux régions, les terminaisons hGHRF-I établissent des contacts synaptiques axo-somatiques et/ou axo-dendritiques avec des neurones non marqués. Ces résultats suggèrent que la substance hGHRF-I détectée par l'IS 81 a vraisemblablement un rôle neuromodulateur dans le NARC et le NPV. Comme nous l'avons montré en microscopie photonique, la plus grande partie de l'innervation hGHRF-I du NARC et du NPV est aussi NPY-I. Il est donc vraisemblable que les terminaisons nerveuses visualisées par BEAUVILLAIN et al. (1987a et b) contiennent aussi du NPY et représentent les projections du système tubéro-extra-infundibulaire dans le NPV et le NARC chez le Cobaye. Ces terminaisons pourraient aussi contenir l'IR-CCK, ce qui serait à rapprocher des effets modulateurs de la CCK sur les fonctions neuroendocrines, effets que nous avons passé en revue dans la première partie de ce mémoire. Il reste à définir exactement les types cellulaires contactés dans le NARC et le NPV.

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que le système tubéro-

extra-infundibulaire à IR-(CCK,hGHRF,NPY) pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité neuroendocrine au niveau hypothalamique. Ces conclusions sont en accord avec la conception générale de l'intervention du NARC dans la modulation de l'activité des centres hypophysiotropes, comme le rappelle CHRONWALL (1985) dans une revue récente.

G - La coexistence des IR-hGHRF et IR-NPY dans le cerveau en général :

Nous avons montré ici chez le Rat, que l'IR-hGHRF est toujours associée à l'IR-NPY dans tous les neurones télencéphaliques et dans la plupart des neurones hypothalamiques (CIOFI et al., 1987d). Seuls quelques corps cellulaires de l'aire hypothalamique latérale et les neurones tubéro-infundibulaires ne contiennent que l'IR-hGHRF.

L'association quasi constante de ces deux immunoréactivités peut faire penser à l'existence dans le neurone d'un précurseur commun aux deux substances immunoréactives. Toutefois, comme nous l'avons précisé, d'assez nombreux corps cellulaires NPY-I ne montrent pas l'IR-hGHRF, et ce, à l'intérieur même d'une population neuronique donnée. En effet, certains neurones striataux ne sont que NPY-I, comme certains neurones du locus coeruleus. Ce fait, rattaché à l'observation de l'absence de corrélation stricte entre les intensités des deux immunoréactivités dans un même corps cellulaire (voir Fig.XXXIIIg1 et g2), plaide en faveur de l'existence de précurseurs différents pour la substance NPY-I et la substance hGHRF-I. De plus, chez l'animal non colchicinisé, l'IR-hGHRF des neurones corticaux, quoique rarement décelée, présente un conditionnement apparemment granulaire et diffus dans le cytoplasme, alors que l'IR-NPY est en général plus forte et essentiellement localisée en position périnucléaire, peut être dans l'appareil de Golgi.

Les systèmes neuroniques NPYergiques seraient donc capables de synthétiser une substance apparentée à la somatolibérine humaine, dont la production serait variable d'un neurone à l'autre.

Notons que le hGHRF possède comme NPY, la particularité d'agir sur la prise alimentaire après injection intraventriculaire (IMAKI et al., 1985 ; STANLEY et LEIBOWITZ, 1985 ; VACCARINO et al., 1985).

Retenons enfin que divers neurones diencephaliques mais surtout corticaux sont sensibles au hGHRF (TWERY et MOSS, 1985 et 1986). Chez le Rat, aucune innervation rGHRF-I n'a été décrite dans le cortex pariétal et le striatum alors que TWERY et MOSS (1985 et 1986) y ont trouvé des neurones sensibles au hGHRF uniquement. Ces données suggèrent l'existence dans le cortex du Rat de molécules neuromodulatrices qui sont apparentées au hGHRF.

En conclusion, nos observations de la présence d'IR-hGHRF dans une innervation dense dans tout le cerveau, rattachées, d'une part, à la démonstration de sa localisation intra-vésiculaire dans des terminaisons axoniques (BEUVILLAIN et al., 1987b), et d'autre part, aux effets comportementaux (VACCARINO et al., 1985) et électrophysiologiques du hGHRF1-44NH₂ (TWERY et MOSS, 1985 et 1986 ; POULAIN et CARETTE, 1986), sont en faveur de l'existence d'une substance apparentée à la somatolibérine humaine, co-facteur du NPY dans le système nerveux central des Mammifères.

CONCLUSION

Ces études de la neuroanatomie chimique du noyau arqué dans quatre espèces de Mammifères, dont l'Homme, démontrent la coexistence de peptides apparentés à la cholécystokinine et à la somatolibérine humaine dans la plupart des neurones à neuropeptide Y de cette région. Trois populations neuroniques initialement considérées comme différentes et pouvant être tenues pour contribuer au système tubéro-infundibulaire ont été reconnues comme constituant un unique système multipeptidergique tubéro-extra-infundibulaire.

La détermination de la nature des substances CCK- et hGHRF-immunoréactives qu'il contient constitue un projet à vocation purement biochimique qui est en cours de réalisation au laboratoire.

CONCLUSION GENERALE

=====

Un des principaux thèmes de cette étude concerne la coexistence dans un même neurone de plusieurs neuropeptides candidats potentiels à la neuromodulation. Ces observations appellent à s'interroger sur la signification moléculaire (existence d'un précurseur commun aux différents peptides dans la cellule) et fonctionnelle (part respective et rôles précis de chaque neuromodulateur dans le transfert de l'information).

Ces questions restent pour l'instant sans réponse définitive.

Signalons toutefois que la coexistence de neuromodulateurs dans un même neurone n'est pas un caractère propre au cerveau des Mammifères. Des observations semblables ont été effectuées chez les autres Vertébrés et chez de nombreux Invertébrés.

Dans ce dernier cas, les associations cholécystokinine-corticolibérine et cholécystokinine-somatolibérine qui ont été décrites ici chez l'Homme et le Cobaye, sont retrouvées, respectivement, chez une Annélide Polychète (DHAINAUT-COURTOIS et al., 1985) et chez un Insecte Odonate (J.C. ANDRIES, communication personnelle, ANDRIES et al., 1984).

La transmission chimique plurifactorielle est donc vraisemblablement un mécanisme mis en place très tôt dans l'évolution animale.

P L A N C H E S

A moins que cela ne soit spécifié, toutes les figures représentent des coupes frontales, chez des animaux traités par la colchicine.

Les abréviations sont données dans la légende de l'atlas du cerveau du Cobaye.

Planche I : STRUCTURES CCK-I DANS LE CORTEX.

a,b,c et f : Comparaison de la densité de l'innervation CCK-I du cortex frontopariétal (a, couche IV), temporal (b, couche III) et suprarhinal postérieur (c, couche II et f, couche IV). Antérieurement, seuls quelques axones CCK-I sont observés (flèches en a), alors que postérieurement, l'innervation CCK-I est plus dense et s'agence en formations périsonmatiques (pointes de flèches) autour de neurones non marqués (b, c et f 1 et 2) ou marqués (f 3).

b,d et e : Différents types cellulaires CCK-I, d'allure bipolaire (e2, cortex frontopariétal, couche II), multipolaire (e3, cortex temporal, couche VI), ou de la classe "bitufted" (b,d et e1). L'axone est souvent renflé dans sa portion proximale (grandes flèches en d et e1), puis se continue distalement (pointes de flèches) en se colatéralisant (petites flèches en d) comme le montre l'encart à fort grossissement en d (flèches).

Barre en a, b, c et d = 50 μ m
en e et f = 25 μ m

 , direction de la surface corticale.

Technique : a,b,d et e, réaction à la DAB intensifiée par l'argent, c et f, chloronaphtol.



G

Planche II : STRUCTURES CCK-I DANS L'AMYDALE

a : Région médiane de l'amygdale montrant une IR-CCK dense intéressant, dans le noyau médian (AME), ^{de la couche corticale} (flèches) et une innervation abondante (détaillée en b) périsonomatique et péricytoplasmatique (pointes de flèches) autour de neurones négatifs dont l'aspect diffère bien de celui présenté par la cellule monopolaire (flèche) au marquage clairement intracytoplasmatique.

c et d : Noyau cortical où l'on observe une innervation CCK-I périsonomatique (pointes de flèches) de la couche pyramidale (c et Pyr en d) et des neurones CCK-I bipolaires (c), monopolaires (1 en d) ou multipolaires (2 et 3 en d).

Barre en a = 200 μ m
en b, c et d = 50 μ m

Réactions à la DAB intensifiées par l'argent.

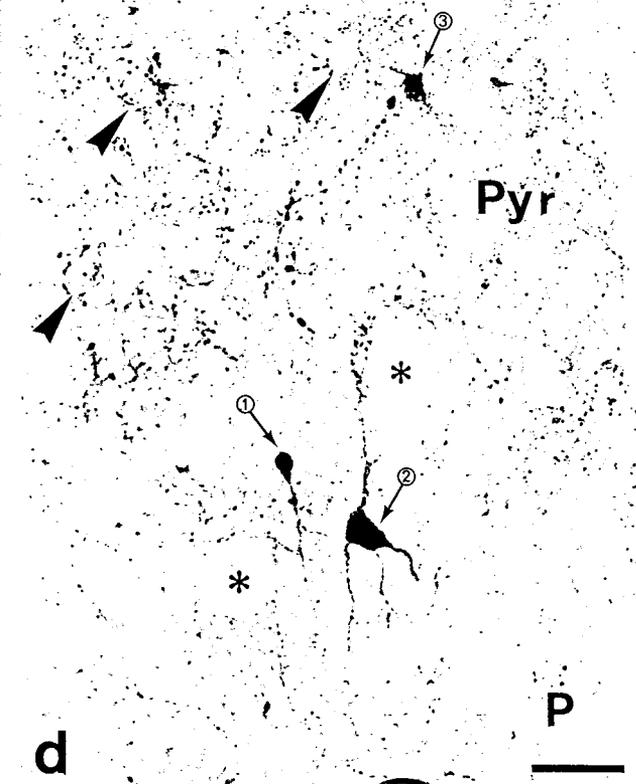
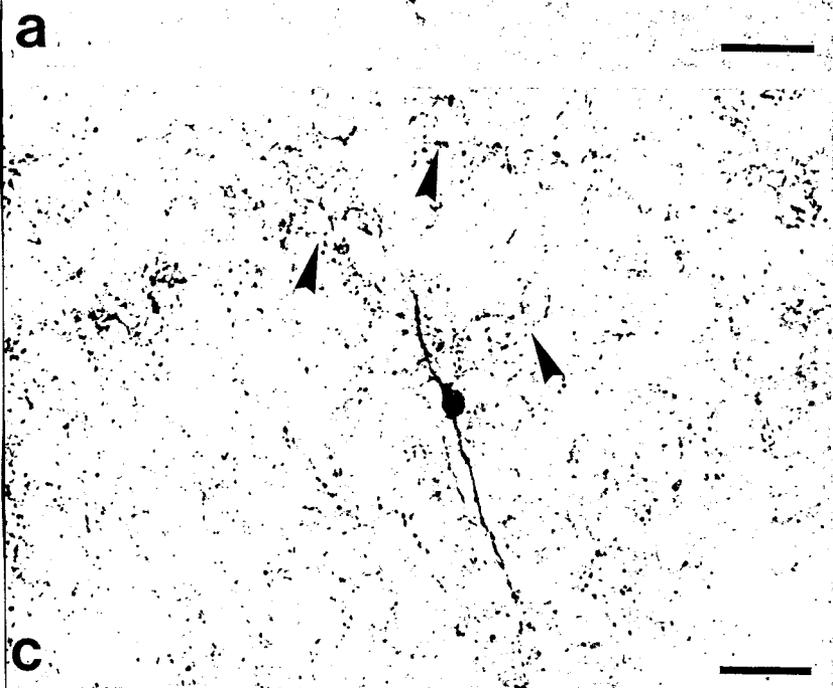
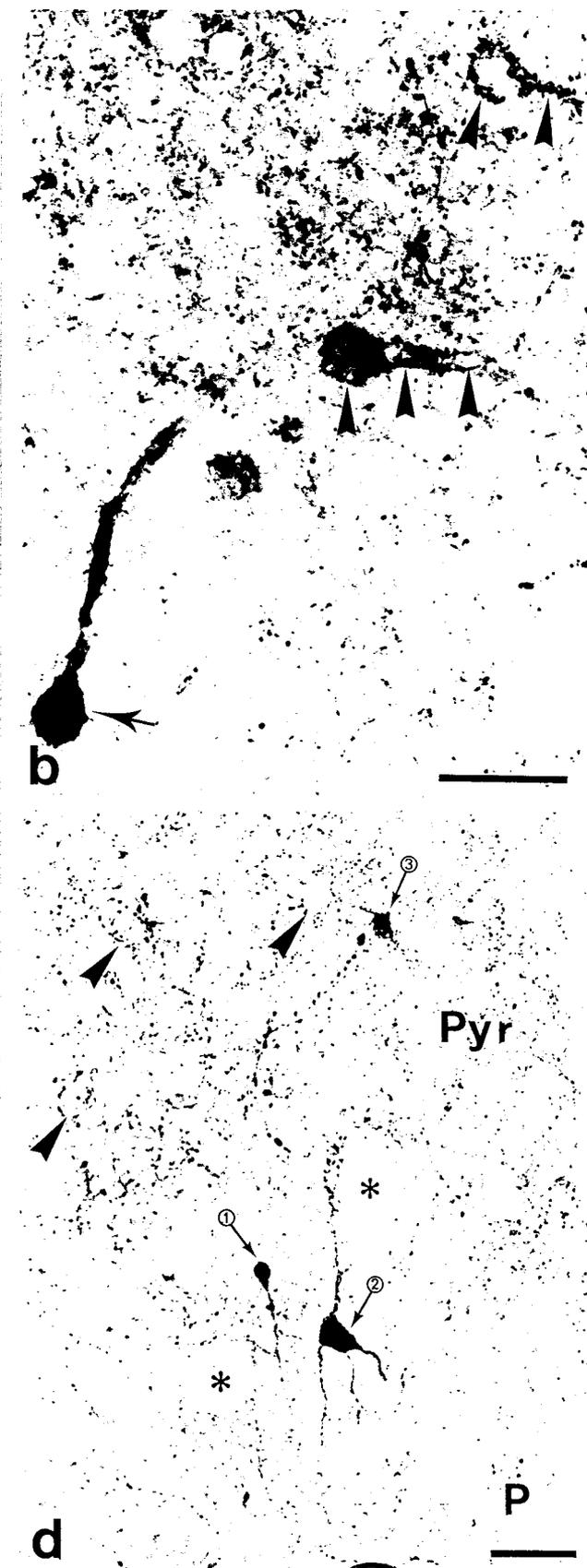
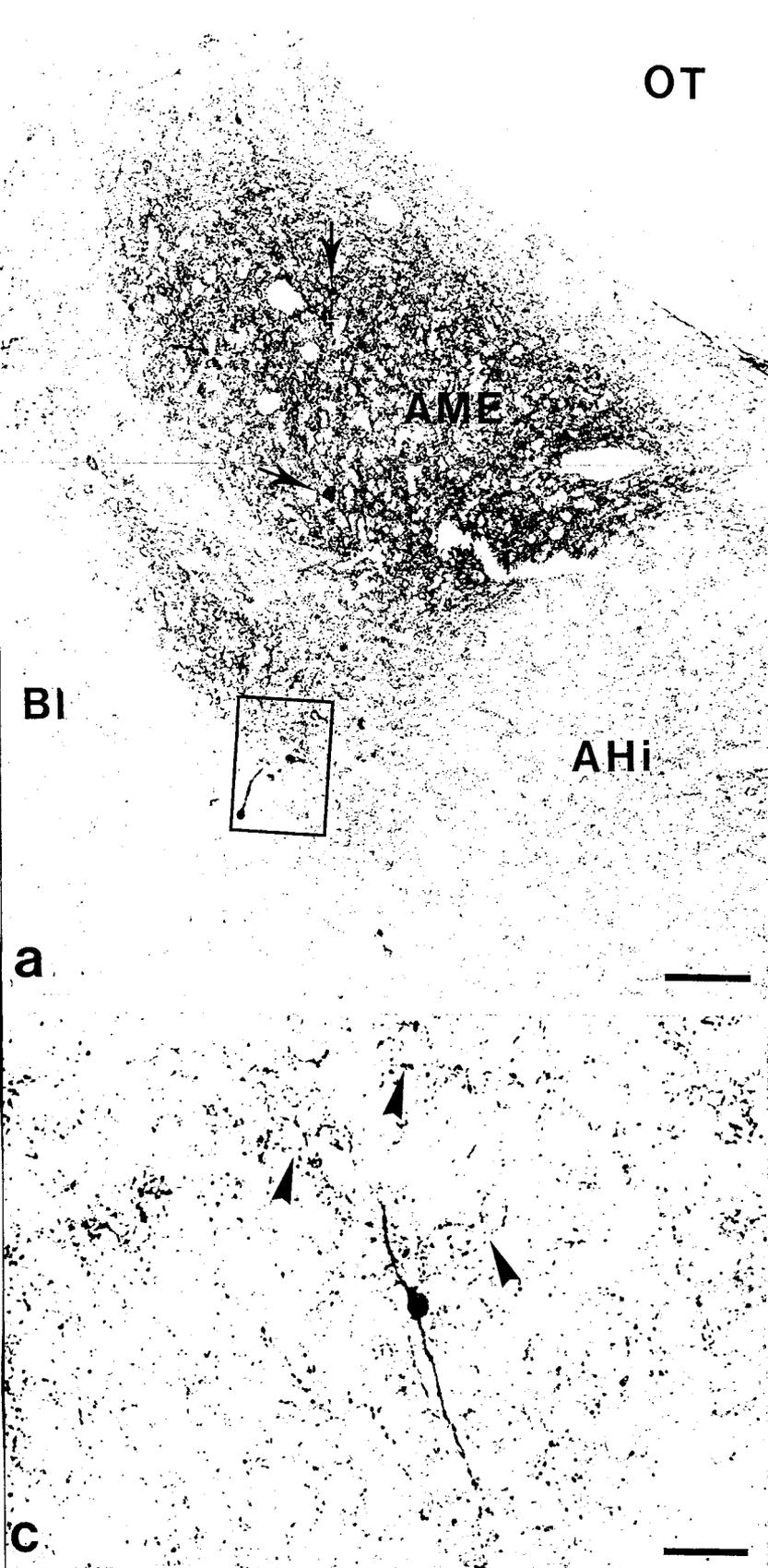


Planche III : STRUCTURES CCK-I DANS LE STRIATUM

L'IR-CCK intéresse des corps cellulaires polymorphes (b, et grandes flèches en a, putamen postérieur, en c, globus pallidus caudal, et d, portion moyenne du putamen), et une innervation constituée de fibres variqueuses (petites flèches en c) ^{ou de fibres laineuses (nombre de flèches en c)} formant des agrégats denses (flèche courbe en c et fig a). Certains corps cellulaires marqués envoient des prolongements nerveux dans les faisceaux (F) de substance blanche (pointe de flèche en a).

Barre en a et b = 25 μ m
en c et d = 50 μ m

Techniques : a et b, chloronaphtol

c et d, réaction à la DAB intensifiée par l'argent.

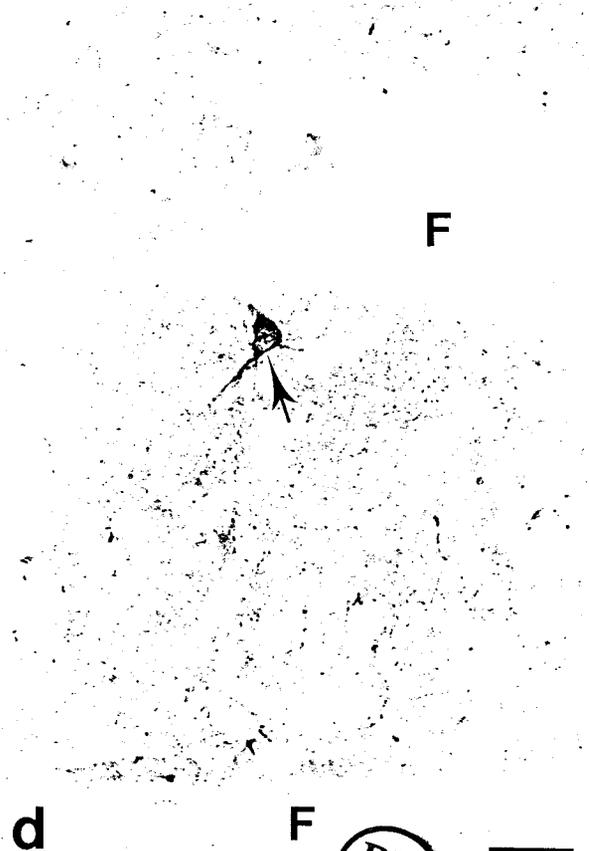
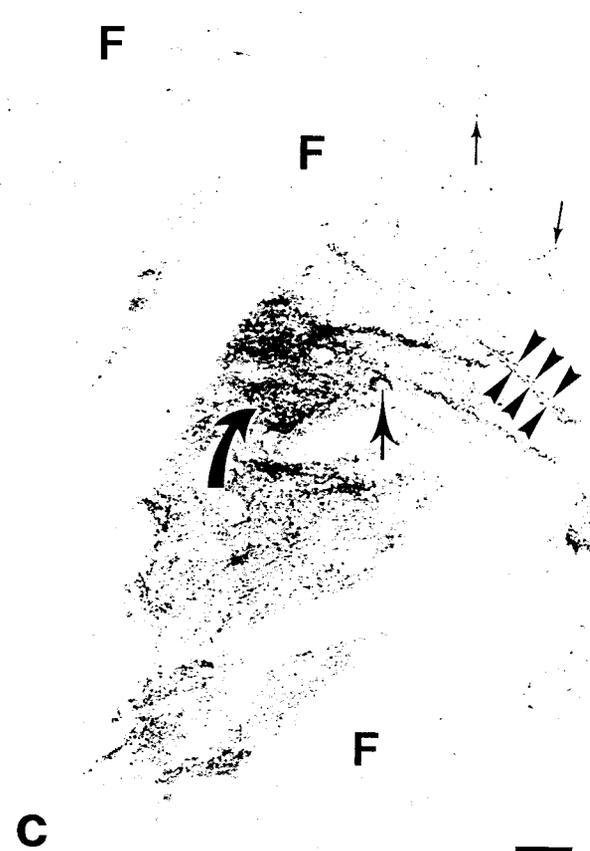
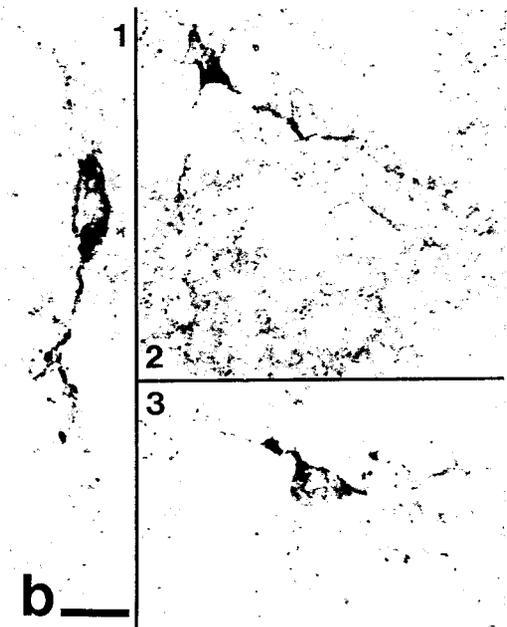
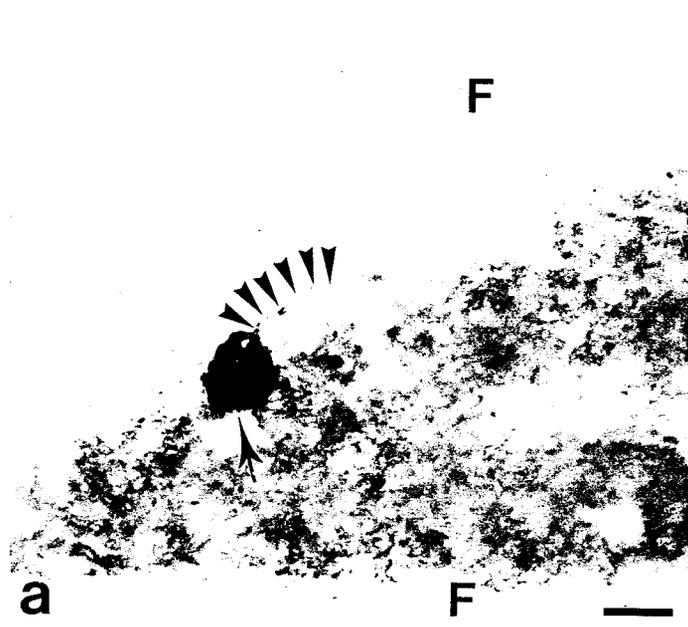


Planche IV : STRUCTURES CCK-I DANS LE NOYAU DU LIT DE LA STRIE TERMINALE.

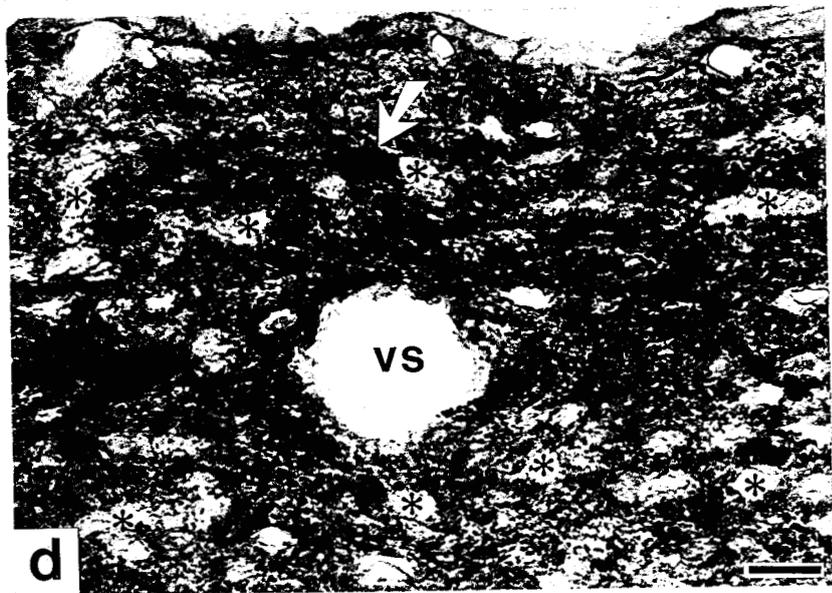
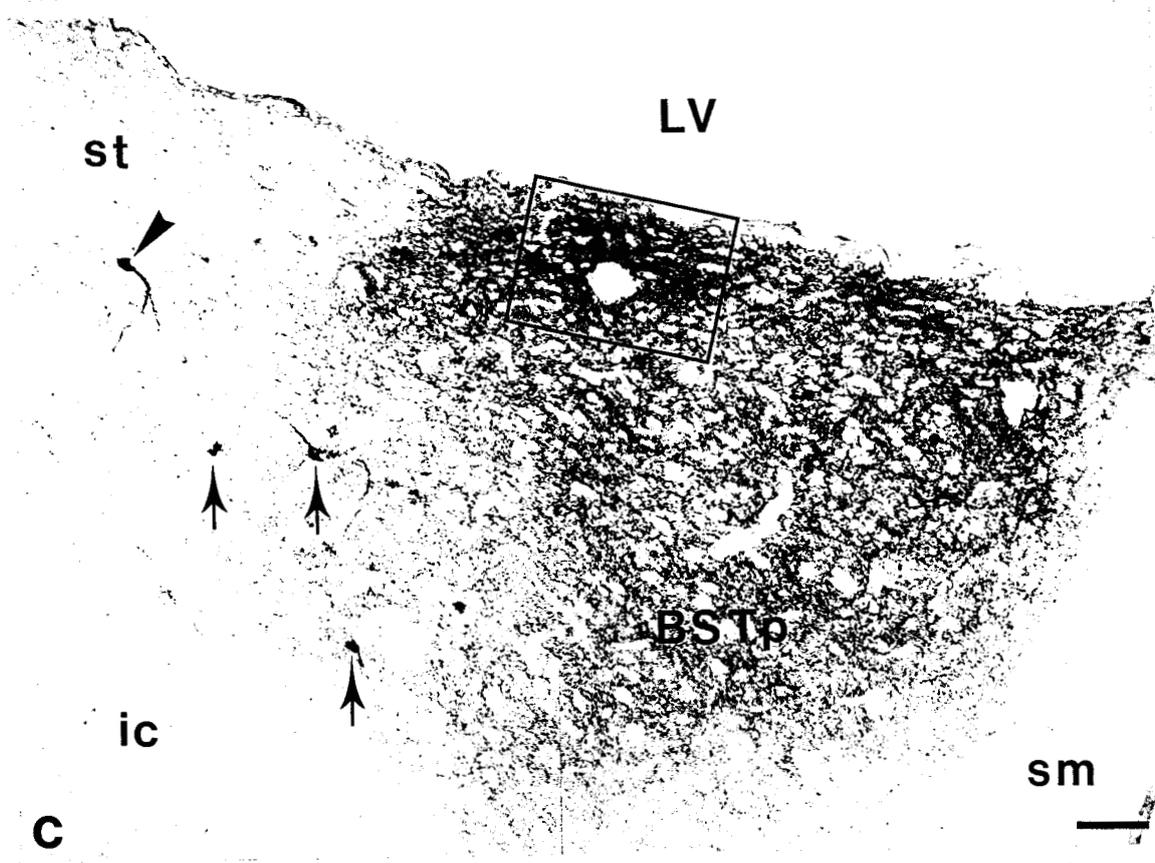
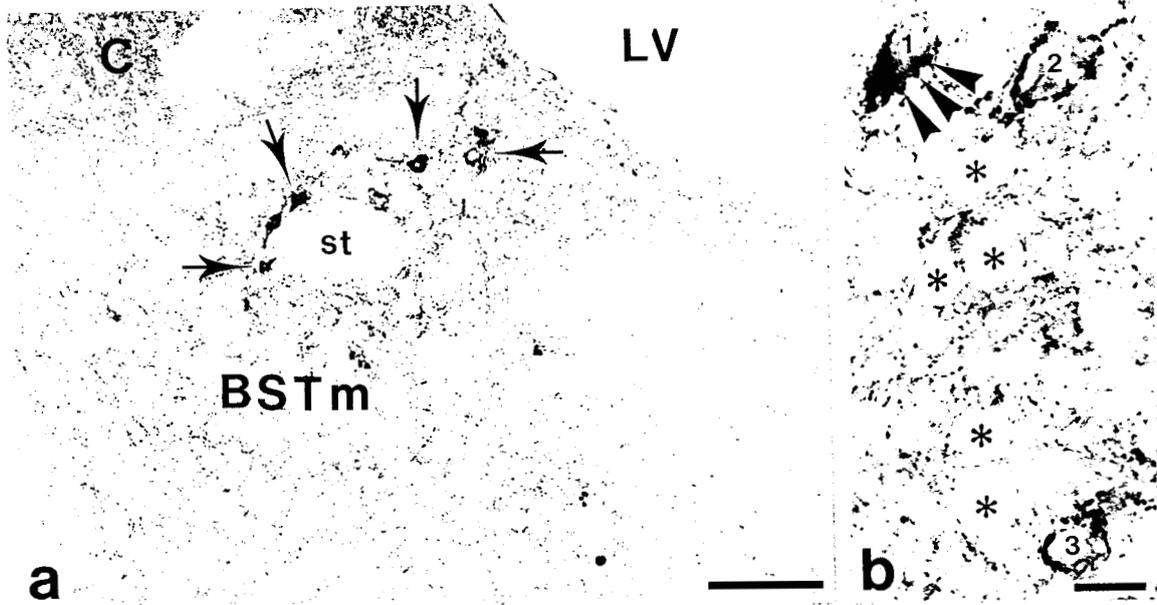
a et c : Vues générales des parties médianes (a, BSTm) et postérieures (c, BSTp) *et d* du noyau du lit de la strie terminale (st). Les corps cellulaires marqués (flèches) sont localisés autour de (a) ou dans la st (pointe de flèche en c), ainsi qu'en périphérie du BSTp (c). On observe dans cette région une innervation CCK-I très dense (c et fort grossissement en d) arrangée autour de neurones négatifs (* en d) et au voisinage de neurones positifs (flèche en d).

b et e : Détails de l'innervation CCK-I dans le BSTp, de neurones négatifs (2 et 3 en b, et en ~~e~~ ou marqués (1 en b, pointes de flèches), périsonomatique (flèches en e) et péridendritiques (pointes de flèches en e). Les astérisques indiquent des neurones ~~étant~~ *qui sont* faiblement ou pas innervés.

Abréviation trouvée dans cette planche uniquement : vs, vaisseau sanguin.

Barre en a et c = 100 μ m
en b, d et e = 25 μ m

Réactions au chloronaphtol



BU
LILLE

Planche V : STRUCTURES CCK-I DE LA REGION SEPTO-PREOPTIQUE

a et b : Innervation CCK-I des organes circumventriculaires. (a), organe subfornical. (b), organe preoptico-commissural (flèches) situé dans le plafond du troisième ventricule (3) dans l'aire préoptique médiane (MPO).

c : Innervation dense de l'aire préoptique médiane. 3V, troisième ventricule.

d : Innervation CCK-I périsonotique (flèches) dans le septum latéroventral (LSV). *, ventricule latéral.

e : Fibres variqueuses CCK-I (pointes de flèches) dans le bras postérieur de la commissure blanche antérieure (ac).

f : Groupe circulaire de petits neurones CCK-I (flèches) localisés en position suprachiasmatique dans l'aire préoptique médiane.

Abréviation trouvée dans cette planche uniquement : IF, foramen interventriculaire.

Barre dans toutes les figures = 50 μ m

Techniques : a à d : réactions à la DAB intensifiée par l'argent
e et f : chloronaphtol

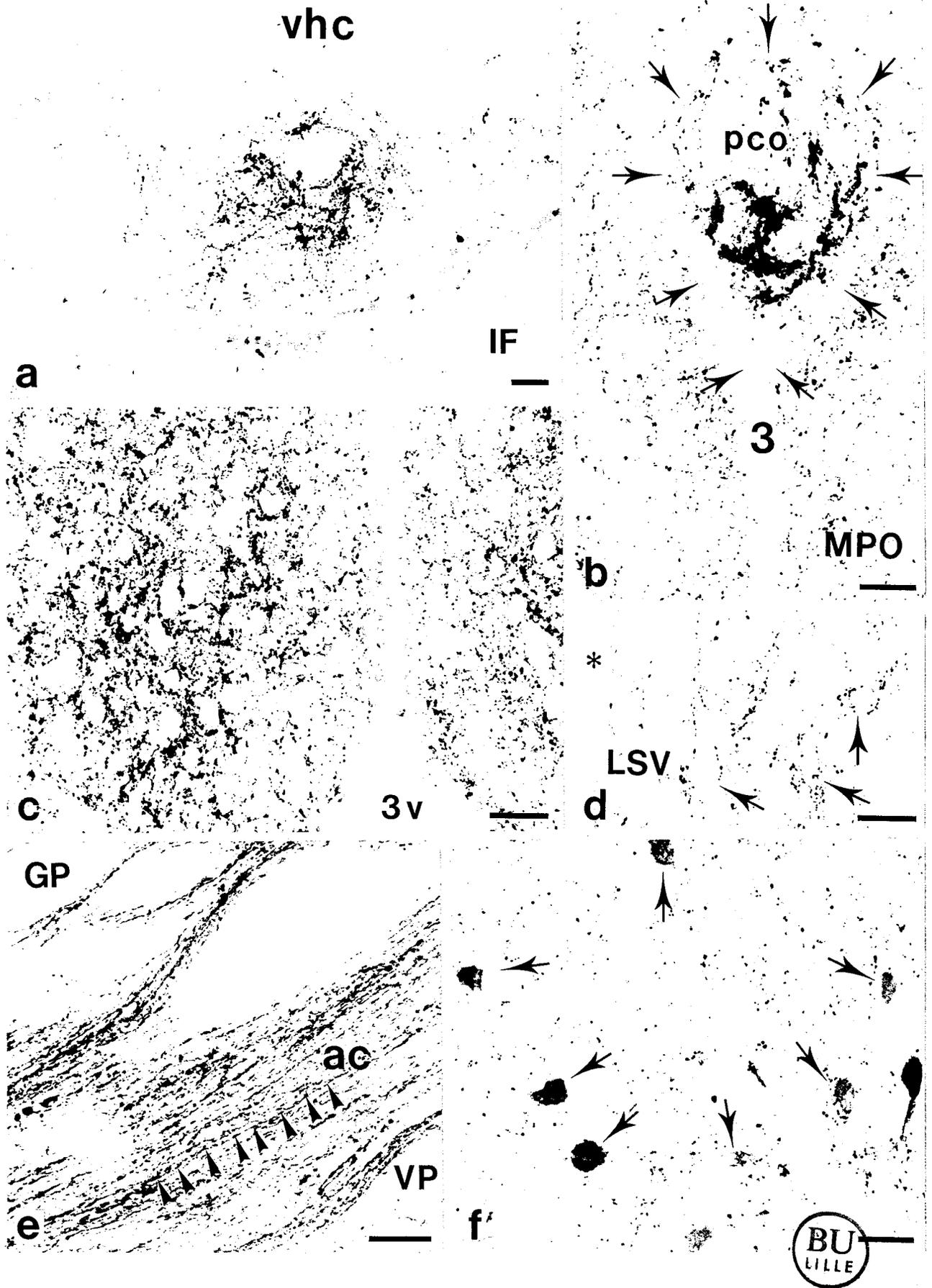


Planche VI : STRUCTURES CCK-I DE L'HYPOTHALAMUS MADIOBASAL

a, Vue générale du noyau arqué et de l'éminence médiane.

Dans le noyau arqué, les péricaryons sont localisés en position médiane et périventriculaires. Ils sont aussi présents dans la zone interne de la lèvre dorsale de l'éminence médiane.

Dans l'éminence médiane des fibres variqueuses CCK-I sont essentiellement observées en position péricapillaire (détail encadré en b), dans les plages dorsales et ventromédiane de la zone externe - *, recessus infundibulaire du 3ème ventricule.

b, Détail de l'innervation périportale CCK-I, montrant une fibre variqueuse marquée (pointe de flèche) courant contre un prolongement tanycytaire.

c, Aspect des péricaryons CCK-I du noyau arqué. Une grande cellule monopolaire côtoie de plus petits neurones de forme circulaire.

Les pointes de flèches ~~en a~~ indiquent des cellules CCK-I de la pars tubéralis (PT).

Barre en a = 200 μ m

en b et c = 50 μ m

Technique au chloronaphtol

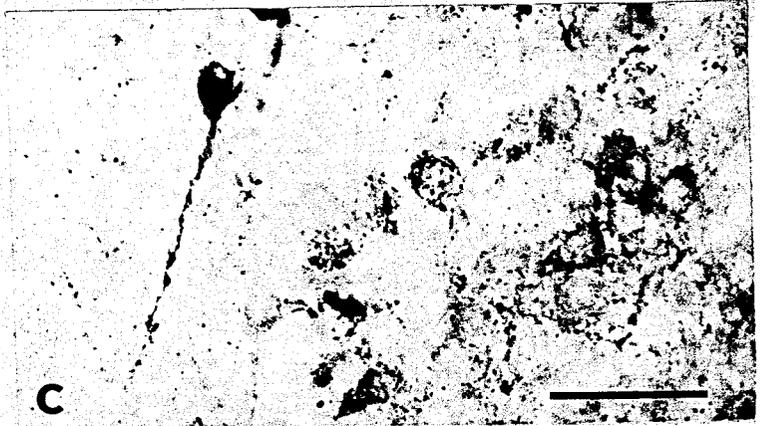
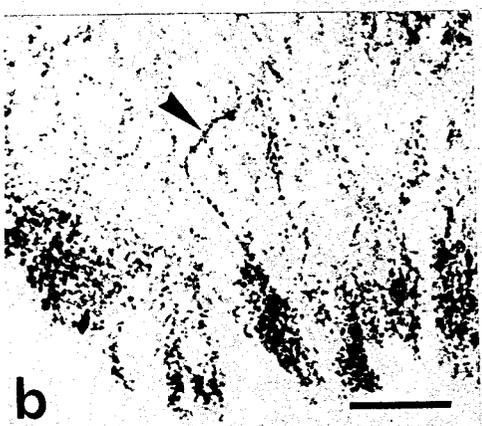
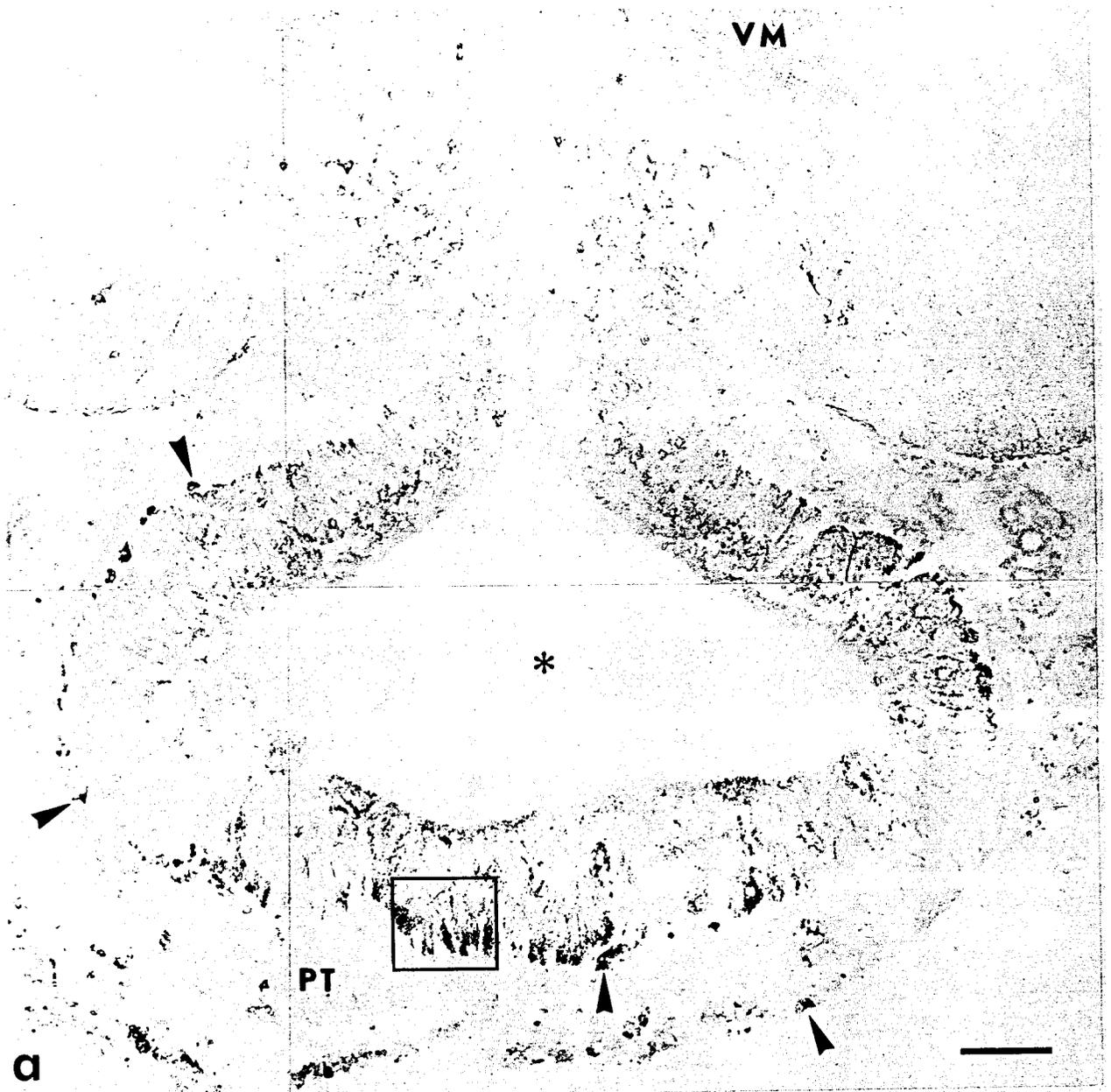


Planche VII : STRUCTURES CCK-I DE L'HYPOTHALAMUS MEDIOBASAL

a et b, Vues du noyau arqué antérieur (a) et postérieur (b) montrant la distribution toujours médiane des péricaryons CCK-I. *, recessus préamillaire du 3ème ventricule. Barre = 100 μ m.

c et d, Marquage anti-CCK de l'hypophyse qui intéresse, dans le lobe nerveux (PL) quelques rares fibres variqueuses distribuées en périphérie, et dans l'adénohypophyse, toutes les cellules du lobe intermédiaire (IL) et de nombreuses ^{petites} ~~peptides~~ cellules polygonales dans le lobe antérieur (AL) illustré à fort grossissement en (d). Barre en c = 100 μ m.

Réactions au chloronaphtol.

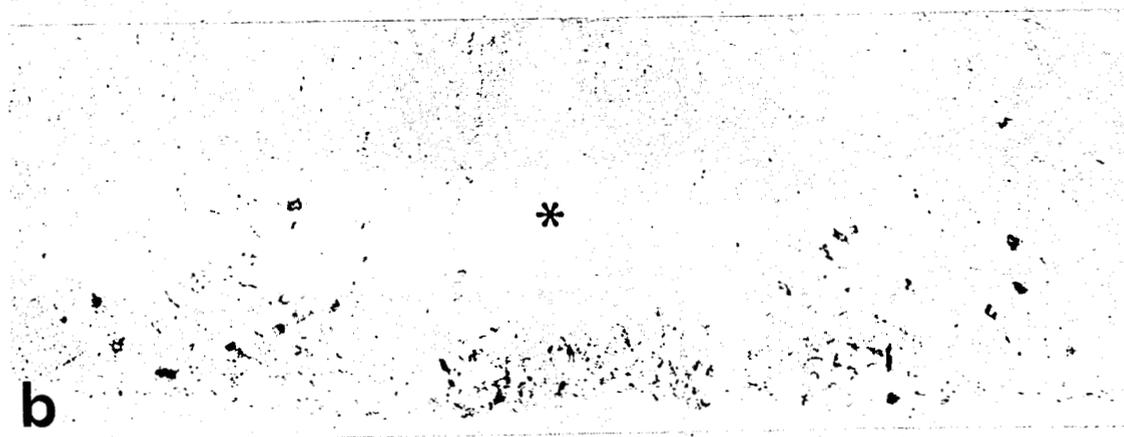


Planche VIII : MARQUAGE ANTI-CCK DANS L'ADENOHYPOPHYSE ET COLOCALISATION AVEC LA POMC.

a1, et a2 montrent la même coupe frontale dans le lobe antérieur de l'hypophyse d'un Cobaye mâle, qui, après une première réaction anti-CCK (a1) a été décolorée, éluée, et traitée avec un IS anti-(17-39) ACTH. (a2). La majorité des cellules 17-39 ACTH positives contiennent aussi l'IR-CCK (doubles flèches en a1 et a2). Certaines cellules CCK-I ne sont pas (17-39) ACTH-immunoréactives (flèches simples en a1).

b, marquage anti-CCK du lobe antérieur de l'hypophyse d'un Cobaye femelle. L'IR-CCK intéresse, d'une part de petites cellules faiblement marquées (petites flèches) qui sont pour la plupart des cellules à POMC et d'autre part de grandes cellules plus fortement marquées (grandes flèches) qui sont pour la plupart des cellules thyroïdiques.

Barre en a1 = 100 μ m
en b = 50 μ m

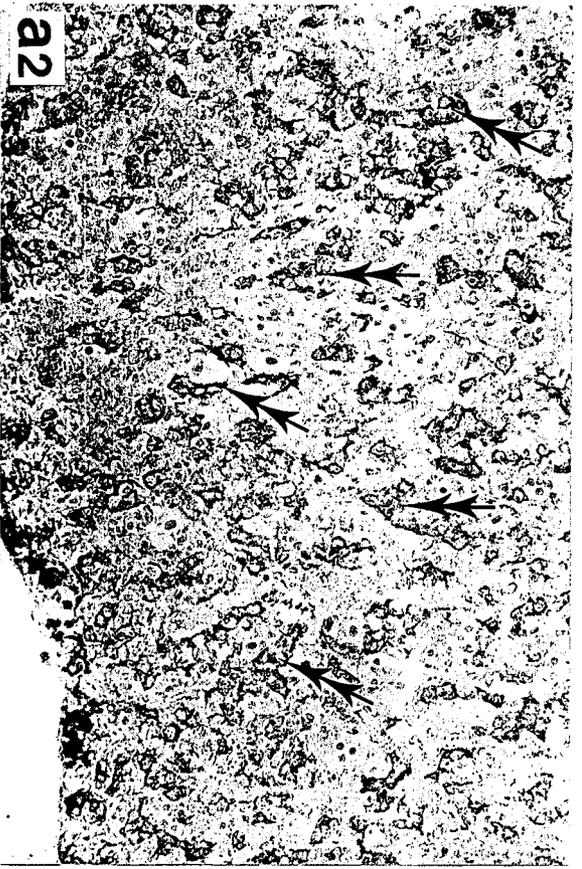
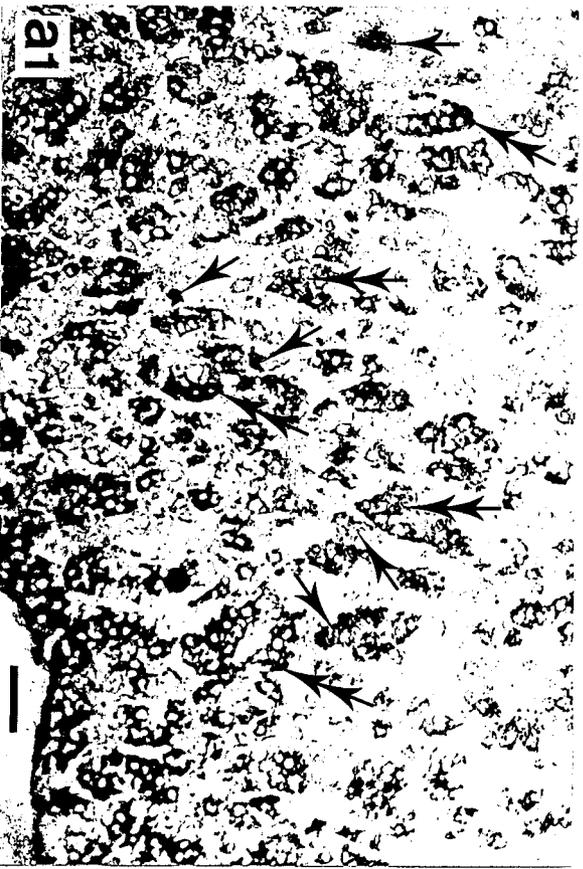


Planche IX : STRUCTURES CCK-I DANS LE THALAMUS

a, Vue générale des noyaux intralaminaires du thalamus. Les péricaryons CCK-I occupent les noyaux paraventriculaire (PV), interantéromédiodorsal (IMD), central (c), paracentral PC) et centrolatéral (CL, à plus fort grossissement en b).

Abréviations trouvées dans cette planche uniquement : Hl, m, noyau latéral et médian de l'habénula ; LP, noyau latéropostérieur ; pc, plexus choroïdes ; PO, groupe thalamique ventropostérieur ; 3, troisième ventricule.

Barre en a = 100 μ m
en b = 50 μ m

Réaction au chloronaphtol

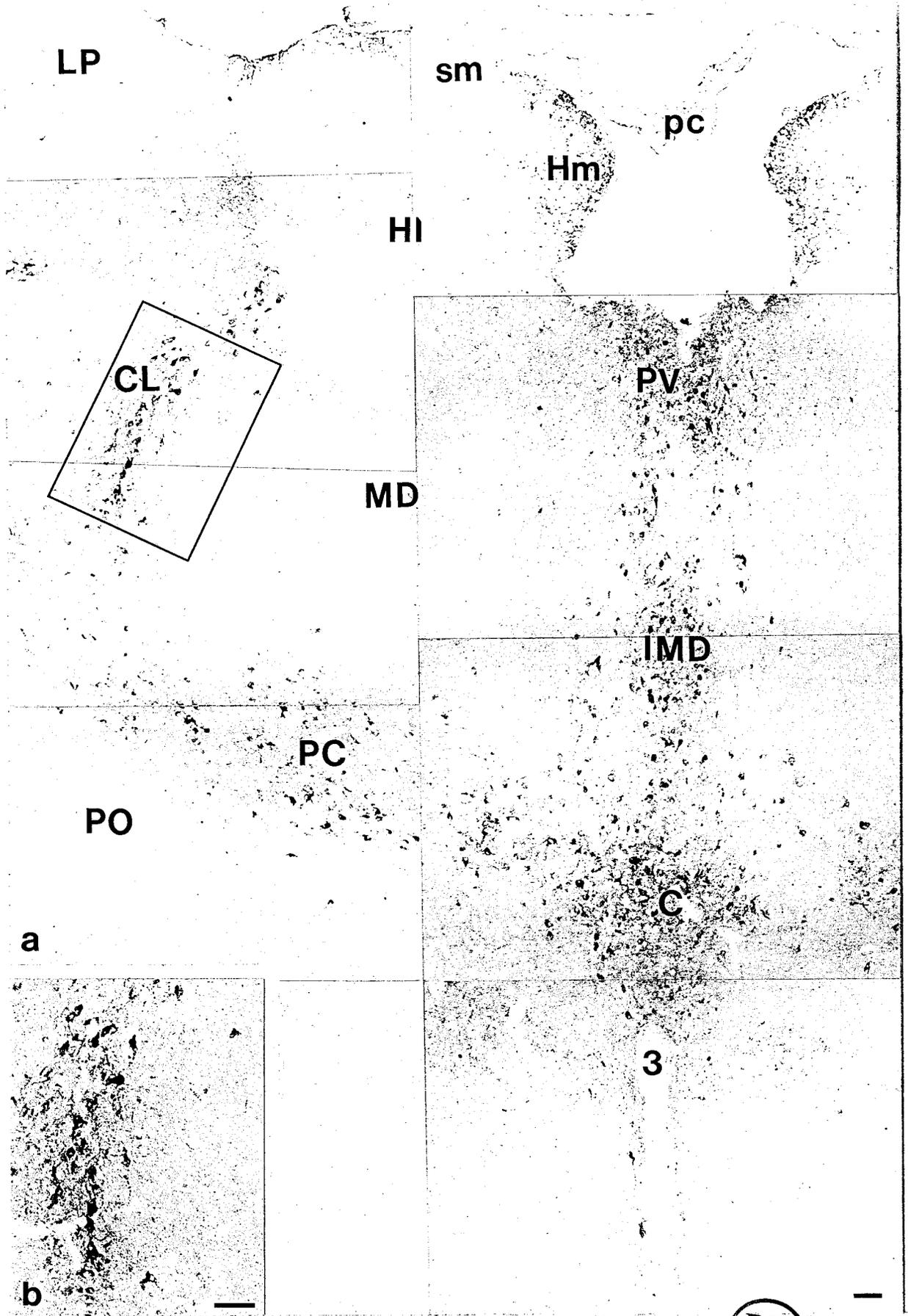


Planche X : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CCK ET ANTI-CRF DANS L'EMINENCE
MEDIANE SUR COUPES ADJACENTES

a et b, coupes sagittales adjacentes dans l'émence médiane d'un *Cobaea* mâle non colchicinisé, traitées par l'IS 15/8 (CCK, a) et par un IS anti-corticolibérine (CRF, b).

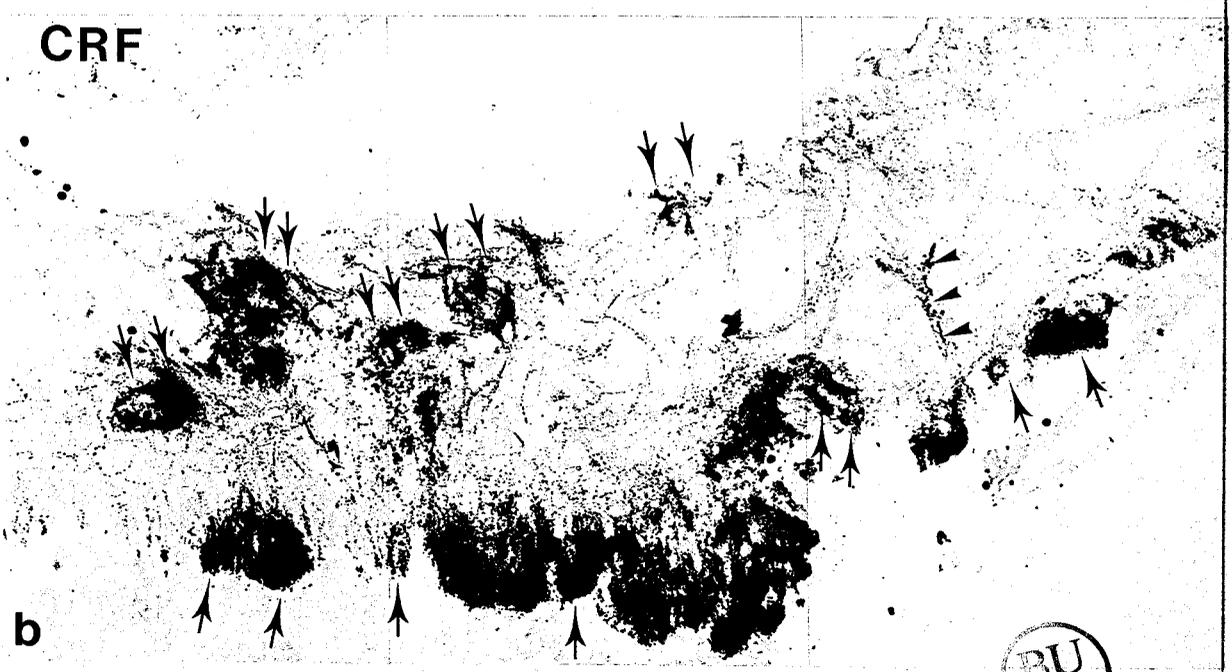
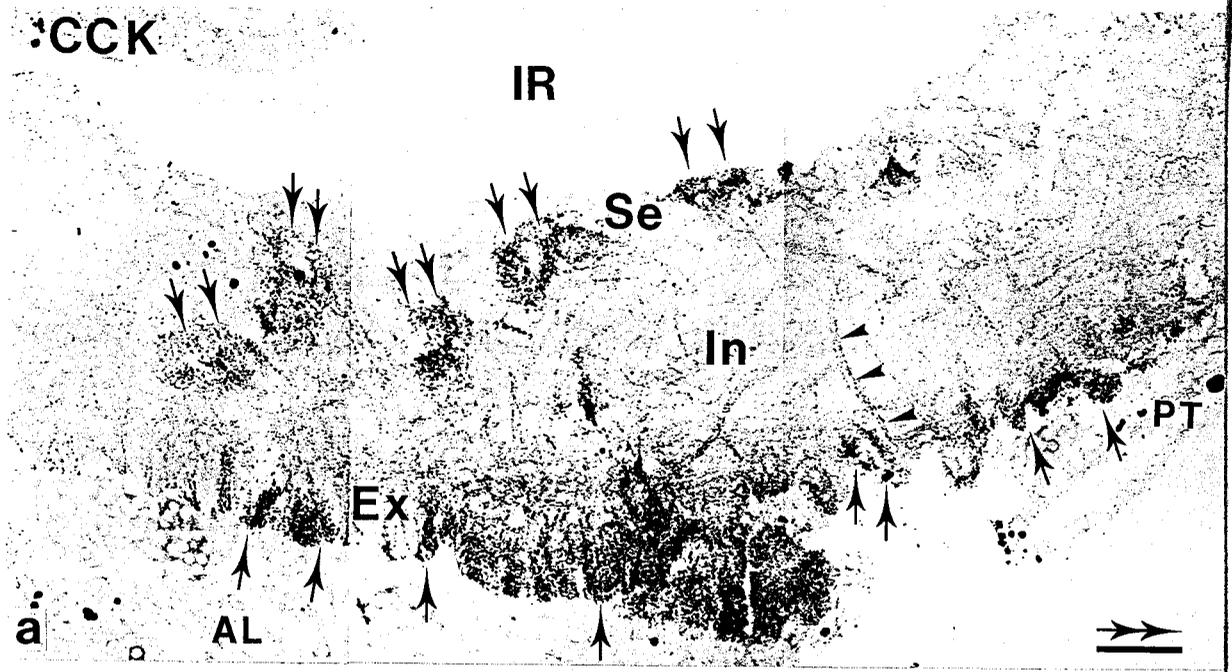
La comparaison des marquages révèle que les innervations périportales détectées présentent des distributions analogues (flèches) dans la zone externe (Ex), autour des tanocytes dans la zone interne (In, pointes de flèches), et autour ^{de} des anses intrainfundibulaires longues dans la zone ~~sub~~subépendymaire (Se).

Noter la disparition simultanée des deux innervations caudalement.

 , direction rostrale

Barre = 100 μ m

Réactions au chloranaphtol



BU
LILLE

Planche XI : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CCK et ANTI-CRF SUR LES MEMES COUPES
DANS LE NOYAU PARAVENTRICULAIRE ET L'EMINENCE MEDIANE.

a1 et a2, montrent la même coupe sagittale dans l'éminence médiane d'un Cobaye ~~même~~ non colchicinisé, qui ^{après} a subi une réaction anti-CCK (a1) puis, a été décolorée ~~et~~ éluee et traitée par un IS anti-corticolibérine (CRF, a2). La comparaison des marquages successifs fait apparaître que, bien que les superpositions strictes soient difficilement observables partout dans la zone externe, certaines terminaisons nerveuses péricapillaires présentent simultanément l'IR-CCK et l'IR-CRF. (flèches).

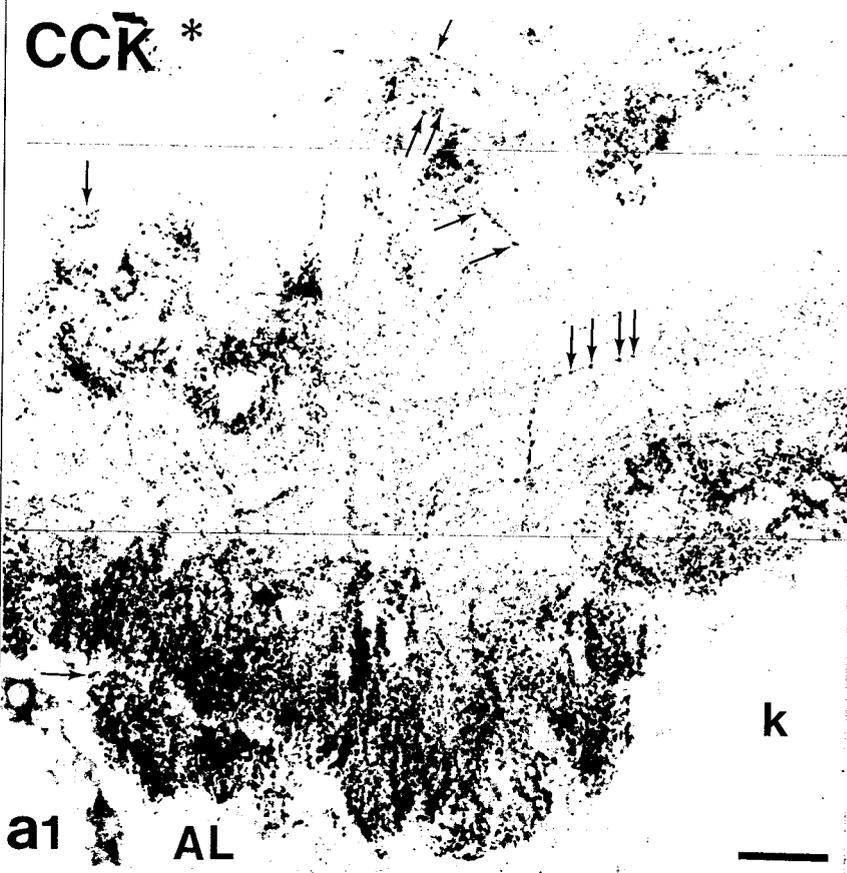
*, recessus infundibulaire du troisième ventricule.

b1 et b2, ^{Comparaison} expérimentations similaires sur une coupe frontale dans le noyau paraventriculaire d'un Cobaye mâle colchicinisé. Les péricaryons CCK-I sont peu abondants et faiblement marqués (b1). Après décoloration et élution de la coupe, et marquage anti-corticolibérine (CRF, b2), certains péricaryons initialement CCK-I sont aussi CRF-I (doubles flèches en b1 et b2), alors que d'autres ne présentent que l'une des deux immunoréactivités (flèches simples en b1 et b2). Les petites flèches soulignent l'épendyme. *, le même vaisseau sanguin.

Barre en a1 = 50 μ m
en b1 = 100 μ m

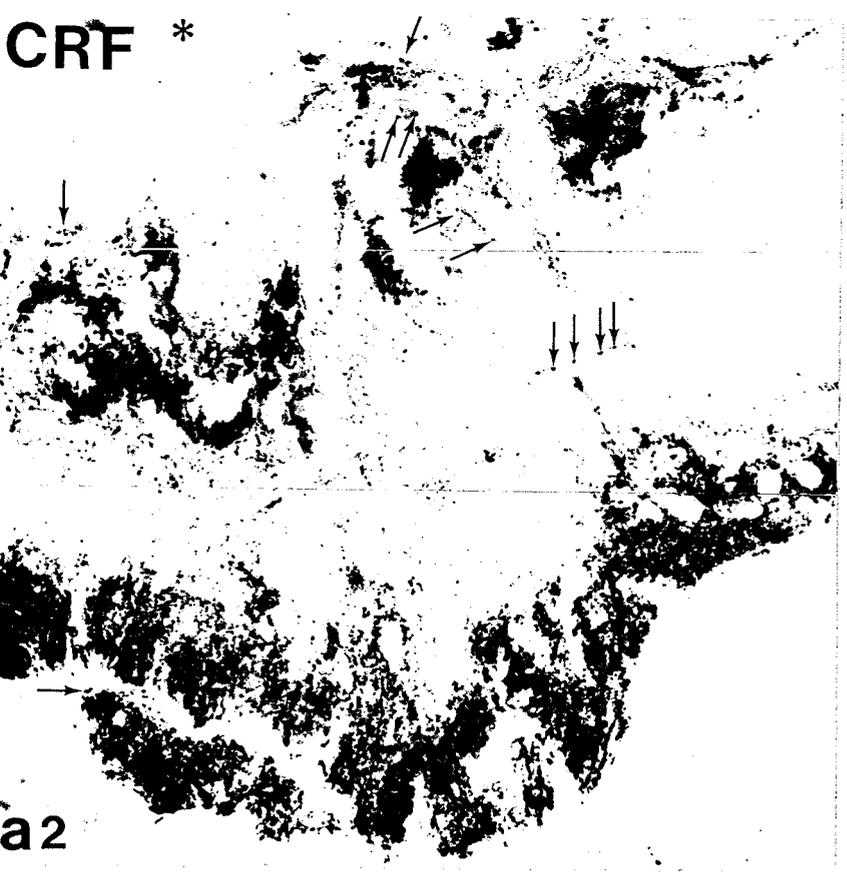
Réactions au chloronaphtol

CC \bar{K} *



a1 AL

CRF *



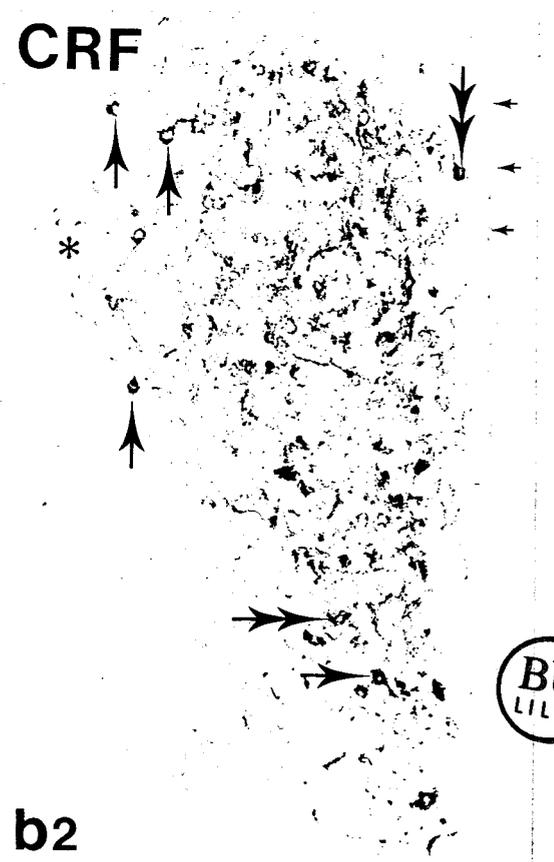
a2

CCK



b1

CRF



b2

**BU
LILLE**

Planche XII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-NPY, ANTI-CCK, ANTI-hGHRF et ANTI-ACTH DANS LE NOYAU ARQUE (NA) RETROCHIASMATIQUE DU COBAYE.

a1, b1 et c1 : Coupes adjacentes traitées par des IS dirigés contre le peptide indiqué en haut et à gauche de chaque figure.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une réaction détectant un peptide différent (indiqué en haut et à gauche de chaque figure).

La comparaison des coupes a1, b1 et c1 montre que les péricaryons NPY-I, CCK-I et hGHRF-I ont une distribution ventrale similaire.

La comparaison des marquages successifs montre que :

- les péricaryons NPY-I sont différents des neurones ACTH-I, à localisation plus dorsale.

- les péricaryons CCK-I (b1 et b2) et hGHRF-I (c1 et c2) contiennent tous l'IR-NPY (doubles flèches). Aucun péricaryon ne présente l'IR-NPY seule.

Barre en a1 = 200 μ m. Toutes les figures sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

NPY

NA

a1

ACTH

a2



CCK

NPY

b1

b2

hGHRF

NPY

c1

c2

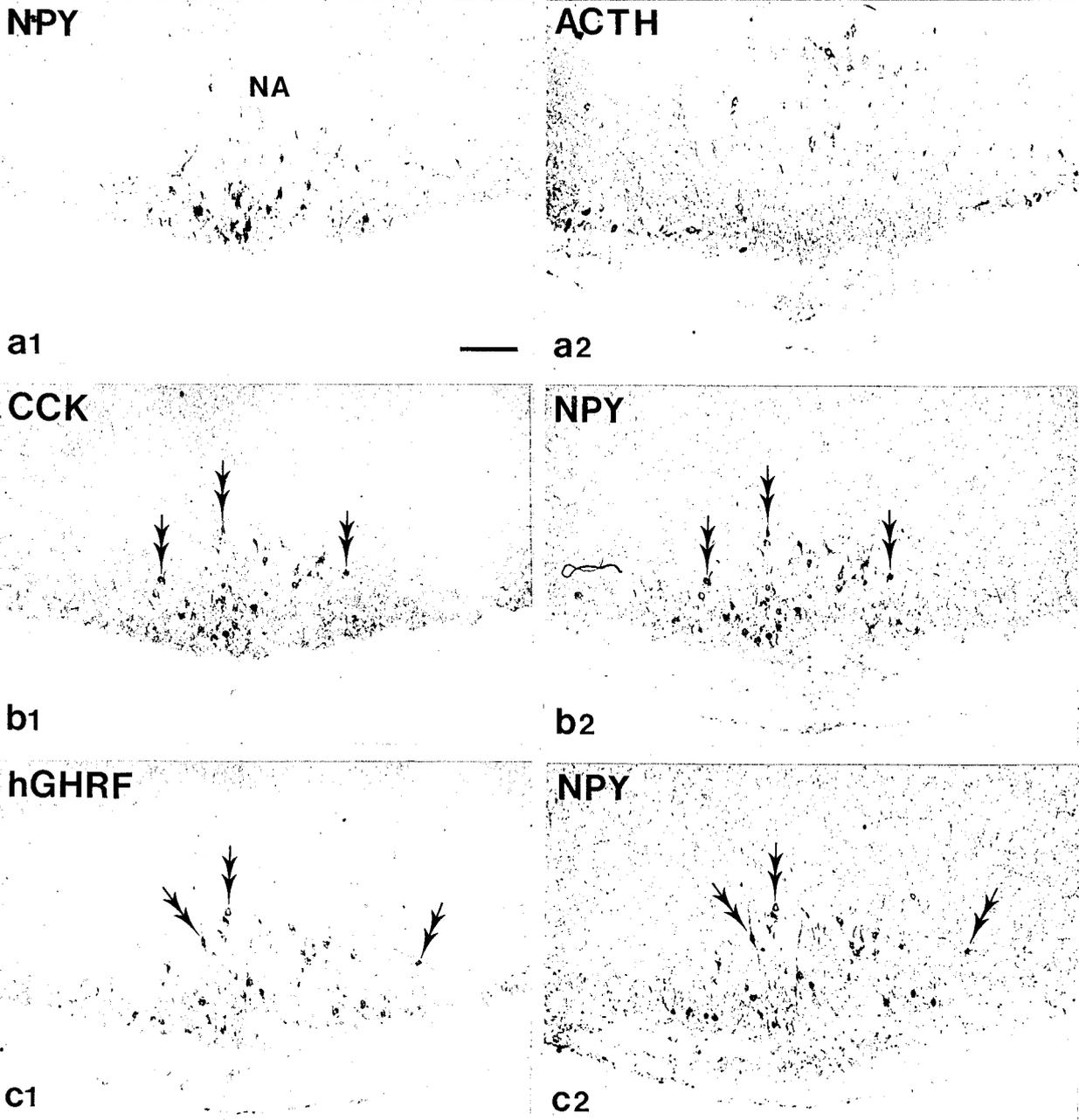


Planche XIII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CCK, ANTI-hGHRF et ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NA) INFUNDIBULAIRE ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU COBAYE.

a1 et b1 : Coupes adjacentes traitées par un IS anti-CCK (a1) ou anti-hGHRF (b1).

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps ont été traitées par un IS anti-NPY.

La comparaison des coupes a1 et b1 révèle que :

- les péricaryons CCK-I (a1) sont distribués dans les parties médianes et périventriculaires du NA et ~~en~~^à sa périphérie, mais ils sont absents de ses régions ventrolatérales (VL) et dorsales (D). Ils occupent aussi la lèvre dorsale de l'EM (petites flèches).

- les péricaryons hGHRF-I (b1) ont une distribution similaires, et sont de plus présents dans le NA ventrolatéral et dorsal.

- dans la zone externe de l'EM, l'innervation périportale CCK-I (pointes de flèches) en a1) occupe les plages dorsales et médioventrales qui ne contiennent pas en b1 (pointes de flèches) d'innervation périportales hGHRF-I. Les deux plexus nerveux sont différents.

La comparaison des coupes a1 et a2, et b1 et b2 révèle que :

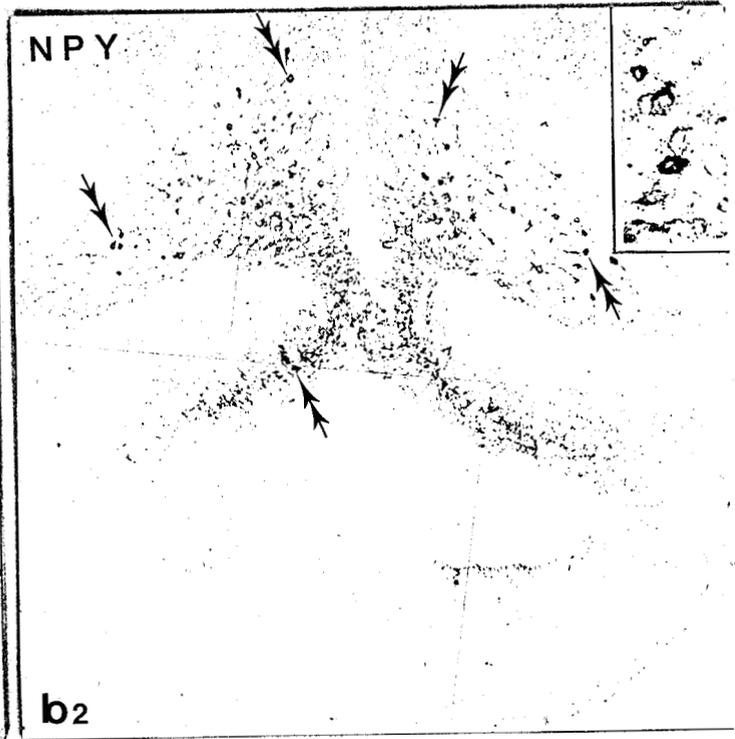
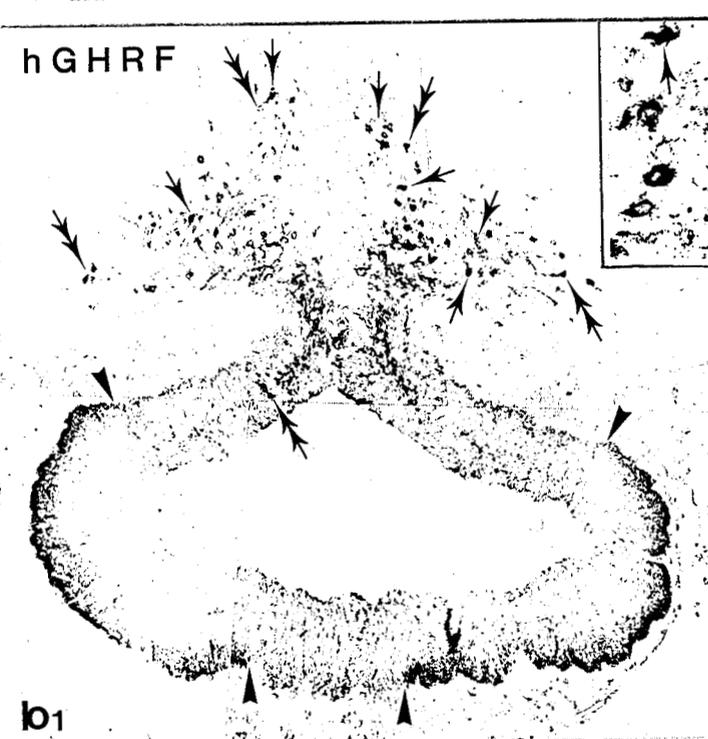
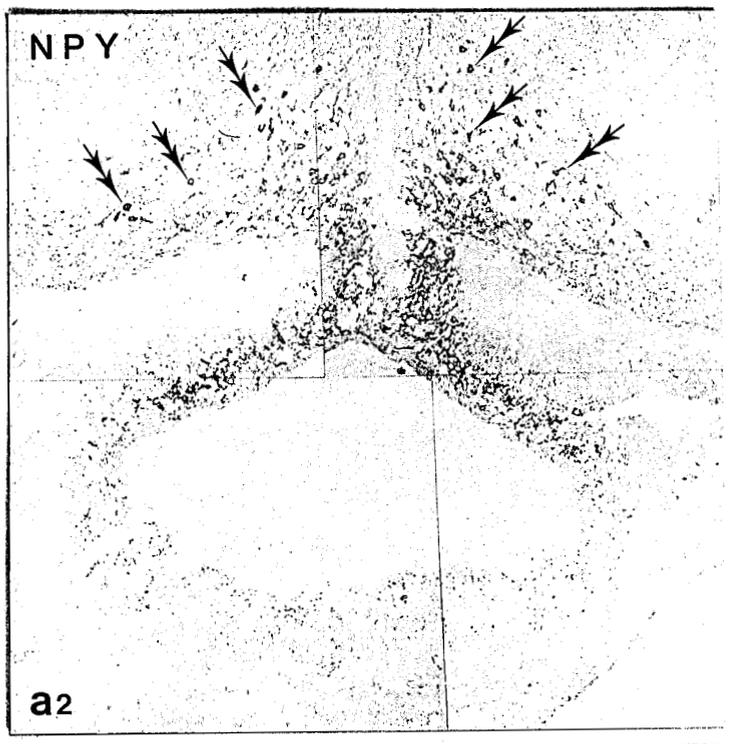
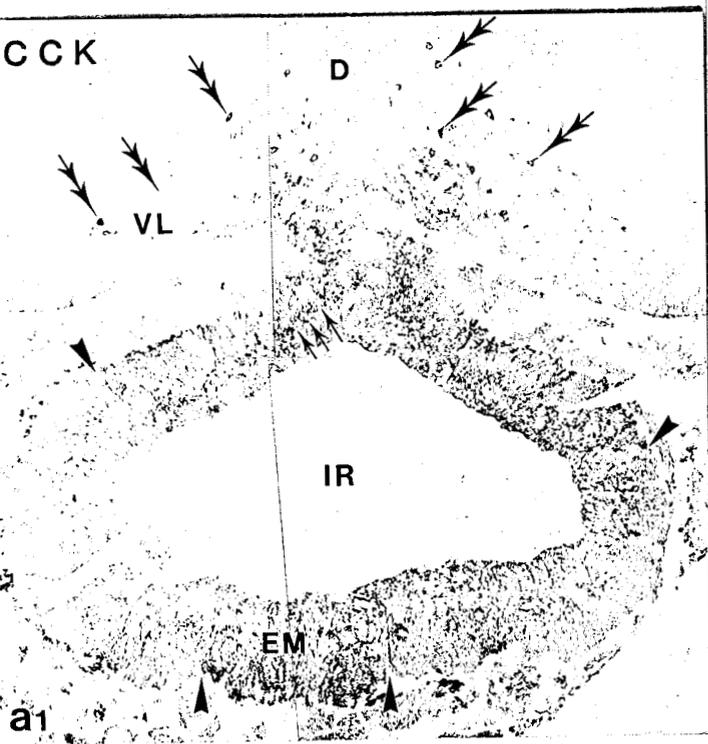
- tous les péricaryons CCK-I sont aussi NPY (doubles flèches en a1 et a2) et réciproquement.

- la majorité des péricaryons hGHRF-I sont aussi NPY-I (doubles flèches en b1 et b2) ; une minorité, à localisation ventrolatérale et dorsale dans le NA ne présentent que l'IR-hGHRF (flèches simples en b1) et dans l'encart).

- l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe de l'EM (a2 et b2).

Barre en a1 = 200 um. Toutes les figures sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.



BU
LILLE

Planche XIV : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-NPY, ANTI-CCK, ANTI-hGHRF ET ANTI-ACTH DANS LE NOYAU ARQUE (NA) RETRO-INFUNDIBULAIRE DU COBAYE.

a1, b1 et c1 : Coupes adjacentes traitées par des IS dirigés contre le peptide indiqué en haut à gauche de chaque figure.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une seconde réaction détectant un peptide différent (indiqué en haut à gauche de chaque figure).

La comparaison des coupes a1, b1 et c1 révèle que :

- les péricaryons NPY-I, CCK-I et hGHRF-I ont une distribution analogue dans le NA. Les péricaryons hGHRF-I sont toutefois plus abondants dorsalement (c1).

La comparaison des coupes a1 et a2, b1 et b2, et c1 et c2 révèle que :

- les péricaryons NPY-I sont différents des neurones ACTH-I à localisation plus dorsale et latérale (a1 et a2).

- tous les péricaryons CCK-I sont aussi NPY-I, et réciproquement (doubles flèches en b1 et b2).

- la majorité des péricaryons hGHRF-I sont aussi NPY-I (doubles flèches en c1 et c2), alors que quelques uns d'entre eux, en position dorsale ou périphérique dans le NA ne présentent que l'IR-hGHRF (flèches simples en c1).

Barre en a1 = 200 μ m. Toutes les figures sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

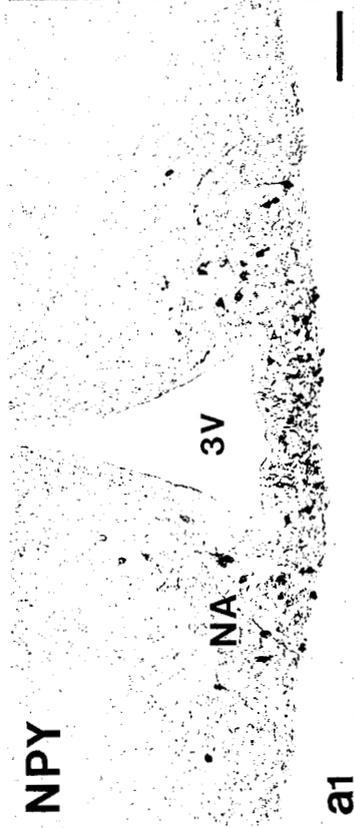


Planche XV : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CTPG et ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NA) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU COBAYE.

a1 et a2 : La même coupe traitée par un IS anti-CTPG (a1) puis, après décoloration et élution des anticorps, traitée par un IS anti-NPY (a2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- les péricaryons CTPG-I sont localisés dans les régions ventrolatérales (AV) et dorsales (AD) du NA (pointes de flèches en a1) qui ne contiennent pas ou peu de neurones NPY-I (pointes de flèche en a2), ceux-ci occupant le NA médian (AM) et périventriculaire (AP).

- l'IR-CTPG est présente dans une innervation périportale dense dans la zone externe (Ex) de l'EM (a1), alors que l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe (a2).

Autres ~~abréviations non indiquées~~ : In, zone interne de l'EM ; RI, recessus infundibulaire du troisième ventricule (*) ; VM, noyau ventromédian.

Barre en a1 = 200 μ m

Réactions au chloronaphtol.

CTPG

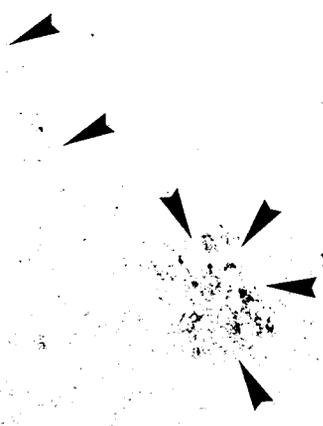
VM

AD

*

AV

AM



AP

RI

In

Ex

a1



NPY

*



a2

Planche XVI : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CTPG et ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NA) DU COBAYE.

a1 et b1 : Coupes dans le NA infundibulaire (b1) et rétroinfundibulaire (a1) traitées par un IS anti-CTPG.

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont été traitées par un IS anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que les péricaryons CTPG-I ne contiennent pas l'IR-NPY. Dans le NA infundibulaire (b1), les péricaryons CTPG-I constituent une population compacte et ^{de} ~~d'~~ aspect circulaire qui est localisée dans sa partie ventrolatérale qui présente une abondante innervation CTPG-I (pointes de flèches en b1 et b2).
NPY

Autres ~~Ab~~réviations ~~non indexées~~ : RI, recessus infundibulaire du troisième ventricule ; *, fissure infundibulaire.

Barre en a1 = 100 μm
en b1 = 50 μm

Réactions au chloronaphtol.

CTPG

RI

a1

NPY

a2

CTPG

NPY

b1

b2

*

*

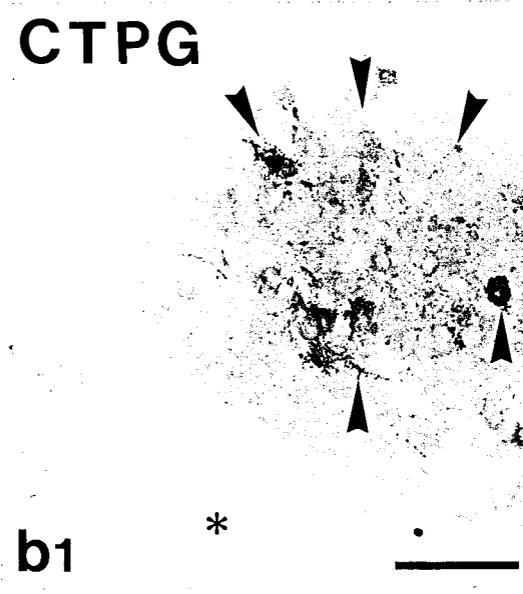
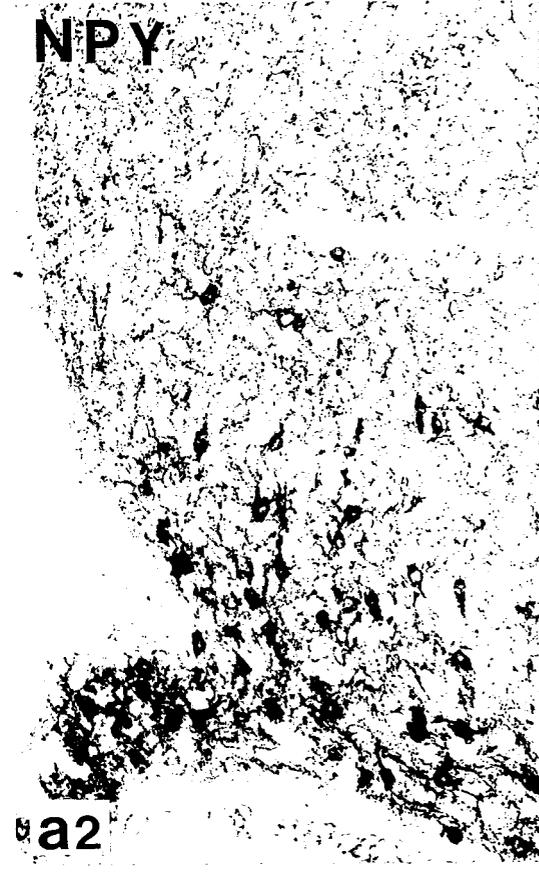
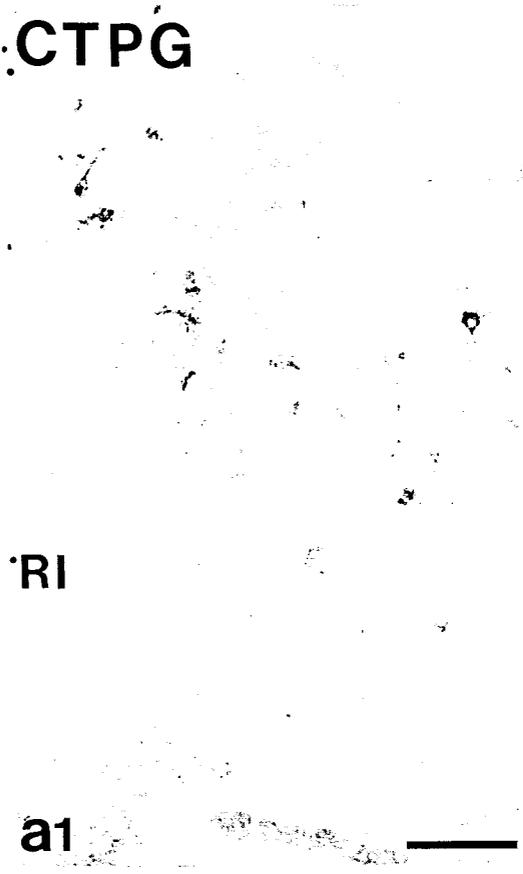


Planche XVII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-NPY ET ANTI-SOMATOSTATINE DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU COBAYE.

a1 et b1 : Coupes dans le NARC antérieur (a1) et infundibulaire (b1), traitées par un IS anti-NPY.

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps ont été traitées par un IS anti-somatostatine (SOM).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- quelques péricaryons localisés en périphérie du NARC et dans sa région ^{SOM}subependymaire (flèche étoilée en a1) contiennent les deux IR (doubles flèches en a1 et a2, flèche courbe en b1 et b2). De nombreux autres péricaryons ne contiennent que l'un ou l'autre IR (flèches simples).

- dans l'EM, l'IR-NPY intéresse essentiellement la zone interne (In) qui contient des péricaryons marqués (petites flèches en b1) alors qu'elle est virtuellement absente de la zone externe (Ex, pointes de flèches en a1 et b1) qui contient une innervation périportale SOM-I dense (pointe de flèches en a2 et b2). Noter l'absence d'innervation NPY-I des anses intrainfundibulaires longues dans la lèvre dorsale de l'EM (petites doubles flèches en b1 et b2).

Autre ~~abréviation non indexée~~ : RI, recessus infundibulaire du troisième ventricule.

Barre en a1 = 100 μ m. a1 et b1 sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

NPY

VM

NARC

3v

In

Ex

a1



SOM

3v

a2

NPY

NARC

3v

SOM

3v

b2

In

RI

Ex

b1

RI

b2

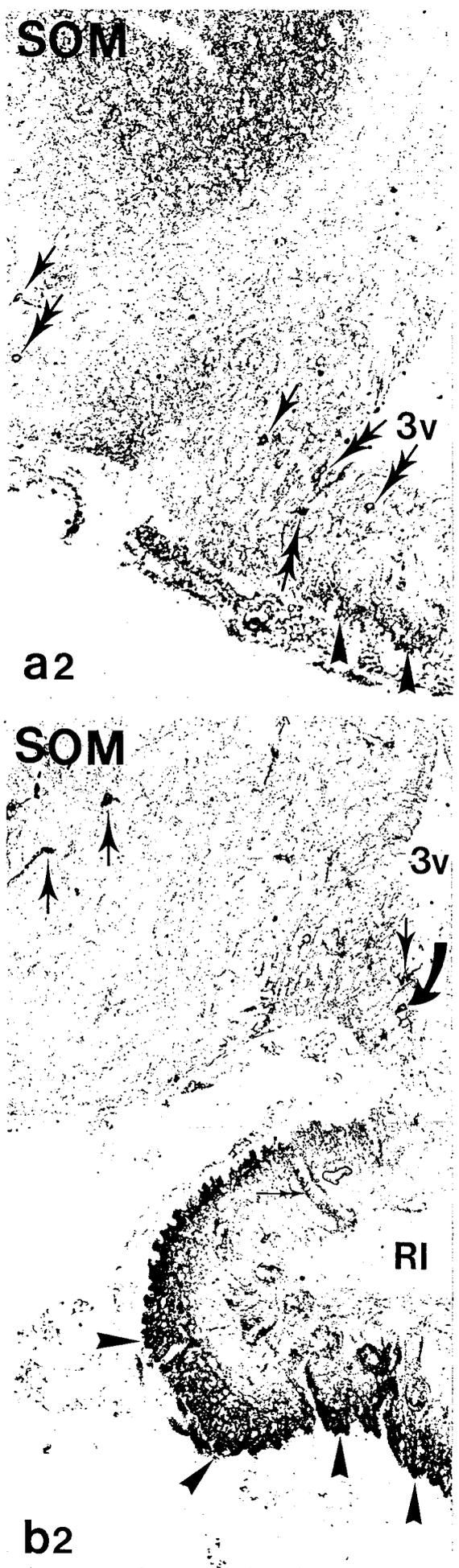
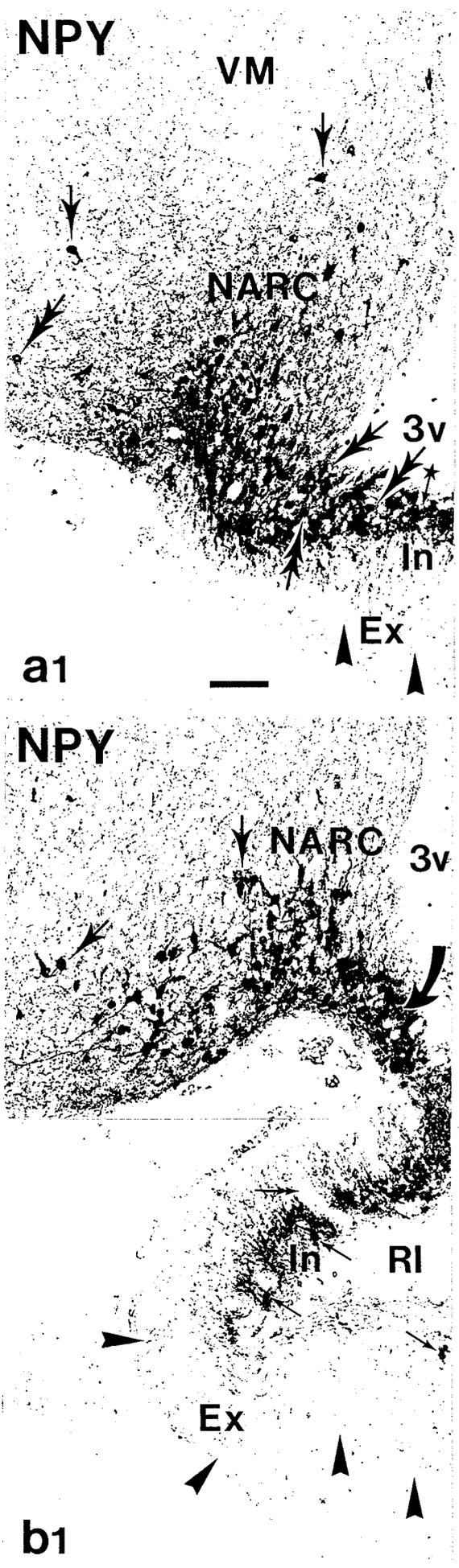


Planche XVIII : MARQUAGE ANTI-NPY DU NOYAU ARQUE (NARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU CHAT.

L'IR-NPY est détectée dans de nombreux péricaryons en position médiane et périventriculaire dans le NARC.

Noter l'absence virtuelle d'IR-NPY dans la zone externe (Ex) de l'EM. Seule la zone ^{sub}ependymaire contient quelques fibres variqueuses NPY-I.

Autre abréviation non indexée : RI, recessus infundibulaire du troisième ventricule.

Barre = 200 μ m

Réaction au chloronaphtol.

NPY

VM

NARC

RI

Ex



Planche XIX : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CCK et ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE
(EM) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU CHAT.
NARC

a1, b1 et c1 : Coupes dans le NARC dorsal (a1), infundibulaire (b1) et rétroinfundibulaire (c1) traitées par un IS anti-CCK.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps ont été traitées par un IS anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que la majorité des péricaryons CCK-I contiennent aussi l'IR-NPY (doubles flèches), alors que quelques neurones (simples flèches en a1 et a2) ne présentent que l'une des deux IR.

L'innervation périportale CCK-I dans l'EM (pointes de flèches en a1 et b2) ne contient pas l'IR-NPY qui est absente de cette région. Des fibres variqueuses CCK-I localisées à proximité de l'EM dans le NARC ne présentent que l'IR-CCK (flèche simple en b1). Noter que le lobe intermédiaire de l'hypophyse (LI en c1) n'a pas réagi à l'IS anti-NPY après élution (c2).

Barre en a1 = 50 μ m. Toutes les figures sont à mêmes échelle.

Réactions au chloronaphtol.

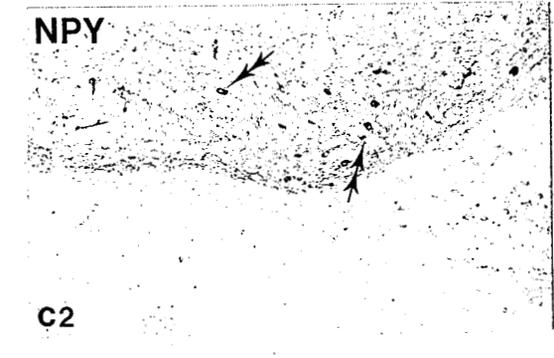
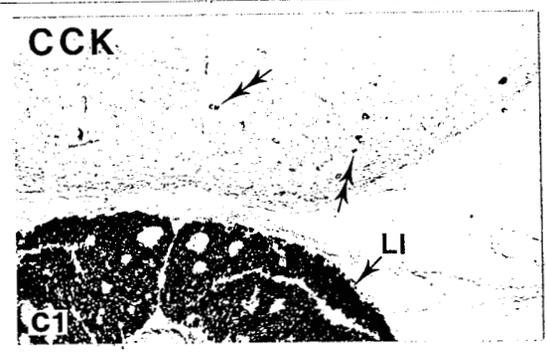
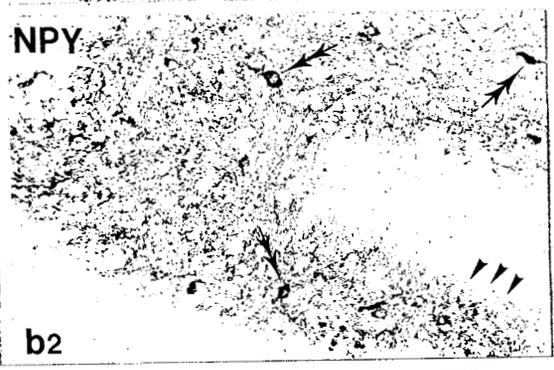
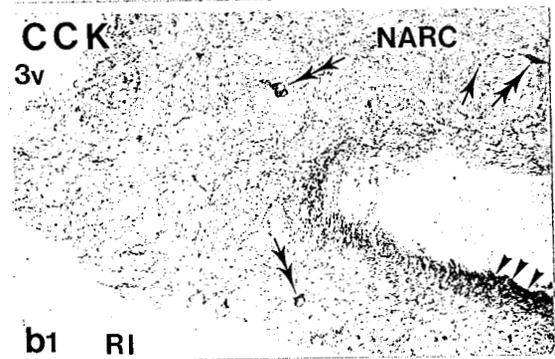
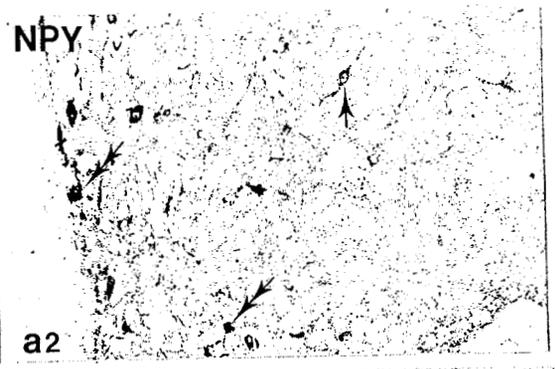


Planche XX : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU CHAT.

a1, b1 et c1 : Coupes dans le NARC infundibulaire (a1), rétroinfundibulaire (b1) et prémammillaire (c1) traitées par un IS anti-hGHRF.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps ont été traitées par un IS anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que la majorité des péricaryons hGHRF-I présentent aussi l'IR-NPY (doubles flèches). Certains neurones, cependant, ne présentent que l'IR-hGHRF (simples flèches en b1 et c1). Des fibres variqueuses doublement marquées sont aussi observées dans l'EM (doubles pointes de flèches en a1 et a2) en dehors de la zone externe (Ex) qui ne contient virtuellement pas d'IR-NPY (a2).

Antes Abréviations non-indexées : PM, récessus prémammillaire du troisième ventricule ; RI, récessus infundibulaire du troisième ventricule.

Barre en a1 = 50 μ m. Toutes les figures sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

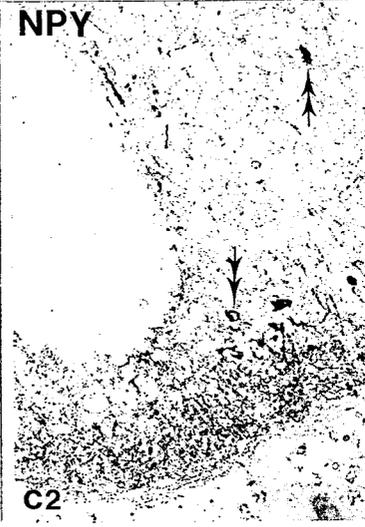
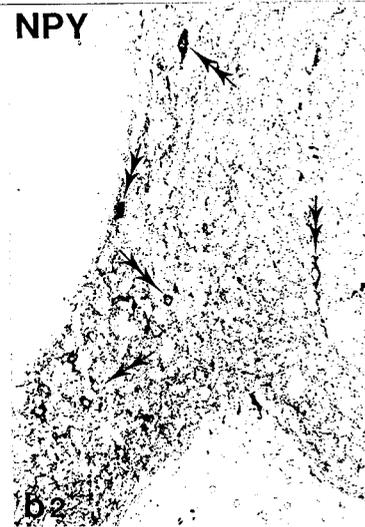
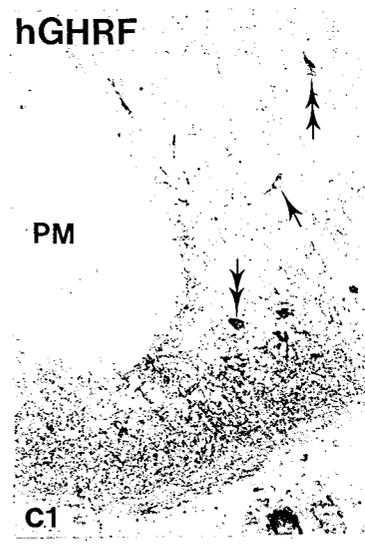
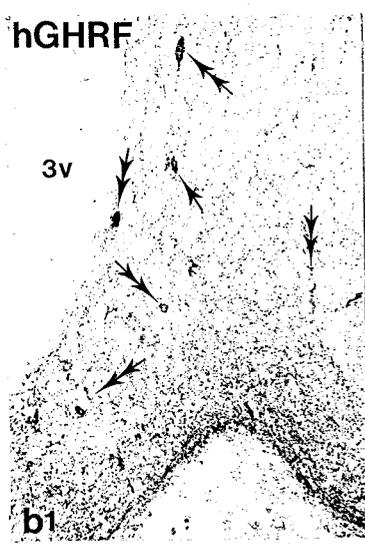
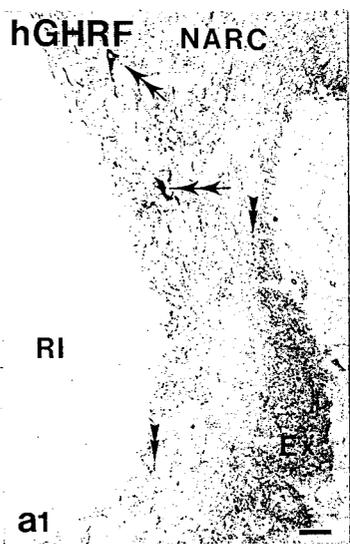


Planche XXI : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CCK ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) DU RAT.

a : Coupe dans le NARC traitée par l'IS, 15/8. La région encadrée est présentée à plus fort grossissement en a'.

b1 et b2 : Même détail de la Fig.a représenté avant (b1) et après décoloration, élution, et marquage anti-NPY (b2).

La comparaison des marquages successifs révèle que tous les péricaryons marqués (faiblement) par l'IS 15/8 sont aussi marqués par l'IS anti-NPY (doubles flèches en b1 et b2). La flèche simple en b1 indique une bulle d'air dans un fragment de tissu épendymaire dans le troisième ventricule (3V).

Barre en a et b1 = 20 μ m.

Réactions au chloronaphtol.

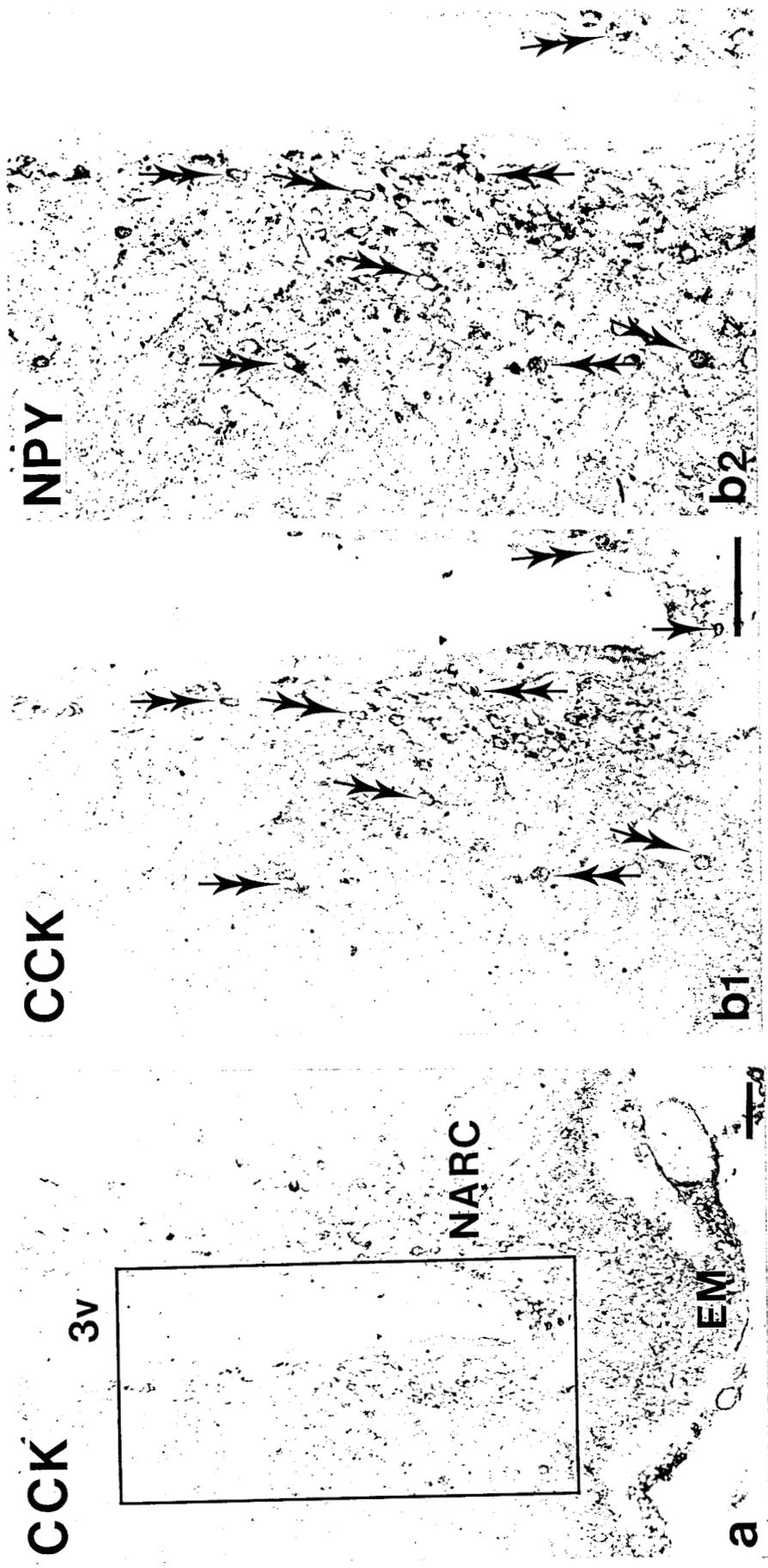


Planche XXII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU RAT.

a1, b1 et c1 : Coupes dans le NARC rétrochiasmatique (a1), pré~~mammillaire~~^{mammillaire} (c1) et dans l'EM (b1) traitées par l'IS-81.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une réaction anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- dans le NARC rétrochiasmatique et pré~~mammillaire~~^{mammillaire}, tous les péricaryons et la majorité des fibres variqueuses hGHRF-I sont aussi NPY-I (doubles flèches en a1 et a2, b1 et b2, et c1 et c2).

- dans l'EM, l'innervation périportale hGHRF-I dans la zone externe (Ex) n'a pas réagi à l'IS anti-NPY (b1 et b2). L'IR-NPY n'est présente que dans quelques fibres variqueuses dans la zone ^{sub}ependymaire (SE en b1) et dans des corps cellulaires qui contiennent aussi l'IR-hGHRF (doubles flèches).

Autres ~~Ab~~réviations non-indexées : In, zone interne de l'EM ; RM, récessus infundibulaire du troisième ventricule ; RI, récessus infundibulaire du troisième ventricule.

Barre en a1 et b1 = 50 μ m.

en c1 = 100 μ m.

Réactions au chloronaphtol.

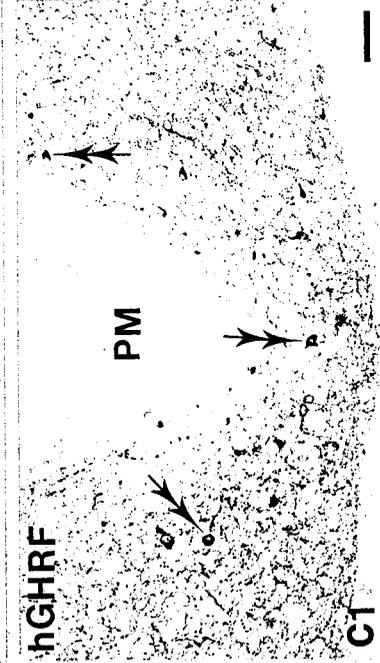
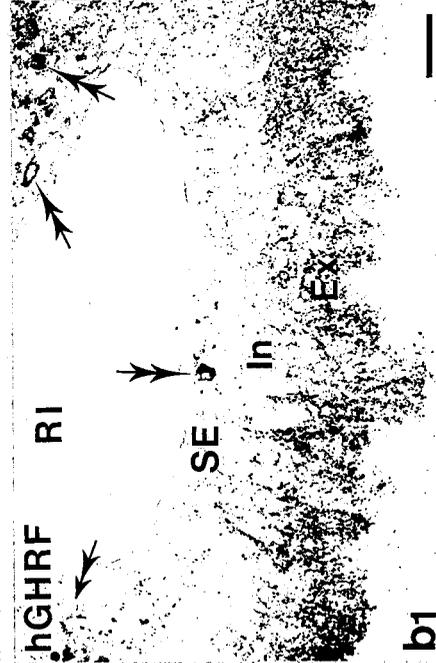


Planche XXIII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NA) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU RAT.

a1 et b1 : Deux coupes dans le NA infundibulaire (a1) et rétroinfundibulaire (b1) traitées par l'IS 81.

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une seconde réaction anti-NPY.

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- la majorité des péricaryons hGHRF-I sont aussi NPY-I (doubles flèches en a1 et a2, b1 et b2). Ces neurones doublement marqués sont essentiellement localisés dans les parties médianes du NARC.

- quelques péricaryons hGHRF-I ne présentent pas l'IR-NPY (simples flèches en a1 et b1). Ils sont localisés dans les parties ventrolatérales du NARC où une innervation NPY-I dense est observée (pointes de flèches en a2).

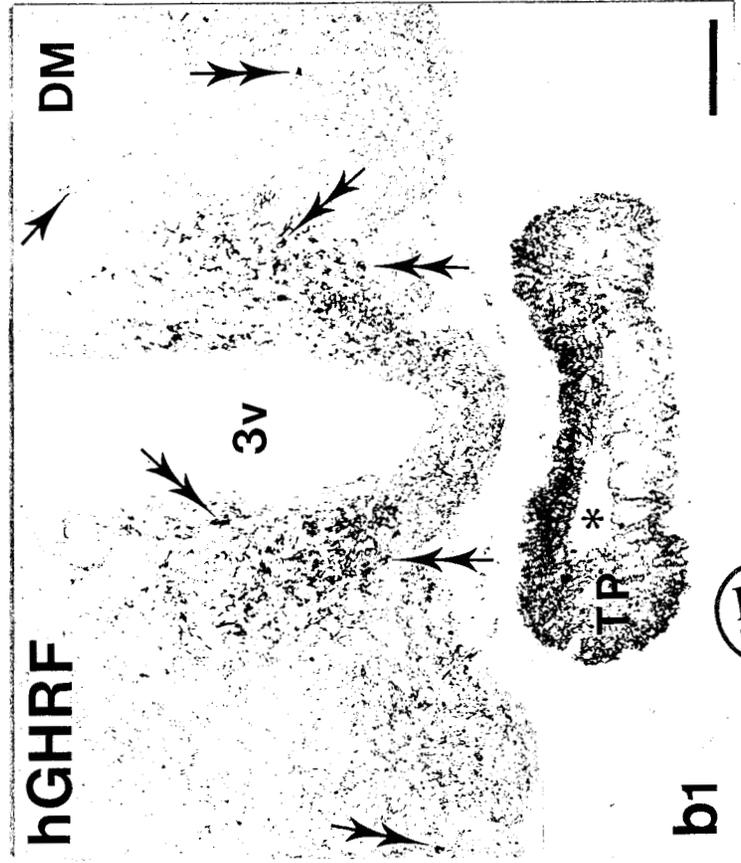
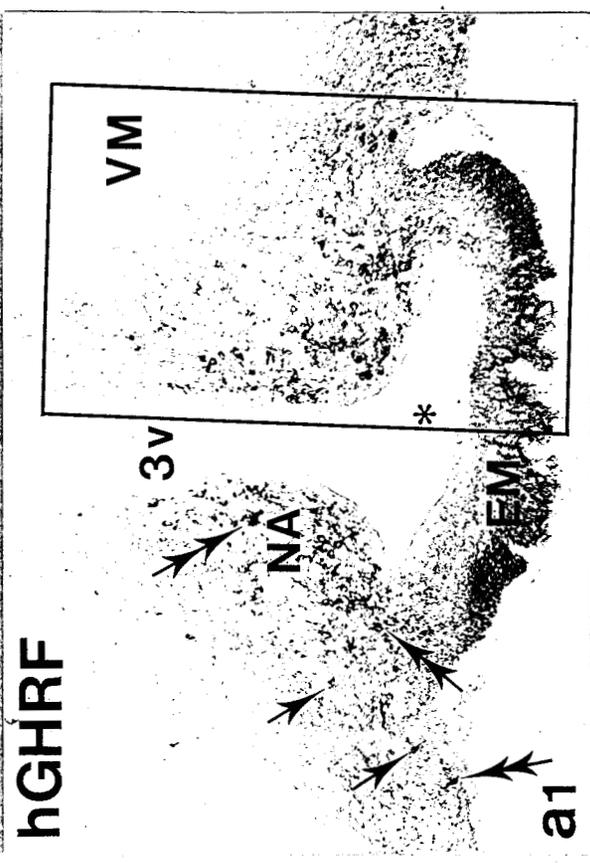
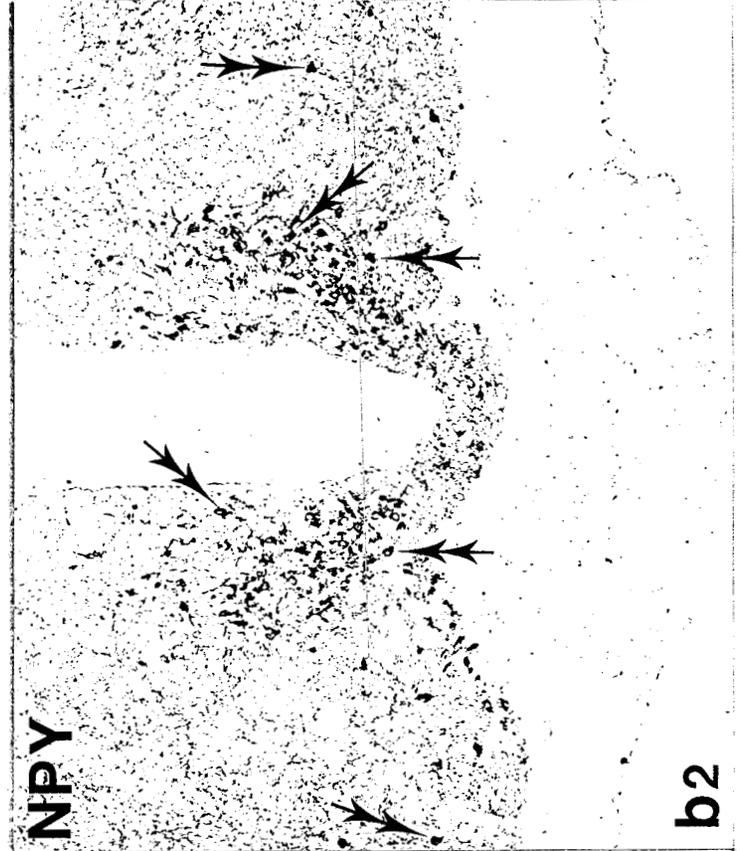
- dans l'EM, l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe et n'intéresse que quelques fibres variqueuses en position ^{sub}subépendymaire (petites flèches en a2).

Autre, Abréviations non-indexées : TP, tige pituitaire ; *, récessus infundibulaire du troisième ventricule.

La région encadrée en a1 est reprise à plus fort grossissement dans la planche XXIV.

Barre en b1 = 200 μ m. Toutes les figures sont à même échelle.

Réactions au chloronaphtol.



BU
LILLE

Planche XXIV : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (ARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (ME) DU RAT.

La planche montre la même coupe, présentée en vue générale sur la planche XXIII (Fig.a1), qui a subi, une première réaction anti-hGHRF (a1) puis, après décoloration et élution des anticorps, une seconde réaction anti-NPY (a2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- tous les péricaryons hGHRF-I en position médiane dans l'ARC sont aussi NPY-I (grandes doubles flèches en a1 et a2).

- des péricaryons hGHRF-I en position ventrolatérale dans l'ARC ne présentent pas l'IR-NPY (simples flèches en a1).

- une grande partie de l'innervation hGHRF-I de l'ARC présente aussi l'IR-NPY (petites doubles flèches en a1 et a2).

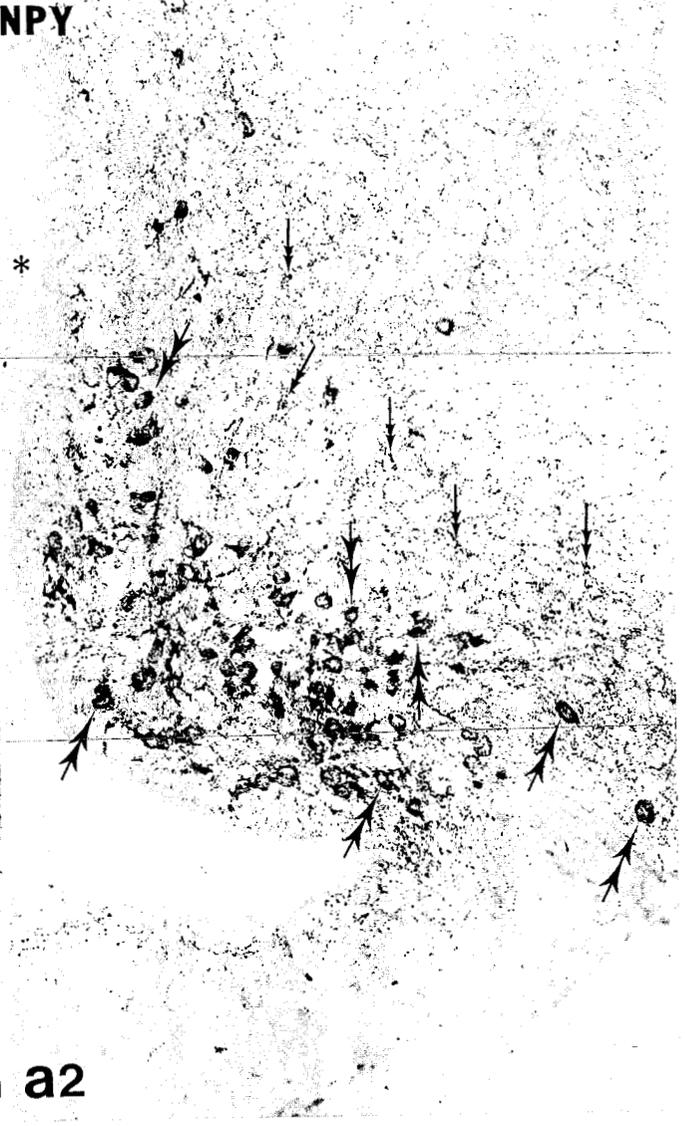
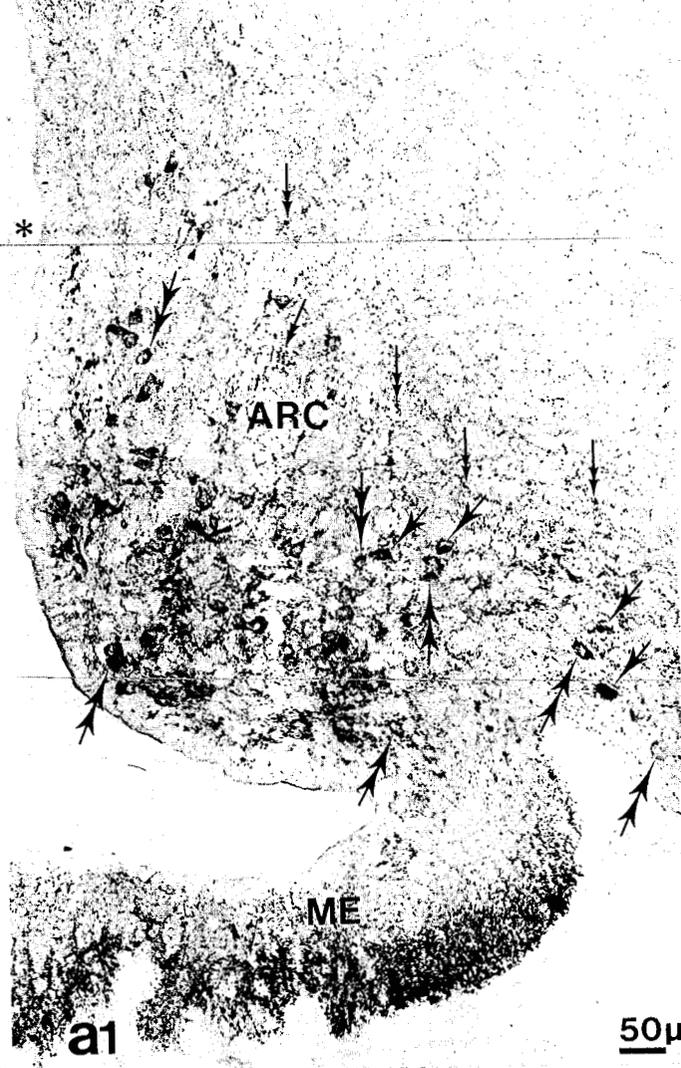
- dans l'éminence médiane (ME), l'IR-NPY est virtuellement absente de la zone externe, alors que cette région reçoit une abondante innervation périportale hGHRF-I.

Barre en a1 = 50 μ m.

Réactions au chloronaphtol.

hGHRF

NPY



50μ

A

B



Planche XXV : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF et ANTI-SOMATOSTATINE DANS LE NOYAU ARQUE (NA) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU RAT.

a1, b1, et c1 : Coupes dans le NA antérieur (a1), infundibulaire (b1) et préammillaire (c1), traitées par l'IS 81.

a2, b2 et c2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une seconde réaction anti-somatostatine (SOM-I).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- les péricaryons hGHRF-I sont localisés en position médiane (AM) et ventrale (AV) dans le NA, alors que les péricaryons SOM-I, qui n'occupent que le NA infundibulaire et caudal, sont distribués dans les parties dorsales du NA (AD). Les deux populations neuroniques se recouvrent très partiellement dans le NARC dorsal et caudal où quelques rares neurones doublement marqués s'observent (voir la région encadrée en b1 sur la planche XXVI, et la double flèche en c1 et c2).

- l'innervation SOM-I dans le NA souligne les aires de distribution des péricaryons hGHRF-I.

- dans l'éminence médiane, les innervations périportales hGHRF-I et SOM-I présentent une distribution similaire (voir Planche XXVI Fig. b1 et b2) dans la zone externe (Ex).

*, récessus infundibulaire (en b1) et préammillaire (en c1) du troisième ventricule (3V en a1).

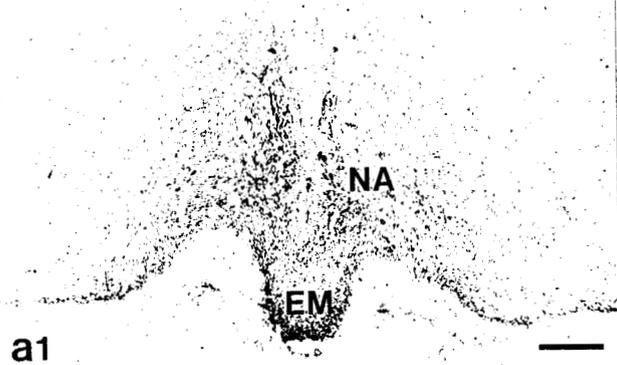
Barre en a1 = 200 μ m. Toutes les figures sont à la même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

hGHRF

3v

AHA



a1

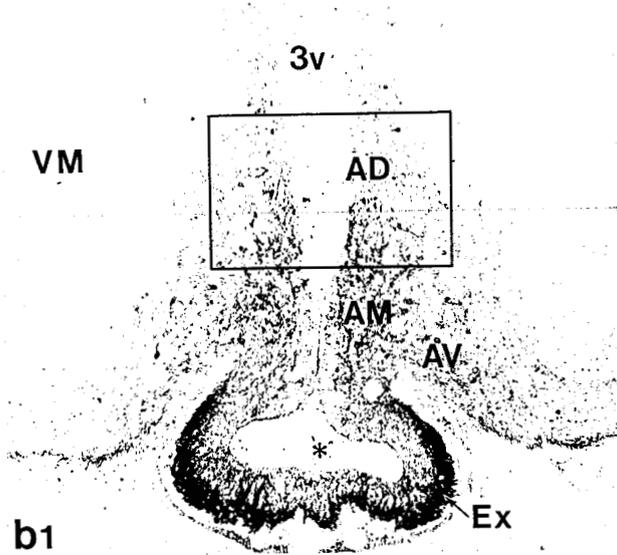
SOM



a2

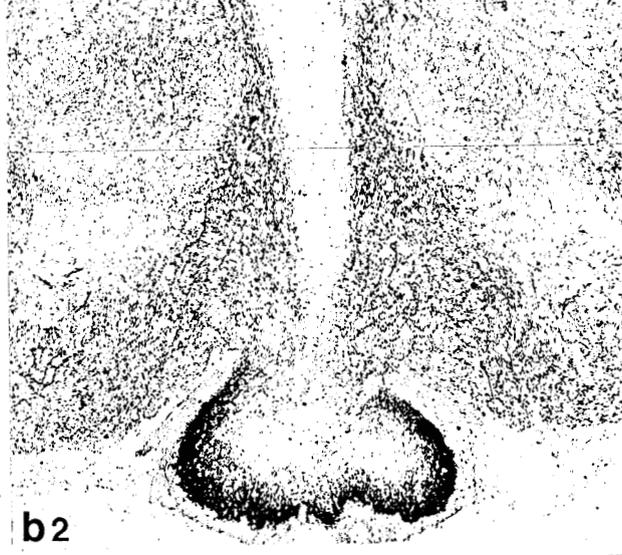
hGHRF

DM



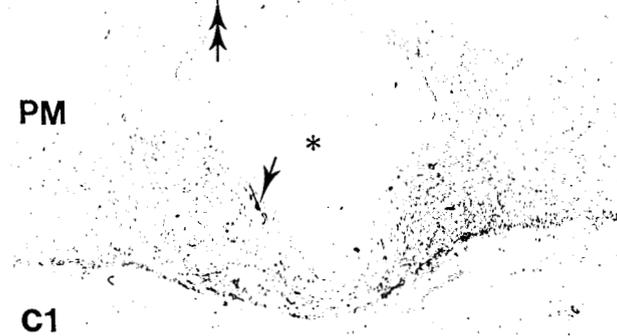
b1

SOM



b2

hGHRF



c1

SOM



c2

Planche XXVI : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-SOMATOSTATINE (SOM)
DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) ET L'EMINENCE MEDIANE (EM) DU RAT.

a1 et b1 : Coupes dans le NARC dorsal (a1, voir Fig.b1 Planche XXV) et dans l'EM
(b1) traitées par l'IS 81.

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont
subi une seconde réaction anti-SOM.

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- dans le NARC, les populations hGHRF-I (a1) et SOM-I (a2) sont
globalement différentes (simples flèches en a1). Cependant, des exemples de
colocalisation des deux IR sont observés (doubles flèches en a1 et a2).

- dans l'EM, les innervations périportales hGHRF-I et SOM-I ont des
distributions semblables dans la zone externe (petites flèches en b1 et b2).
Certaines différences sont toutefois évidentes (pointes de flèches en b1 et b2).
Les deux innervations sont différentes.

Barre en a1 = 100 μ m

en b1 = 50 μ m

Réactions au chloronaphtol.

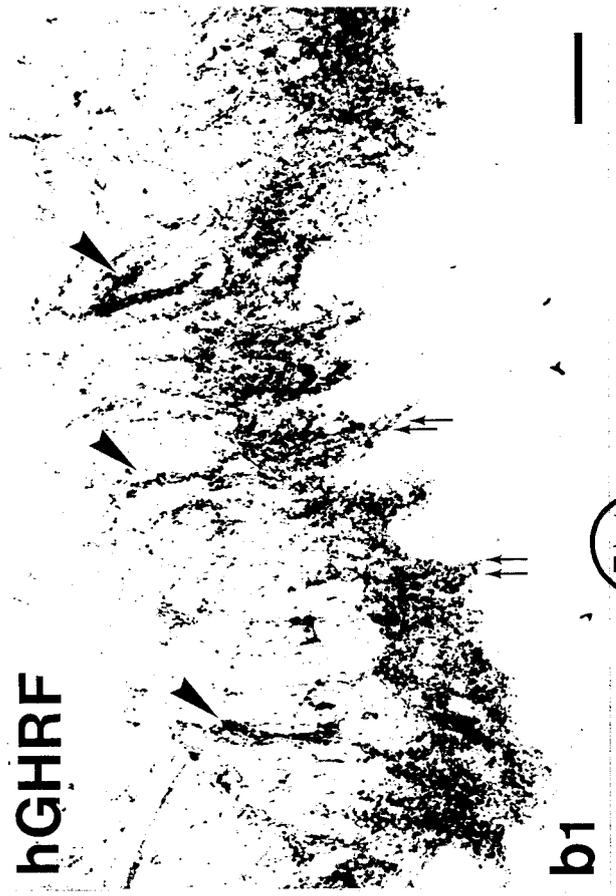
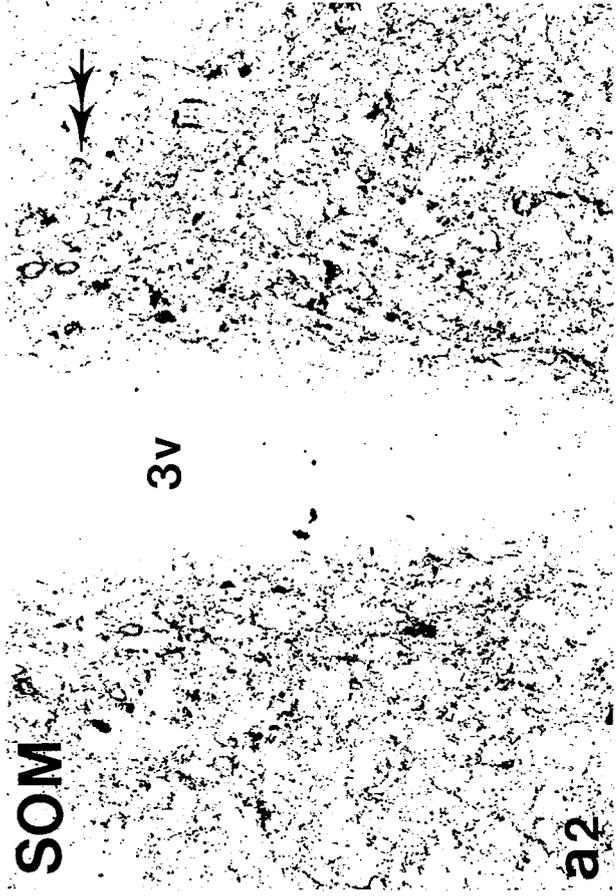


Planche XXVII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CTPG ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) DE L'HYPOTHALAMUS HUMAIN.

a1 et a2 : montrent la même coupe dans le NARC dorsal, après une première réaction anti-CTPG (a1), a été décolorée, soumise au traitement d'éluion des anticorps, et ^{qui} traitée par un IS anti-NPY (a2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- les péricaryons CTPG-I sont essentiellement localisés dans le NARC dorsal (a1); l'innervation CTPG-I est peu dense.

- les péricaryons NPY-I sont plus nombreux en position ventrale et médiane (a2); l'innervation NPY-I est très dense.

- alors que la majorité des péricaryons marqués ne présente que l'une des deux IR, quelques neurones (doubles flèches en a1 et a2) et quelques profils axoniques ou dendritiques (pointes de flèches) sont à la fois CTPG-I et NPY-I. Les deux IR dans un même péricaryon ne sont pas toujours corrélées.

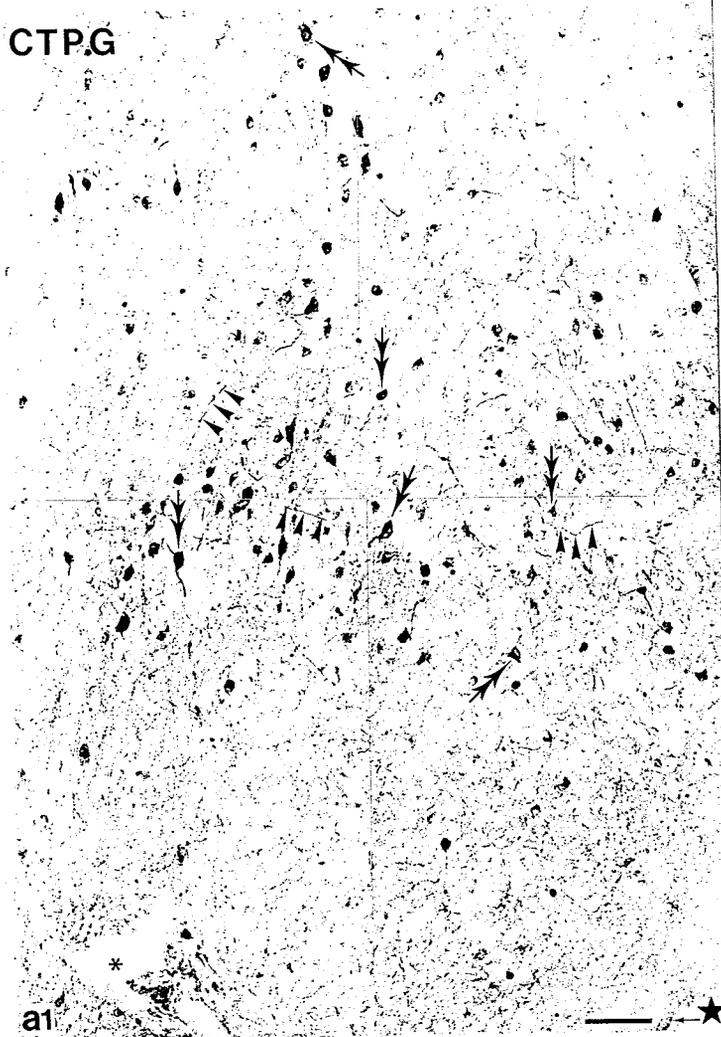
La partie ventrale de la région infundibulaire de cette coupe est présentée à la Planche XXVIII.

*, vaisseau sanguin ; la petite flèche en bas à droite indique la direction médiane, et l'étoile la surface piaie de l'hypothalamus basal.

Barre en a1 = 100 μ m

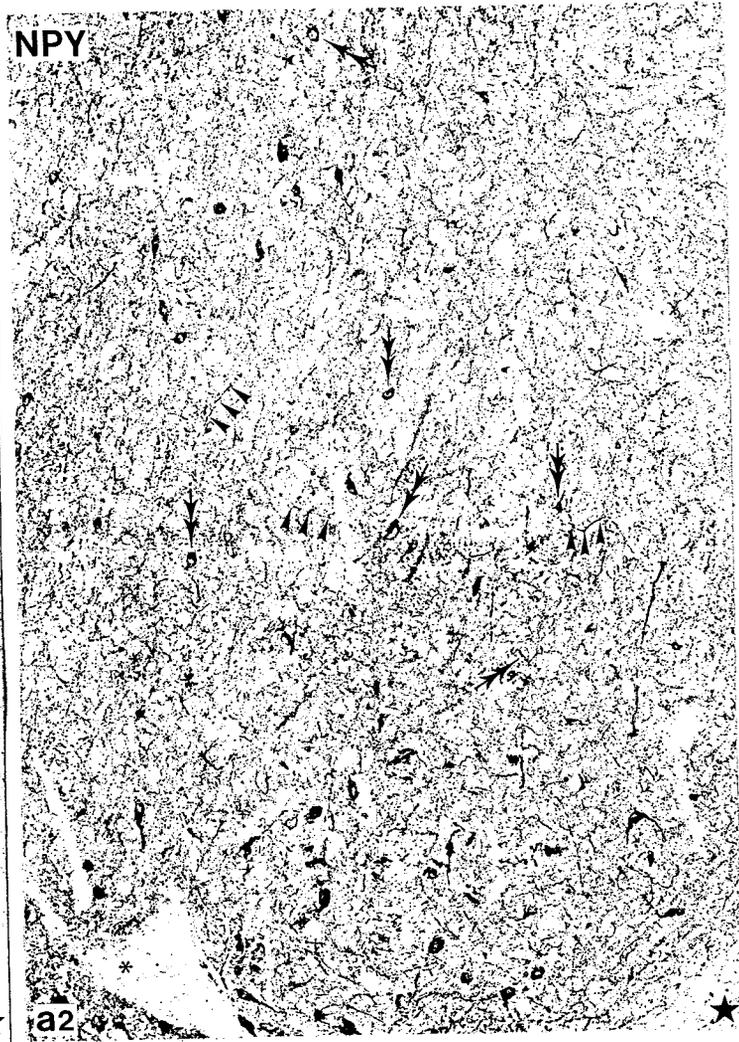
Réactions au chloronaphtol.

CTPG



a1

NPY



a2



Planche XXVIII : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CTPG ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) ET L'INFUNDIBULUM DE L'HYPOTHALAMUS HUMAIN.

a1 et a2 montrent la même coupe dans l'infundibulum qui, après avoir subi une première réaction anti-CTPG (a1), a été décolorée, soumise au traitement d'éluion des anticorps, puis traitée par un IS anti-NPY (a2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- dans le NARC ventral, l'IR-NPY intéresse de nombreux corps cellulaires (flèches) et fibres nerveuses (a2), alors que les structures nerveuses CTPG-I sont très rares dans cette région (a1).

- dans l'éminence médiane, de nombreuses fibres et terminaisons péricapillaires CTPG-I sont présentes dans la zone neurovasculaire (pointes de flèches en a1), alors que dans cette région l'IR-NPY n'intéresse qu'un plexus nerveux très lâche (pointes de flèches en a2) et clairsemé.

La région encadrée en a1 est présentée à fort grossissement sur la Planche XXX à la Fig.a1.

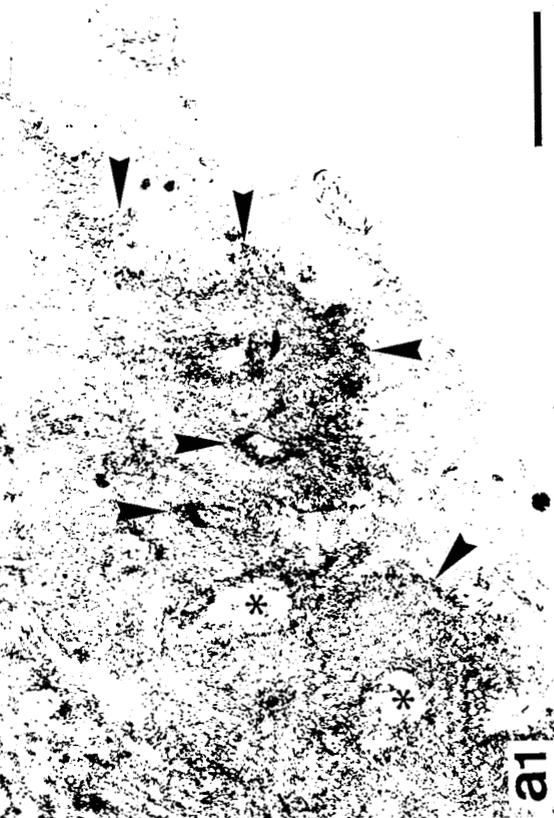
*, capillaires portes hypophysaires

Barre en a1 = 200 μ m

Réactions au chloronaphtol

CTPG

NARC



a1

NPY



a2



Planche XXIX : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF, ANTI-CTPG ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC) DE L'HYPOTHALAMUS HUMAIN.

a1, a2 et a3 : La même coupe dans le NARC dorsal qui a subi trois réactions successives révélant trois peptides différents (indiqués en haut et à gauche de chaque figure) avec deux éluations (en a2 et a3).

b1, b2 et b3 : Les trois mêmes régions de la Fig.a (cadre) après chacun des différents marquages.

La comparaison des marquages successifs révèle que :

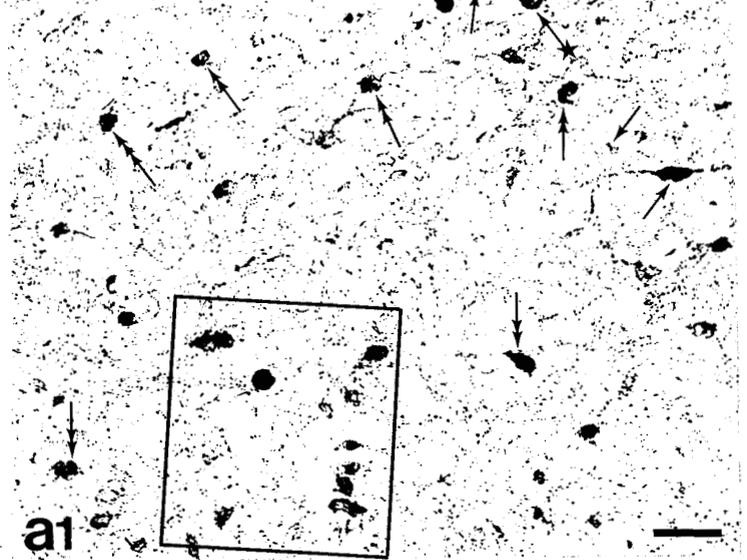
- les péricaryons hGHRF-I sont plus nombreux que les péricaryons CTPG-I et NPY-I.
- l'innervation hGHRF-I est plus dense que l'innervation CTPG-I et comparable à l'innervation NPY-I.
- une grande partie des péricaryons hGHRF-I contient aussi l'IR-CTPG (doubles flèches en a1 et a2, b1 et b2).
- certains péricaryons hGHRF-I sont NPY-I mais pas CTPG-I (simples flèches en a1 et a3).
- certains péricaryons présentent les trois IR (triples flèches en a1, a2 et a3 et en b1, b2 et b3). Les trois IR ne sont pas strictement corrélées.
- la plus grande partie de l'innervation hGHRF-I est aussi NPY-I (comparer b1 et b3) et constitue quelques fois des couronnes périsonomatiques (flèches simples en b1 et b3) autour de neurones (hGHRF,CTPG)-I (étoiles en b3).

La flèche en a1 indique un vaisseau sanguin colmaté par des hématies dont la coloration aspécifique est éliminée en a2 et a3 après traitement d'élu^lation des anticorps.

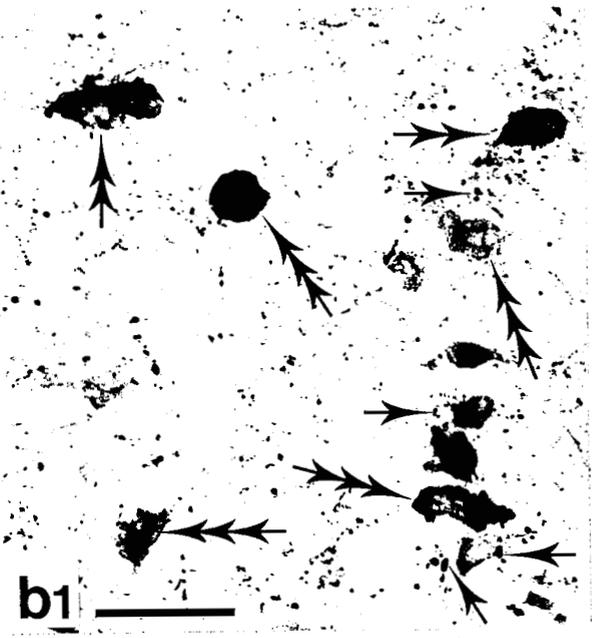
Barre en a1 = 100 μ m
en b1 = 50 μ m

Réactions au chloronaphtol

hGHRF

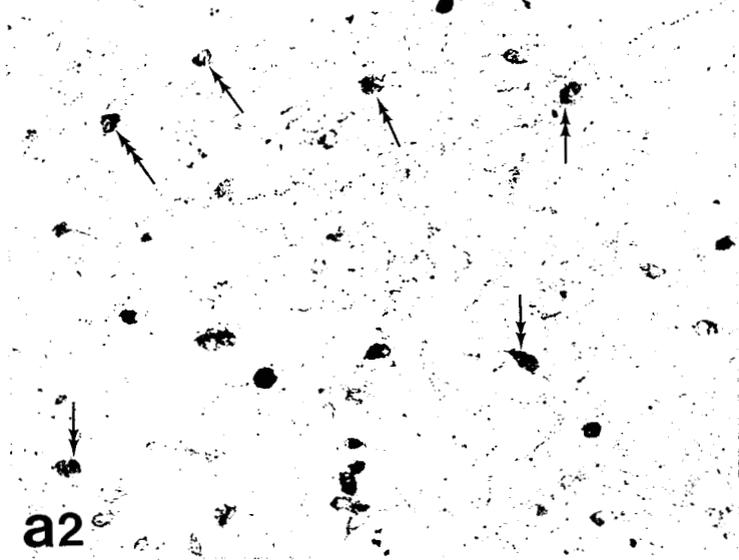


a1

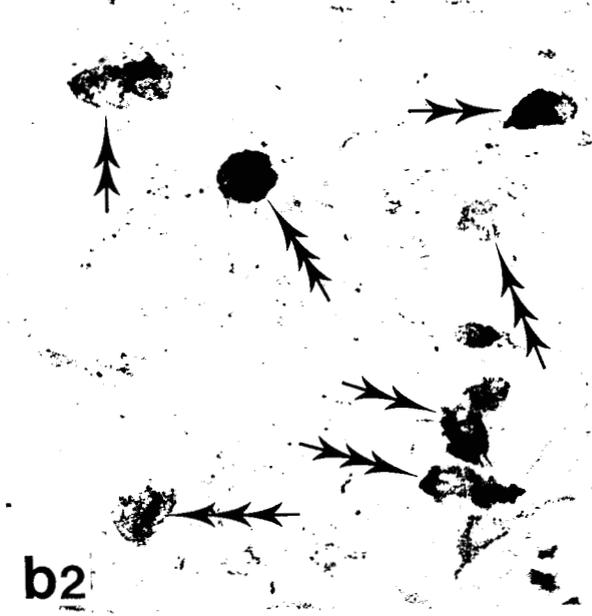


b1

CTPG

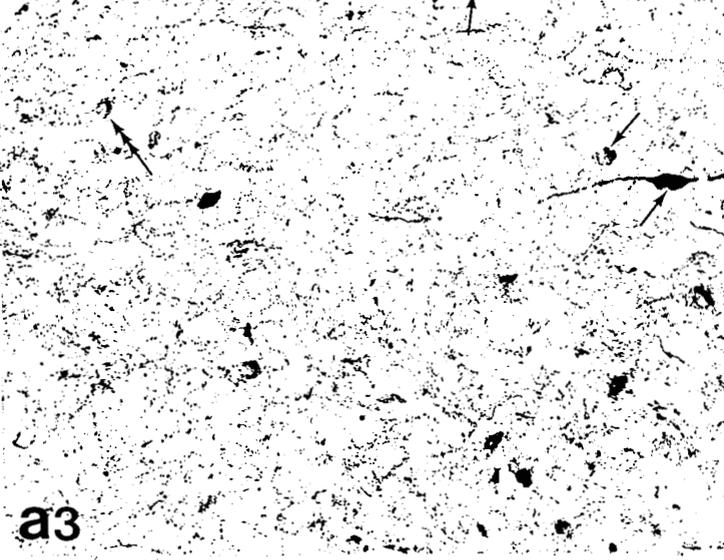


a2

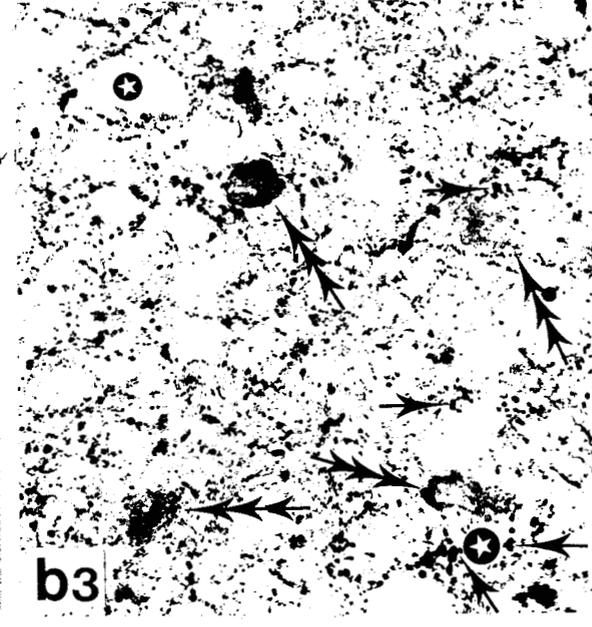


b2

NPY



a3



b3

Planche XXX : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-CTPG ET ANTI-hGHRF AVEC LE MARQUAGE ANTI-NPY DANS LA ZONE INTERNE DE L'EMINENCE MEDIANE (EM) CHEZ L'HOMME.

a1 et b1 : Coupes non adjacentes dans la zone interne de l'EM traitées par un IS anti-CTPG (a1) et par l'IS 81 (b1).

a2 et b2 : Les mêmes coupes qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une seconde réaction anti-NPY.

La comparaison des figures a1 et a2 révèle que :

- l'innervation CTPG-I de la zone interne est plus clairsemée que l'innervation NPY-I de cette région.

- si les deux innervations sont en général dissociées (simples flèches), quelques fibres variqueuses observées autour de vaisseaux sanguins (*) contiennent à la fois l'IR-CTPG et l'IR-NPY (doubles flèches en a1 et a2).

La comparaison des figures b1 et b2 révèle que :

- la plupart des fibres variqueuses hGHRF-I est aussi NPY-I (doubles flèches en b1 et b2).

- certaines fibres nerveuses hGHRF-I ne contiennent pas l'IR-NPY (simples flèches en b1).

- certains péricaryons hGHRF-I dans la zone interne contiennent aussi l'IR-NPY (flèche grasse en b1 et b2), alors que certains péricaryons à IR-NPY faible ne contiennent pas d'IR-hGHRF détectable (pointes de flèches en b2).

*, vaisseau sanguin.

Barre en a1 = 50 μ m. b1 à la même échelle.

Réactions au chloronaphtol.

CTPG



a1

NPY



a2

hGHRF



b1

NPY



b2

Planche XXXI : COMPARAISON DES MARQUAGES ANTI-hGHRF, ANTI-CTPG ET ANTI-NPY DANS LA ZONE EXTERNE DE L'EMINENCE MEDIANE (EM) ET DES MARQUAGES ANTI-CCK ET ANTI-NPY DANS LE NOYAU ARQUE (NARC), CHEZ L'HOMME.

a1, a2 et a3 : La même coupe dans la zone neurovasculaire périphérique ^{de l'EM} qui a subi trois marquages successifs pour des peptides différents (indiqués en haut et à gauche de chaque figure) avec deux éluions (en a2 et a3).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- la majorité de l'innervation périportale hGHRF-I est aussi CTPG-I (doubles flèches en a1 et a2).
- l'innervation NPY-I de cette région est très lâche (a3).
- certaines terminaisons et fibres nerveuses périportales contiennent l'IR-hGHRF et l'IR-NPY mais pas l'IR-CTPG (simples flèches en a1 et a3).
- certaines fibres et terminaisons périportales contiennent à la fois les trois IR (triples flèches en a1, a2 et a3).

b1 et b2 : La même coupe dans le NARC ventral traitée par l'IS 15/8 (b1) puis, après décoloration et élution des anticorps, a subi une seconde réaction anti-NPY (b2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- tous les péricaryons CCK-I sont aussi NPY-I (doubles flèches en b1 et b2).
- certains péricaryons NPY-I ne présentent pas d'IR-CCK détectable (flèches simples en b2).

Bien que de faible intensité, ces deux réactions sont qualitativement indiscutables.

*, vaisseaux sanguins.

Barre en a1 = 50 μ m
en b1 = 100 μ m

Réactions au chloronaphtol

hGHRF



a1

CCK



b1

CTPG



a2

NPY



b2

NPY



a3

Planche XXXII : DISTRIBUTION DE L'IR-hGHRF DANS L'HYPOTHALAMUS ANTERIEUR DU RAT ET SA COMPARAISON AVEC LE MARQUAGE ANTI-NPY DANS LE NOYAU PARAVENTRICULAIRE (NPV).

a : Vue générale de l'hypothalamus montrant la distribution des structures hGHRF-I dans le NPV. Les régions parvocellulaires sont richement innervées et contiennent parfois des corps cellulaires marqués (pointe de flèche) aussi présents dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA). L'innervation hGHRF-I de cette région semble irradier depuis le noyau arqué (NA) où sont observés des corps cellulaires marqués.

b1 et b2 : La même coupe dans le NPV parvocellulaire qui, après marquage par l'IS-81 (b1) a été décolorée, soumise au traitement d'éluion, puis traitée par un IS anti-NPY (b2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- la plupart des fibres et terminaisons nerveuses hGHRF-I est aussi NPY-I (doubles flèches).

- certaines fibres nerveuses ne présentent que l'IR-hGHRF (simple flèche en b1) ou que l'IR-NPY (flèche étoillée en b2).

*, troisième ventricule (3V. en a).

Barre en a = 200 μ m

en b1 = 50 μ m

Réactions au chloronaphtol

hGHRF

NPV

3V

AHA

NA

hGHRF

b1

NPY

b2

a



*

*



Planche XXXIII : COLOCALISATION DES MARQUAGES ANTI-hGHRF ET ANTI-NPY DANS LE CERVEAU DU RAT.

a-j : Détail de coupes traitées par l'IS 81 (figures a1-j1) qui, après décoloration et élution des anticorps, ont subi une seconde réaction anti-NPY (a2-j2).

La comparaison des marquages successifs révèle que :

- dans les structures télencéphaliques :
 - . tous les neurones corticaux hGHRF-I sont aussi NPY-I (a1-a2, b1-b2, c1-c2).
 - . toutes les neurones striataux hGHRF-I sont aussi NPY-I (d1-d2).
 - . l'innervation hGHRF-I est aussi NPY-I (cortex piriforme, couche pyramidale, f1-f2).
- dans les structures limbiques :
 - . dans le lit de la strie terminale (e1-e2), les péricaryons hGHRF-I (grandes flèches) et les fibres nerveuses (petites flèches) sont aussi NPY-I. *, troisième ventricule.
 - . dans le noyau paraventriculaire thalamique (j1-j2) l'innervation hGHRF-I est aussi NPY-I (flèches).
 - . dans le faisceau médian du télencéphale (i1-i2) les deux marquages intéressent strictement les mêmes structures (flèches).
 - . dans l'hypothalamus périventriculaire médian (h1-h2), certains corps cellulaires hGHRF-I ne sont pas NPY-I (grandes flèches) alors que la plupart des fibres nerveuses hGHRF-I ^{est} sont aussi NPY-I (petites doubles flèches), certaines d'entre elles sont au voisinage de péricaryons hGHRF+ et NPY- (petite flèche).
- les deux marquages dans un même péricaryons ne sont pas toujours corrélés (illustré en g1-g2 dans les tubercules olfactifs).
 - . grande flèche, péricaryons à IR-hGHRF et IR-NPY fortes.
 - . petite flèche, péricaryons à IR-hGHRF et IR-NPY ~~fortes~~ *faibles*.
 - . petites doubles flèches, péricaryons à IR-hGHRF faible et IR-NPY forte.

Barre en a1 = 50 μ m
ailleurs = 25 μ m

Réactions au chloronaphtol

hGHRF

NPY

hGHRF

NPY

hGHRF

NPY

a1

a2

b1

b2

c1

c2

hGHRF

NPY

hGHRF

e1

NPY

e2

*

*

hGHRF

NPY

hGHRF

NPY

f1

f2

g1

g2

hGHRF

hGHRF

hGHRF

h1

i1

j1

NPY

NPY

NPY

h2

i2

j2



BIBLIOGRAPHIE

- ADRIAN T.E., ALLEN J.M., BLOOM S.R., GHATEI M.A., ROSSOR M.N., ROBERTS G.W., CROW T.J., TATEMOTO T., POLAK J.M. 1983. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature*, 306:384-386.
- ADRIAN T.E., BACARESE-HAMILTON A.J., BLOOM R.S. 1985. Measurement of cholecystokinin octapeptide using a new specific radioimmunoassay. *Peptides*, 6:11-16.
- AKESSON T.R., MANTYH P.W., MANTYH C.R., MATT D.W., MICEVYCH P.E. 1987. Estrous cyclicity of ¹²⁵I-cholecystokinin octapeptide binding in the ventromedial hypothalamic nucleus. Evidence for downmodulation by estrogen. *Neuroendocrinology*, 45:257-262.
- ALLARD L.R., BEINFELD M.C. 1985a. The subcellular distribution of peptides immunoreactive for the amino-terminal of pro-cholecystokinin in rat brain. *Regul. Pept.*, 12:59-66.
- ALLARD L.R., BEINFELD M.C. 1985b. The subcellular distribution of peptides immunoreactive for the carboxyl-terminal extension of cholecystokinin in rat brain. *Neuropeptides*, 6:239-245.
- ALLEN Y.S., ADRIAN T.E., ALLEN J.M., TATEMOTO K., CROW T.J., BLOOM S.R., POLAK J.M. 1983. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 221:877-879.
- ALLEN J.M., POLAK J.M., BLOOM S.R. 1985. Presence of the predicted C-flanking peptide of neuropeptide Y (NPY) in tissue extracts. *Neuropeptides*, 6:95-100.
- ALONSO G., SZAFARCZYK A., ASSENMACHER I. 1986. Immunoreactivity of hypothalamo-neurohypophysial neurons which secrete corticotropin-releasing hormone (CRH) and vasopressin (VP) : immunocytochemical evidence for a correlation with their functional state in colchicine-treated rats. *Exp. Brain Res.*, 61:497-505.
- ANDRIES J.C., BELEMOUGRI G., TRAMU G. 1984. Immunohistochemical identification of growth hormone-releasing factor-like material in the nervous system of an insect *Aeshna cyanea* (Odonata). *Neuropeptides*, 4:519-528.
- ANDRIES J.C., BELEMOUGRI G., TRAMU G. 1985. Coexistence of serotonin and cholecystokinin-like material in the nervous system of *Aeshna cyanea* (Insecta, Odonata). *Biogenic Amines*, 3:219-227.
- ANHUT H., MEYER D.T., KNEPEL W. 1983. Cholecystokinin-like immunoreactivity of rat medial basal hypothalamus : investigations on a possible hypophysiotropic function. *Neuroendocrinology*, 36:119-124.
- BACARESE-HAMILTON A.J., ADRIAN T.E., CHOHAN P., BLOOM S.R. 1985. Rat immunoreactive cholecystokinin (CCK) : characterization using two chromatographic techniques. *Regul. Pept.*, 11:149-158.
- BAI F.L., YAMANO M., SHIOTANI Y., EMSON P.C., SMITH A.D., POWELL J.F., TOHYAMA M. 1985. An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res.*, 331:172-175.
- BARRY J., DUBOIS M.P., POULAIN P. 1973a. LRF-producing cells of mammalian hypothalamus : a fluorescent antibody study. *Z. Zellforsch.*, 146:351-366.
- BARRY J., DUBOIS M.P., POULAIN P., LEONARDELLI J. 1973b. Caractérisation et topographie des neurones hypothalamiques de la région tubéro-infundibulaire chez le cobaye mâle normal ou castré. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 266:15-18.
- BEAUVILLAIN J.-C., TRAMU G., CROIX D. 1980. Electron microscopic localization of enkephalin in the median eminence the adenohypophysis of the guinea-pig. *Neuroscience*, 5:1705-1716.

- BEAUVILLAIN J.-C., TRAMU G., MAZZUCA M. 1987a. Fine structural studies of growth-hormone-releasing-factor (grf) immunoreactive neurons and their synaptic connections in the guinea pig arcuate nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 255:110-113.
- BEAUVILLAIN J.-C., TRAMU G., MAZZUCA M., 1987b. Ultrastructural demonstration of nerve endings containing a substance related to growth hormone-releasing factor in the guinea-pig paraventricular nucleus. *Cell Tissue Res.*, 248:223-226.
- BEINFELD M.C. 1981. An HPLC and RIA analysis of the cholecystokinin peptides in rat brain. *Neuropeptides*, 1:203-209.
- BEINFELD M.C. 1982. Chromatographic characterization of gastrin/cholecystokinin peptides in bovine and porcine pituitary. *Peptides*, 3:531-534.
- BEINFELD M.C. 1983. Cholecystokinin in the central nervous system : a minireview. *Neuropeptides*, 3:411-427.
- BEINFELD M.C. 1985a. Cholecystokinin (CCK) gene-related peptides : distribution and characterization of immunoreactive pro-CCK and an amino-terminal pro-CCK fragment in rat brain. *Brain Res.*, 344:351-355.
- BEINFELD M.C. 1985b. Peptides in rat brain immunoreactive for the carboxyl terminal extension of cholecystokinin : distribution and chromatography. *Peptides*, 6:857-860.
- BEINFELD M.C., CIARLEGLIO A. 1985. Neurochemistry of cholecystokinin in brain, pituitary and cerebrospinal fluid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 778:44-52
- BEINFELD M.C., MEYER D.K., BROWNSTEIN M.J. 1980. Cholecystokinin octapeptide in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature*, 288:376-378.
- BEINFELD M.C., MEYER D.K., ESKAY R.L., JENSEN R.T., BROWNSTEIN M.J. 1981. The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Res.*, 212:51-57.
- BEINFELD M.C., PALKOVITS M. 1981. Distribution of cholecystokinin (CCK) in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Neuropeptides*, 2:123-129.
- BEINFELD M.C., TRUBATCH J.R., BROWNSTEIN M.J. 1983. Cholecystokinin peptides in the brain and pituitary of the bullfrog Rana catesbiana : distribution and characterization. *Brain Res.*, 268:192-196.
- BERESFORD I.J.M., CLARK C.R., HUGHES J. 1986. Measurement and characterization of neuronal cholecystokinin using a novel radioreceptor assay. *Brain Res.*, 398:313-323.
- BERKENBOSCH F., LINTON E.A., TILDER, F.J.H. 1986. Colocalization of peptide histidine isoleucine amide and corticotropin-releasing factor immunoreactivity in neurons of the rat hypothalamus : a surprising artefact. *Neuroendocrinology*, 44:338-346.
- BLOCH B., BAIRD A., LING N., GUILLEMIN R. 1986. Immunohistochemical evidence that growth hormone-releasing factor (GRF) neurons contain an amidated peptide derived from cleavage of the carboxy-terminal end of the GRF precursor. *Endocrinology*, 118:156-162.
- BLOCH B., BRAZEAU P., BLOOM F., LING N. 1983a. Topographical study of the neurons containing hpGRF immunoreactivity in monkey hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 37:23-28.
- BLOCH B., BRAZEAU P., LING N., BOHLEN P., ESCH F., WEHRENBURG W.B., BENOIT R., BLOOM F., GUILLEMIN R. 1983b. Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. *Nature*, 301:607-608.

- BLOCH B., BUGNON C., FELLMANN D., LENYS D., GOUGET A. 1979. Neurons of the rat hypothalamus reactive with antisera against endorphins, ACTH, MSH and β -LPH. *Cell Tissue Res.*, 204:1-15.
- BLOCH B., GAILLARD R.C., BRAZEAU P., LIN H.D., LING N. 1984a. Topographical and ontogenic study of the neurons producing growth hormone-releasing factor in human hypothalamus. *Regul. Pept.*, 8:21-31.
- BLOCH B., LING N., BENOIT R., WEHREBERG W.B., GUILLEMIN R. 1984b. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature*, 307:272-273.
- BLOOM F., BATTENBERG E., ROSSIER J., LING N., GUILLEMIN. 1978. Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin : immunocytochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1591-1595.
- BOHLEN P., BRAZEAU P., BLOCH B., LING N., GAILLARD R., GUILLEMIN R. 1983b. Human hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF) : evidence for two forms identical to tumor derived GRF-44-NH₂ and GRF-40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114:930-936.
- BOHLEN P., BRAZEAU P., ESCH F., LING N., WEHREBERG W.B., GUILLEMIN R. 1983a. Human growth hormone releasing factor and somatostatin from two pancreatic tumors : isolation and characterization. *Regul. Pept.*, 6:343-353.
- BONATO C., ENG J., HULMES D., MIEDEL M., PAN Y.-C.E., YALOW R.S. 1986a, Sequences of gastrins purified from a single antrum of dog and goat. *Peptides*, 7:689-693.
- BONATO C., ENG J., PAN Y.-C.E., MIEDEL M., HULMES J.D., YALOW R.S. 1986b. Guinea pig 33-amino acid gastrin. *Life Sci.*, 39:959-964.
- BOORSMA D.M. 1984. Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 80:103-106.
- BRAZEAU P., LING N., BOHLEN P., ESCH F., YING S.Y., GUILLEMIN R. 1982. Growth hormone releasing factor, somatocinin, releases pituitary growth hormone in vitro. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 79:7909-7913.
- BRESSON J.L., CLAVEQUIN M.C., FELLMANN D., BUGNON C. 1984. Ontogeny of the neuroglandular system revealed with HPGRF 44 antibodies in human hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 39:68-73.
- BUGNON C., BLOCH B., LENYS D., GOUGET A., FELLMANN D. 1979. Comparative study of the neuronal populations containing β -endorphin, corticotropin and dopamine in the arcuate nucleus of the rat brain. *Neurosci. Lett.*, 14:43-48.
- BUGNON C., GOUGET A., FELLMANN D., CLAVEQUIN M.C. 1983. Immunocytochemical demonstration of a novel peptidergic neuron system in the cat brain with an anti-growth hormone-releasing factor serum. *Neurosci. Lett.*, 38:131-137.
- CAILLEZ D., DANGER J.M., POLAK J., PELLETIER G., ANDERSEN A.D., LEBOULENGER F., VAUDRY H. 1987. Co-distribution of neuropeptide Y and its C-terminal flanking peptide in the brain and pituitary of the frog Rana ridibunda. *Neurosci. Lett.*, 74:163-168.
- CARD J.P., BRECHA N., MOORE R.Y. 1983. Immunohistochemical localization of avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 217:123-136.
- CHO H.J., SHIOTANI Y., SHIOSAKA S., INAGAKI S., KUBOTA Y., KIYAMA H., UMEGAKI K., TATEISHI K., HASHIMURA E., HAMAOKA T., TOHYAMA M. 1983. Ontogeny of cholecystokinin 8-containing- neurons system of the rat : an immunohistochemical analysis. I. Forebrain and upper brainstem. *J. Comp. Neurol.*, 218:25-41.

- CHO H.J., SHIOTANI Y., TATEISH K., HASHIMURA E., HAMAOKA T., TOHYAMA M. 1984. Cholecystokinin-8-like immunoreactivity in the rat anterior commissure revealed by immunocytochemistry. *Brain Res.*, 300:372-375.
- CHOWDHURY J.R., BERKOWITZ J.M., PRAISSMAN M., FARA J.W. 1976. Effect of sulfated and non-sulfated gastrin and octapeptide cholecystokinin on cat gallbladder in vitro. *Experientia*, 32:1173-1175.
- CHRONWALL B. 1985. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 5 Suppl. 2:1-11.
- CHRONWALL B.M., DIMAGGIO D.A., MASSARI V.J., PICKEL V.M., RUGGIERO D.A., O'DONOHUE T.L. 1985. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15:1159-1181.
- CHRONWALL B.M., OLSCHOWKA J.A., O'DONOHUE T.L. 1984. Histochemical localization of FMRF amide-like immunoreactivity in the rat brain. *Peptides*, 5:569-584.
- CHRISTIE M.J., BERT P.M., JARROTT B., MACCARRONE C. 1986. Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the rat basal ganglia: effects of excitotoxin lesions to caudate-putamen. *Neurosci. Lett.*, 63:305-309.
- CIOFI P., TRAMU G. 1985. Demonstration of gastrin/cholecystokinin-like immunoreactivity in the arcuate nucleus, median eminence and pituitary of the guinea-pig. *Neurosci. Lett.*, 62:293-298.
- CIOFI P., TRAMU G. 1986a. Identification immunohistochimique d'un système de neurones tubéro-extra-infundibulaires à cholécystokinine. *Colloque National des Neurosciences*, Avril 1986.
- CIOFI P., TRAMU G. 1986b. Arcuate hGHRF mainly occurs in an extra-infundibularly projecting multipeptidergic neuronal system. *Neuroendocrinology*, First International Congress of Neuroendocrinology, Résumé 174 p67.
- CIOFI P., TRAMU G. 1986c. Nouveau système neuronique tubéro-extra-infundibulaire caractérisé par la co-existence de G/CCK, NPY et hGHRF. *Ann. Endocrinol.*, 47:21N.
- CIOFI P., TRAMU G. 1987. Coexistence of human somatocristinin-(hGHRF-) and neuropeptide Y-(NPY-)like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience*, Second World Congress of Neurosciences IBRO, Résumé, sous presse.
- CIOFI P., CROIX D., TRAMU G. 1987a. Coexistence of hGHRF and NPY immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 45:425-428.
- CIOFI P., CROIX D., TRAMU G. 1987b. Coexistence of somatocristinin- and neuropeptide Y-immunoreactivities in neurons of the human hypothalamus. *Neuroscience*, Second World Congress of Neuroscience IBRO, Satellite Symposium "Selected Topics in Hypothalamic Research", Résumé, sous presse.
- CIOFI P., CROIX D., TRAMU G. 1987c. Coexistence of GRF- and NPY-like immunoreactivities in hypothalamic neurons of the human brain. *Soumis pour publication*.
- COONS A.H. 1978. Fluorescent antibody methods. Dans "General Cytochemical Methods" (ed. Danielli J.F.), Academic, New York, pp 399-422.
- DAIKOKU S., KAWANO H., NOGUCHI M., NAKANISHI J., TOKUJEN M., CHIHARA K., NAGATSU I. 1986. GRF neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 399:250-261.
- DAIKOKU S., KAWANO H., NOGUCHI M., TOKUZEN M., OHIHARA K., SAITO H., SHIBASAKI T. 1985. Ontogenic appearance of immuno-GRF-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 242:511-518.

- DANGER J.M., GUY J.C., BENYAMINA M., JEGOU S., LEBOULENGER F., COTE J., TONON M.C., PELLETIER G., VAUDRY H. 1985. Localization and identification of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the frog brain. *Peptides*, 6:1225-1236.
- DAY N.C., HALL M.D., CLARCK C.R., HUGHES J. 1986. High concentrations of cholecystokinin receptor binding sites in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Neuropeptides*, 8:1-18.
- DE GENNARO V., REDAELLI M., LOCATELLI V., CELLA S., FUMAGALLI G., WEHREBERG W.B., MULLER E.E. 1986. Ontogeny of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 44:59-64.
- DEMEULEMEESTER H., VANDESANDE F., ORBAN G.A. 1985. Immunocytochemical localization of somatostatin and cholecystokinin in the cat visual cortex. *Brain Res.*, 332 : 361-364.
- DE OLMOS J., ALHEID G.F., BELTRAMINO C.A. 1985. The Rat Nervous system, vol. 1, Forebrain and Hindbrain, Amygdala pp 223-334, G. Paxinos Ed., Academic Press.
- DE PALATIS L.R., FIORINDO R.P., HO R.H. 1982. Substance P immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the guinea-pig. *Endocrinology*, 110:282-284.
- DE QUIDT M.E., EMSON P.C. 1986a. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system. II. Radioimmunoassay and chromatographic characterization. *Neuroscience*, 18:527-543.
- DE QUIDT M.E., EMSON P.C. 1986b. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system. I. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 18:545-618.
- DESCHENES R.J., HAUN R.S., FUNCKES C.L., DIXON J.E. 1985a. A gene encoding rat cholecystokinin. *J. Biol. Chem.*, 260:1280-1286.
- DESCHENES R.J., LORENZ L.J., HAUN R.S., ROOS B.A., COLLIER K.J., DIXON J.E. 1984. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:726-730.
- DESCHENES R.J., NARAYANA S.V.L., ARGOS P., DIXON J.E. 1985b. Primary structural comparison of the preprohormones cholecystokinin and gastrin. *FEBS Lett.*, 182:135-138.
- DESCHERPER C., LOTSTRA F., VANDESANDE F., VANDERHAEGHEN J.J. 1983. Cholecystokinin varies in the posterior pituitary and median eminence of the rat according to factors affecting vasopressin and oxytocin. *Life Sci.*, 32:2572-2577.
- DESCHODT-LANCKMAN M. 1985. Enzymatic degradation of cholecystokinin in the central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:87-98.
- DESCHODT-LANCKMAN M., BUI N.D., KOULISCHER D., PAROUTAUD D., STROSBURG A.D. 1983. Cholecystokinin octa- and tetrapeptide degradation by synaptic membranes. II. Solubilization and separation of membrane-bound CCK-8 cleaving enzymes. *Peptides*, 4:71-78.
- DESCHODT-LANCKMAN M., KOULISCHER D., PRZEDBORSKI S., LAUWEREYS M. 1984. Cholecystokinin octa- and tetrapeptide degradation by synaptic membranes. III. Inactivation of CCK-8 by a phosphoramidon-sensitive endopeptidase. *Peptides*, 5:649-651.
- DHAINAUT-COURTOIS N., TRAMU G., MARCEL R., MALECHA J., VERGER-BOCQUET M., ANDRIES J.C., MASSON M., SELLOUM L., BELEMTUGRI G., BEAUVILLAIN J.C. 1985. CCK in Invertebrates and Protochordates nervous system with special references to the immunohistochemical localization of a CCK-8-like substance in Annelids and Insects. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 448:167-187.

- DI MAGGIO D.A., CHRONWALL B.M., BUCHANAN K., O'DONOHUE J.L. 1985. Pancreatic polypeptide immunoreactivity in rat brain is actually neuropeptide Y. *Neuroscience*, 15 (4):1149-1157.
- DIMALINE R. 1983. Is caerulein amphibian CCK ? *Peptides*, 4:457-462.
- DOCKRAY G.J. 1976. Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature*, 264:568-570.
- DOCKRAY G.J. 1977. Immunoreactive component resembling cholecystokinin in intestine. *Nature*, 270:359-361.
- DOCKRAY G.J. 1978. Cholecystokinin-like peptides in avian brain and gut. *Experientia*, 35:628-630.
- DOCKRAY G.J. 1979. Evolutionary relationships of the gut hormones. *Fed. Proc.*, 38:2295-2301.
- DOCKRAY G.J. 1980. Cholecystokinin in rat cerebral cortex : identification, purification and characterization by immunochemical methods. *Brain Res.*, 188:155-165.
- DOCKRAY G.J., DESMOND H., GAYTON R.J., JONSSON A.C., RAYBOULD H., SHARKEY K.A., VARRO A., WILLIAMS R.G. 1985. Cholecystokinin and gastrin forms in the nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 448:32-43.
- DOCKRAY G.J., GREGORY R.A., HUTCHISON J.B. 1978. Isolation, structure and biological activity of two cholecystokinin octapeptides from sheep brain. *Nature*, 274:711-713.
- DOCKRAY G.J., GREGORY R.A., / REHFELD J.F., LARSSON L.I., GOLTERMANN N.R., SCHWARTZ I.W., HOLST J.J., JENSEN S.L., J.S. MORLEY. 1980. Does the C-terminal tetrapeptide of gastrin and CCK exist as an entity ? *Nature*, 286-742.
- DOCKRAY G.J., WILLIAMS R.G., W-Y. ZHU. 1981. Development of region-specific antisera for the C-terminal tetrapeptide of gastrin/cholecystokinin and their use in studies of immunoreactive forms of cholecystokinin in rat brain. *Neurochem. Int.*, 3:281-288.
- DODD P.R., EDWARSON J.A., DOCKRAY G.J. 1980. The depolarisation induced release of cholecystokinin C-terminal octapeptide (CCK-8) from rat synaptosomes and brain slices. *Regul. Pept.*, 1:17-29.
- DODD J., KELLY J.S. 1981. The actions of cholecystokinin and related peptides on pyramidal neurons of the mammalian hippocampus. *Brain Res.*, 205:337-350.
- DOERR-SCHOTT J., GARAUD J.C. 1979a. Neuroendocrinologie. Identification immunohistochimique, chez un Amphibien anoure (*Xenopus laevis* Daud.) de neurones infundibulaires réagissant avec un sérum anti-gastrine. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 288:1055-1058.
- DOERR-SCHOTT J., GARAUD J.C. 1979b. Immunohistochemical localization of gastrin like peptide in the brain of an amphibian *Xenopus laevis* Daud. *Cell Tissue Res.*, 203:65-78.
- DOERR-SCHOTT J., GARAUD J.C. 1981. Ultrastructural identification of gastrin-like immunoreactive nerve fibres in the brain of *Xenopus laevis* by means of colloidal gold or ferritin immunocytochemical methods. *Cell Tissue Res.*, 216:581-589.
- DUBOIS P.M. 1972. Les cellules corticotropes de l'hypophyse des bovins, ovins et porcins. Mise en évidence par immunofluorescence et caractères cytologiques. *Z. Zellforsch.*, 125:200-209.
- DURIEUX C., CHARPENTIER B., PELAPRAT D., ROQUES B.P. 1986. Investigation on the metabolism of CCK-8 analogues by rat brain slices. *Neuropeptides*, 7:1-9.
- ECCLES J.C. 1986. Chemical transmission and Dale's principle. *Prog. Brain Res.*, 78:3-13.

- EKMAN R., WAHLESTEDT C., BOTTCHE G., SUNDLER F., HAKANSON R., PANULA P. 1986. Peptide YY-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul. Pept.*, 16:157-168.
- EMSON P.C., HUNT S.P. 1984. Peptides-containing neurons of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, Vol.2, "Functional properties of cortical cells", E.G. JONES et A.PETER, Eds, pp 145- 169. Plenum Press, New York.
- EMSON P.C., LEE C.M., REHFELD J.F. 1980. Cholecystokinin octapeptide : vesicular localization and calcium dependent release from rat brain in vitro. *Life Sci.*, 26:2157-2163.
- EMSON P.C., REHFELD J.F., ROSSOR M.N. 1982. Distribution of cholecystokinin-like peptides in the human brain. *J. Neurochem.*, 38:1177-1179.
- ENG J., SHIINA Y., PAN Y.C.E., BLACHER R., CHANG M., STEIN S., YALOW R.J. 1983. Pig brain contains cholecystokinin octapeptide and several cholecystokinin desoctapeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:6381- 6385.
- ENG J., SHIINA Y., STRAUS E., YALOW R.S. 1982. Post-translational processing of cholecystokinin in pig brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6060-6064.
- ENGELHARDT R.P., DHAINAUT-COURTOIS N., TRAMU G. 1982. Immunohistochemical demonstration of a CCK-like peptide in the nervous system of a marine annelid worm, *Nereis diversicolor* O.F. Müller. *Cell Tissue Res.*, 227:401-411.
- EPELBAUM J., TAPIA-ARANCIBIA L., HERMAN J.P., KORDON C., PALKOVITS M. 1981. Topography of median eminence somatostatinergic innervation. *Brain Res.*, 230:412-416.
- ESCH F., BOHLEN P., LING N.C., BRAZEAU P.E., WEHRENBURG W.B., THORNER M.O., CRONIN M.J., GUILLEMIN R. 1982. Characterization of a 40 residue peptide from a human pancreatic tumor with growth hormone releasing activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109:152-158.
- EVERITT B.J., HOKFELT T., TERENIUS L., TATEMOTO K., MUTT V., GOLDSTEIN M. 1984a. Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the Rat. *Neuroscience*, 11:443-462.
- EVERITT B.J., HOKFELT T., WU J.-Y., GOLDSTEIN. 1984b. Coexistence of tyrosine hydroxylase-like and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, 39:189-191.
- EVERITT B.J., MEISTER B., HOKFELT T., MELANDER T., TERENIUS L., ROKAEUS A., THEODORSSON-NORHEIM E., DOCKRAY G., DEWARDSON J., CUELLO C., ELDE R., GOLDSTEIN M., HEMMINGS H., OUIMET C., WALAAS I., GREENGARD P., VALE W., WEBER E., WU J.-Y., CHANG K.-J. 1986. The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex : immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Res., Rev.*, 11:97-115.
- EYSSELEIN V.E., REEVE J.R.Jr., SHIVELY J.D., HAWKE D., WALSH J.H. 1982. Partial structure of a large canine cholecystokinin (CCK-58) : amino acid sequence. *Peptides*, 3:687-691.
- EYSSELEIN V.E., REEVE J.R.Jr., SHIVELY J.E., MILLER C., WALSH J.H. 1984. Isolation of a large cholecystokinin precursor from canine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:6565-6568.
- FALLON J.H., HICKS R., LOUGHLIN S.E. 1983a. The origin of cholecystokinin terminals in the basal forebrain of the rat : evidence from immunofluorescence and retrograde tracing. *Neurosci. Lett.*, 37:29-35.
- FALLON J.H., LESLIE F.M. 1986. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 249:293-336.

- FALLON J.H., SEROOGY K.B. 1984. Visual and auditory pathways contain cholecystokinin : evidence from immunofluorescence and retrograde tracing. *Neurosci. Lett.*, 45:81-87.
- FALLON J.H., SEROOGY K.B. 1985. The distribution and some connections of cholecystokinin neurons in the rat brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:121- 132.
- FALLON J.H., WANG C., KIM Y., CANEPA N., LOUGHLIN S., SEROOGY K. 1983b. Dopamine- and cholecystokinin-containing neurons of the crossed mesostriatal projection. *Neurosci. Lett.*, 40:233-238.
- FELDMAN S.C., KASTIN A.J. 1984. Localization of neurons containing immunoreactive delta-sleep-inducing peptide in the rat brain : an immunocytochemical study. *Neuroscience*, 11:303-317.
- FELLMANN D., BUGNON C., LAVRY G.N. 1985. Immunohistochemical demonstration of a new neurone system in rat brain using antibodies against human growth hormone-releasing factor (1-37). *Neurosci. Lett.*, 58:91-96.
- FELLMANN D., BUGNON C., RISOLD P.Y. 1987. Unrelated peptide immunoreactivities coexist in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus : human growth hormone-releasing factor 1-37-, salmon melanin-concentrating hormone- and -melanotropin-like substances. *Neurosci. Lett.*, 74:275-280.
- FELLMANN D., BUGNON C., VERSTEGEN J., LAVRY G.N. 1986. Co-expression of human growth hormone-releasing factor 1-37-like and -melanotropin-like immunoreactivities in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 68:122-126.
- FINKELSTEIN J.A., STEGGLES A.W., MARTINEZ P.A., PRAISSMAN M. 1984. Cholecystokinin receptor binding levels in the genetically obese rat brain. *Peptides*, 5:11-14.
- FREEMAN A.S., BUNNEY B.S. 1987. Activity of Ag and A10 dopaminergic neurons in the unrestrained rats: further characterization and effects of apomorphine and cholecystokinin. *Brain Res.*, 405:46- 55.
- FREUND T.F., MAGLOCZKY Zs, SOLTESZ I., SOMOGYI P. 1986. Synaptic connections, axonal and dendritic patterns of neurons immunoreactive for cholecystokinin in the visual cortex of the cat. *Neurosci.*, 19:1133-1159.
- FRIEDMAN J., SCHNEIDER B.S., POWELL D. 1985. Differential expression of the mouse cholecystokinin gene during brain and gut development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5593- 5597.
- FULWILER C.E., SAPER C.B. 1985, Cholecystokinin-immunoreactive innervation of the ventromedial hypothalamus in the rat : possible substrate for autonomic regulation of feeding. *Neurosci. Lett.*, 53:289- 296.
- GALL C. 1984. The distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the guinea-pig : localization in the mossy fibers. *Brain Res.*, 306:73-83.
- GALL C., LAUTERBORN J., BURKS D., SEROOGY K. 1987. Co-localization of enkephalin and cholecystokinin in discrete areas of the rat brain. *Brain Res.*, 403:403-408.
- GALLYAS F., GORCS T., MERCHENTHALER I. 1982. High-grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 30:183- 184.
- GAUDREAU P., QUIRION R., ST-PIERRE S., PERT C.B. 1983. Characterization and visualisation of cholecystokinin receptors in rat brain using (3H)pentagastrin. *Peptides*, 4:7556762.
- GAUDREAU P., ST-PIERRE S., PERT C.B., QUIRION R. 1985. Cholecystokinin receptors in mammalian brain: a comparative characterization and visualisation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:198-219.
- GIBBS J., YOUNG R.C., SMITH G.P. 1973. Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature*, 245:323-325.

- GILLES C., LOTSTRA F., VANDERHAEGHEN J.J. 1983. CCK nerve terminals in the rat striatal and limbic areas originate partly in the brain stem and partly in telencephalic structures. *Life Sci.*, 32:1683-1690.
- GOLDMAN S.A., MONAHAN J.W., SCHNEIDER B.S. 1985. The regional and subcellular development of cholecystokinin immunoreactivity in vertebrate brain. *Developmental Brain Res.*, 22:237-246.
- GOLTERMAN N.R. 1985. The biosynthesis of cholecystokinin in neural tissue. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:76-86.
- GOLTERMAN N.R., REHFELD J.F., ROIGAARD-PETERSEN H. 1980a. In vivo biosynthesis of cholecystokinin in rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 255:6181-6185.
- GOLTERMAN N.R., REHFELD J.F., ROIGAARD-PETERSEN H. 1980b. Concentration and in vivo synthesis of cholecystokinin in subcortical regions of the rat brain. *J. Neurochem.*, 35:479-483.
- GOLTERMAN N.R., STENGAARD-PEDERSEN K., REHFELD J.F., CHRISTENSEN N.J. 1981. Newly synthesized cholecystokinin in subcellular fractions of the rat brain. *J. Neurochem.*, 36:959-965.
- GRAHAM R.C., KARNOVSKY M.J. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14:291-303.
- GRAY T.S., MORLEY J.E. 1986. Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system - Mini - review. *Life Sci.*, 38:389-401.
- GREENWOOD R.S., GODAR S.E., REAVES T.A., HAYWARD J. 1981. Cholecystokinin in hippocampal pathways. *J. Comp. Neurol.*, 203:335-350.
- GUBLER V., CHUA A.O., HOFFMAN B.J., COLLIER K.J., ENG J. 1984. Cloned cDNA to cholecystokinin mRNA predicts an identical preprocholecystokinin in pig brain and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:4307-4310.
- GUBLER V., MONOHAN J., LOMEDICO P.T., BHATT R., COLLIER K.J., HOFFMAN B.J., BOHLEN P., ESCH F., LING N., ZEYIN F., BRAZEAU P., POONIAN M.S., GAE P.L. 1983. Cloning and sequence analysis of cDNA for the precursor of human growth hormone-releasing factor, somatocrinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80:4311-4314.
- GUILLEMIN R., BRAZEAU P., BOHLEN P., ESCH F., LING N., WEHREBERG W.B. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, 218:585-587.
- GULBEKIAN S., WHARTON J., HACKER G.W., VARDELL I.M., BLOOM S.R., POLAK J.M. 1985. Co-localization of neuropeptide tyrosine (NPY) and its C-terminal flanking peptide (C-PON). *Peptides*, 6:1237-1243.
- GYSLING K., BEINFELD M.C., 1987. The regulation of cholecystokinin release from rat caudatoputamen in vitro. *Brain Res.*, 407:110-116.
- HABER S.N., ELDE R. 1981. Correlation between met-enkephalin and substance P immunoreactivity in the primate globus pallidus. *Neuroscience*, 6:1291-1297.
- HABER S.N., NAUTA W.J.H. 1983. Ramifications of the globus pallidus in the rat as indicated by patterns of immunohistochemistry. *Neuroscience*, 9:245-260.
- HABER S.N., WATSON S.J. 1985. The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. *Neuroscience*, 14:1011-1024.

- HALASZ B., PUPP L., UHLARIK S. 1962. Hypophysiotropic area in the hypothalamus. *J. Endocr.* 25:147-154.
- HALL E., GENESER-JENSEN F.A. 1971. Distribution of acetylcholinesterase and monoamine oxidase in the amygdala of the guinea-pig. *Z. Zellforsch.*, 120:204-221.
- HARFSTRAND A., ENEROTH P., AGNATI L., FUXE K. 1987. Further studies on the effects of central administration functions in the male rat: relationship to hypothalamic catecholamines. *Regul. Pept.*, 17:167-179.
- HARFSTRAND A., FUXE K., AGNATI L.F., ENEROTH P., ZINI I., ZOLI M., ANDERSSON K., VON EULER G. 1986. Studies on neuropeptide Y-catecholamine interactions in the hypothalamus and in the forebrain of the male rat. Relationship to neuroendocrine function. *Neurochem. Int.*, 8:355-376.
- HARPER A.A., RAPER H.S. 1943. Pancreozymin a stimulant of the secretion of pancreatic enzyme in extracts of the small intestine. *J. Physiol.*, 102:115-125.
- HARRIS G.W. 1972. Humours and hormones. *J. Endocr.*, 53:i-xxiii.
- HASHIMOTO R., KIMURA F. 1986. Inhibition of gonadotropin secretion induced by cholecystokinin implants in the medial preoptic area by the dopamine receptor blocker, pimozide, in the rat. *Neuroendocrinology*, 42:32-37.
- HENDRY S.H.C., JONES E.G., BEINFELD M.C. 1983. Cholecystokinin-immunoreactive neurons in rat and monkey cerebral cortex make symmetric synapses and have intimate associations with blood vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2400-2404.
- HENDRY S.H.C., JONES E.G., DeFELIPE J., SCHMECHEL D., BRANDON C., EMSON P.C. 1984. Neuropeptides containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *P.N.A.S.*, 81:6526-6530.
- HESS A. 1955. The nuclear topography and architectonics of the thalamus of the guinea pig. *J. Comp. Neurol.*, 103:385-420.
- HISANO S., DAIKOKU S., YANAIHARA N., SHIBASAKI T. 1986. Intragranular colocalization of CRF and Met-Enk-8 in nerve terminals of the rat median eminence. *Brain Res.*, 370:321-326.
- HOFFMAN G.E., PHELPS C.J., KHACHATURIAN H., SLADEK J.R., Jr. Neuroendocrine projections to the median eminence. *Current Topics in Neuroendocrinology*, Vol. 7:161-196.
- HOKFELT T., ELDER R., FUXE K., JOHANSSON O., LJUNGDAHL A., GOLDSTEIN M., LUFT R., EFFENDIC S., NILSSON G., TERENIUS L., GANTEN D., JEFFCOATE S.L., REHFELD J., SAID S., PEREZ de la MORA M., POSSANI L., TAPIA R., TERAN L., PALACIOS R. 1978. Aminergic and peptidergic pathways in the central nervous system with special reference to the hypothalamus. "The Hypothalamus", pp 69-135, S. Reichlin, R.J. Baldessarini et J.B. Martin, Eds, Raven Press, N.Y.
- HOKFELT T., ELDE R., JOHANSSON O., TERENIUS L., STEIN L. 1977a. The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.*, 5:25-31.
- HOKFELT T., ELFVIN L.G., ELDE R., SCHULTZBERG M., GOLDSTEIN M., LUFT R. 1977b. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:3587-3591.
- HOKFELT T., EVERITT B.J., MEISTER B., MELANDER T., SCHALLING M., JOHANSSON O., LUNDBERG J.M., HULTING A.-L., WERNER S., CUELLO C., HEMMINGS H., OUMET C., WALASS I., GREENGARD P., GOLDSTEIN M. 1986a. Neurons with multiple messengers with special reference to neuroendocrine systems. *Recent Prog. Horm. Res.*, 42:1-70.
- HOKFELT T., EVERITT B.J., THODORSSON-NORHEIM E., GOLDSTEIN M. 1984a. Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.*, 222:543-559.

- HOKFELT T., FAHRENKRUG J., TATEMOTO K., MUTT V., WERNER S., HULTING A.-L., TERENIUS L., CHANG K.J. 1983. The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:895-898.
- HOKFELT T., HOLET V., STAINES W., MEISTER B., MELANDER T., SCHALLING M., SCHULTZBERG M., FREEDMAN J., BJORKLUND H., OLSON L., LINDH B., ELFVIN L.-G., LUNDBERG J.M., LINDGREN J.-A., SAMUELSON B., PERNOW B., TERENIUS L., POST C., EVERITT B., GOLDSTEIN M. 1986b. Coexistence of neuronal messengers and overview. *Prog. Brain Res.*, 68:33-70.
- HOKFELT T., JOHANSSON O., GOLDSTEIN M. 1984. Chemical anatomy of the brain. *Science*, 225:1326-1334.
- HOKFELT T., JOHANSSON O., LJUNGDAHL A., LUNDBERG J.M., SCHULTZBERG M. 1980c. Peptidergic neurons. *Nature*, Vol. 284 pp 515-521.
- HOKFELT T., REHFELD J.F., SKIRBOLL L., IVEMARK B., GOLDSTEIN M., MARKEY K. 1980a. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurons. *Nature*, 285:476-478.
- HOKFELT T., SKIRBOLL L., EVERITT B., MEISTER B., BROWNSTEIN M., JACOBS T., FADEN A., KUGA S., GOLDSTEIN M., MARKSTEIN R., DOCKRAY G.J. and REHFELD J.F. 1985. Distribution of cholecystokinin-like immunoreactivity in the nervous system. Co-existence with classical neurotransmitters and other neuropeptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:255-274.
- HOKFELT T., SKIRBOLL L., REHFELD J.F., GOLDSTEIN M., MARKEY K., DANN O. 1980b. A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting limbic areas contains a cholecystokinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry acombined with retrograde tracing. *Neuroscience*, 5:2093-2124.
- HOLMQUIST A.L., DOCKRAY G.J., ROSENQUIST G.L. and WALSH J.H. 1979. Immunochemical characterization of cholecystokinin like peptides in Lampey gut and brain. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 37:474-481.
- HOMMER D.W., STONER G., CRAWLEY J.N., PAUL S.M. and SKIRBOLL L.R. 1986. Cholecystokinin-dopamine coexistence: electrophysiological actions corresponding to cholecystokinin receptor subtype. *J. Neurosci.*, 6:3039-3043.
- HUNT S.P., EMSON P.C., GILBERT R., GOLDSTEIN M., KIMMEL J.R. 1981. Presence of avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in catecholamine and methionine-enkephelin-containing neurons within the central nervous system. *Neurosci. Lett.*, 21:125-130.
- IBATA Y., FUKUI K., OKAMURA H., KAWAKAMI T., TANAKA M., OBATA H.L., TSUTO T., TERUBAYASHI H., YANAIHARA C., YANAIHARA N. 1983. Coexistence of dopamine and neurotensin in hypothalamic arcuate and periventricular neurons. *Brain Res.*, 269:177-179.
- IBATA Y., OKAMURA H., MAKINO S., KAWAKAMI F., MORIMOTO N., CHIHARA K. 1986. Light and electron microscopic immunocytochemistry of GRF-like immunoreactive neurons and terminals in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence. *Brain Res.*, 370:136-143.
- IBATA Y., WATANABE K., KINOSHITA H., KUBO S., SANO Y., SAKURA N., YANAIHARA C., YANAIHARA N. 1980. Dopamine and β -endorphin are contained in different neurons of the arcuate nucleus of hypothalamus as revealed by combined fluorescence histochemistry and immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.*, 17:185-189.
- IMAKI T., SHIBASAKI T., HOTTA M., MASUDA A., DEMURA H., SHIZUME K., LING N. 1985. The satiety effect of growth hormone-releasing factor in rats. *Brain Res.*, 3040:186-188.

- INAGAKI S., SHIOTANI Y., YAMANO M., SHIOSAKA S., TAKAGI H., TATEISHI K., HASHIMURA E., HAMAOKA T. and TOHYAMA M. 1984. Distribution, origin, and fine structures of cholecystokinin-8-like immunoreactive terminals in the nucleus ventromedialis hypothalami of the rat. *J. Neurosci.*, 4:1289-1299.
- INOBUCHI A., TOMIDA Y., YANAIHARA C., YUI R., OOMURA Y., KUMURA H., HASE T., MATSUMOTO T., YANAIHARA N. 1986. Glucagon-related peptides in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 246:71-75.
- INNIS R.B., CORREA F.M., UHL G.R., SCHNEIDER B. and SNYDER S.H. 1979. Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity: histochemical localization in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 521-525.
- ISHIKAWA K., KATAKAMI H., JANSSON J.O., FROHMAN L.A. 1986. Ontogenesis of growth hormone-releasing hormone neurons in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 43:537-542.
- ITOH S. and KATSUURA A.G. 1979. Suppressive effect of cholecystokinin and its related peptides on B-endorphin-induced catalysis in rats. *European J. Pharmac.*, 74:381-384.
- IVERSEN L.L. 1984 Amino acids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system? *Proc. R. Soc. Lond.*, B 221:245-260.
- IVY A.C. 1928. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.*, 86:599-613.
- IVY C.A. and OLBERG E. 1928. Hormone mechanism for gallbladder contraction. *Am. J. Physiol.*, 85:381-383.
- JACOBOWITZ D.M., O'DONOHUE T.L. 1978. -melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:6300-6304.
- JACOBOWITZ D.M., OLSCHOWKA J.A. 1982a. Coexistence of bovine pancreatic polypeptide-like immunoreactivity and catecholamine in neurons of the ventral aminergic pathway of the rat brain. *Brain Res. Bull.*, 9:391-406.
- JACOBOWITZ D.M., OLSCHOWKA J.A. 1982b. Bovine pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in brain and peripheral nervous system: coexistence with catecholaminergic nerves. *Peptides*, 3:569-590.
- JACOBOWITZ D.M., SCHULTE H., CHROUSOS G.P., LORIAUX D.L. 1983. Localization of GRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Peptides*, 4:521-524.
- JANSEN J.B.M.J. and LAMERS C.B.H.W. 1983. Immunochemical evidence of cholecystokinin-39 in porcine brain. *Life Sci.*, 32:911-913.
- JOHANSSON O., HOKFELT T., ELDE R.P. 1984. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*, 2:265-339.
- JOHNSON T.N. 1957. Studies on the brain of the guinea pig. I. The nuclear pattern of certain basal telencephalic centres. *J. Comp. Neurol.*, 107:353-378.
- JOSEPH S.A. 1980. Immunoreactive adrenocorticotropin in rat brain: a neuroanatomical study using antiserum generated against synthetic ACTH 1-39. *Am. J. Anat.*, 158:533-548.
- JU G., MELANDER T., ECCATELI S., HOKFELT T. and FREY P. 1987. Immunohistochemical evidence for a spinothalamic pathway co-containing cholecystokinin and galanin-like immunoreactivities in the rat. *Neuroscience*, 20:439-456.
- KAWANO H., DAIKOKU S., SAITO S. 1982. Immunohistochemical studies of intrahypothalamic somatostatin-containing neurons in rat. *Brain Res.*, 242:227-232.

- KAWATA M., NAKAO K., MORII N., KISO Y., YAMASHITA H., IMURA H., SANO Y. 1985. Atrial natriuretic polypeptide : topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neuroscience*, 16:521-546.
- KELLY J.S. and BROOKS P.A. 1984. A review of the electrophysiological evidence for a neurotransmitter role of cholecystokinin. *Cholecystokinin in the Nervous System, Current Developments in Neuropeptide Research* (J. de Belleruche et G.J. Dockray, Eds) pp 12-20. Horwood, Chichester, Sussex.
- KERKERIAN L., GUY J., LEFEVRE G., PELLETIER G. 1985. Effect of neuropeptide Y (NPY) on the release of anterior pituitary hormones in the rat. *Peptides*, 6:1201-1204.
- KHACHATURIAN H., LEWIS M.E., TSOU K., WATSON S. 1985. β -endorphin, α -MSH, ACTH and related peptides. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I*. pp 216-272. A.Björklund et T. Hökfelt, Eds. Elsevier.
- KHACHATURIAN H., LEWIS M.E., WATSON S.J. 1983. Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 220:310-320.
- KIMMEL J.R., HAYDEN L.J., POLLOCK H.G. 1975. Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem.*, 250:9369-9376.
- KIMURA F., HASHIMOTO R. and KAWAKAMI M. 1983. The stimulatory effect of cholecystokinin implanted in the medial preoptic area on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized estrogen-primet rat. *Endocrinol. Japon.*, 30:305-309.
- KISS J.Z. 1985. Anatomical studies of cholecystokinin in neurons and pathways involved in neuroendocrine regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:144-151.
- KISS J.Z., MEZEY E., SKIRBOLL L. 1984b. Corticotropin-releasing-factor- immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus became vasopressine positive after adrenalectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:1854-1858.
- KISS J.Z., WILLIAMS T.H., PALKOVITS M. 1984a. Distribution and projections of cholecystokinin-immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 227:173-181.
- KIYAMA H., SHIOSAKA S., TAKAMI K., TATEISHI K., HASHIMURA E., HAMAOKA T., TOHYAMA M., 1984. CCK pathways from supramammillary region to the nucleus anterior ventralis thalami of the young rats. *Peptides*, 5:889-893.
- KNIGGE K.M., JOSEPH S.A. 1981. Relationship of the central ACTH-immunoreactive opiocortin system to the median eminence and the pituitary gland of the rat. *Cell Tissue Res.*, 215:333-340.
- KNIGGE K.M., JOSEPH S.A., NOCTON J. 1981. Topography of the ACTH-immunoreactive neurons in the basal hypothalamus of the rat brain. *Brain Res.*, 216:333-341.
- KOHLER C., CHAN-PALAY V. 1982. The distribution of cholecystokinin immunoreactive neurons and nerve terminals in the retrohippocampal region in the rat and the guinea-pig. *J. Comp. Neurol.*, 210:136-146.
- KOSAKA T., KOSAKA K., TATEISHI K., HAMAOKA Y., NOBORU U., WU J.Y., HAMA K. 1985. GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 239:420-430.
- KOW L.M., PFAFF D.W. 1986. CCK-8 stimulation of ventromedial hypothalamic neurons in vitro : a feeding-relevant event? *Peptides*, 7:473-479.

- KREAM R.M., SCHOENFELD T.A., MANCUSO R., CLANCY A.N., EL-BERMANI W., MACRIDES F. 1985. Precursor forms of substance P (SP) in nervous tissue : detection with antisera to SP, SP-Gly, and SP-Gly-Lys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4832-4836.
- KRETTEK J.E., PRICE J.L. 1977. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J. Comp. Neurol., 171:157-192.
- KULKOSY P.J., BRECKENRIDGE C., KRINSKY R., WOODS S.C. 1976. Satiety elicited by the C-terminal octapeptide of cholecystokinin-pancreozymin in normal and VMH-lesioned rats. Behav. Biol., 18:227-234.
- LANE R.F., BLAHA C.D., PHILLIPS A. 1986. In vivo electrochemical analysis of cholecystokinin-induced inhibition of dopamine release in the nucleus accumbens. Brain Res., 397:200-204.
- LARSSON L.I., REHFELD J.F. 1977. Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. Nature, 269:335-338.
- LARSSON L.I., REHFELD J.F. 1979. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. Brain Res., 165:201-218.
- LARSSON L.I., REHFELD J.F. 1981. Pituitary gastrins occur in corticotrophs and melanotrophs. Science, 213:768-770.
- LECHAN R.M., NESTLER J.L., JACOBSON S. 1982. The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. Brain Res., 245:1-5.
- LECHAN R.M., LIN H.D., LING N.D., JACKSON I.M.D., JACOBSON S., REICHLIN S. 1984. Distribution of immunoreactive growth hormone releasing factor (1-44) NH₂ in the tuberoinfundibular system of the rhesus monkey. Brain Res., 309:55-61.
- LEGER L., CHARNAY Y., DANGER J.-M., VAUDRY H., PELLETIER G., DUBOIS M.-P., JOUVET M. 1987. Mapping of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the feline hypothalamus and hypophysis. J. Comp. Neurol., 255:283-292.
- LING N., ESCH F., BOHLEN P., BRAZEAU P., WEHRENBURG W.B. 1984. Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatostatin : growth hormone-releasing factor. Proc. Natl. Acad. Sci., 81:4302-4306.
- LLOYD R.D., BEINFELD M.C. 1985. The subcellular distribution of peptides immunoreactive for the amino-terminal of pro-cholecystokinin in rat brain. Regul. Pept., 12:59-66.
- LOOPUIJT L.D., VAN DER KOYD D. 1985. Simultaneous ultrastructural localization of cholecystokinin- and tyrosine hydroxylase like immunoreactivity in nerve fibers of the rat nucleus accumbens. Neurosci. Lett., 56:329-334.
- LOREN I., ALUMETS J., HAKANSON R., SUNDLER F. 1979a. Distribution of gastrin- and CCK-like peptides in rat brain. Histochemistry, 59:249-257.
- LOREN I., ALUMETS J., HAKANSON R., SUNDLER F. 1979b. Immunoreactive pancreatic polypeptide (PP) occurs in the central and peripheral nervous system : preliminary immunocytochemical observations. Cell Tissue Res., 200:179-186.
- LOTSTRA F., VANDERHAEGHEN J.J., VANDESANDE F., GILLIES C. 1980. Relationship of gastrin family peptides with OX, ACTH and -MSH cells. A study in hypophysis and hypothalamus using immunohistochemistry, radioimmunoassays and chromatography. Neurosci. Lett., suppl. 5, Abstracts of the 4th European Neuroscience Meeting Brighton UK, 16-19 Sept.

- LUND T., GEURTS van KESSEL A.H.M., HAUN S., DIXON J.E. 1986. The genes for human gastrin and cholecystokinin are located on different chromosomes. *Hum. Gent.*, 73:77-80.
- LUNDBERG J.M., HOKFELT T. 1983. Co-existence of peptides and classical neurotransmitters. *Trends Neurosci.*, 6:325-333.
- LUPARELLO I.J., STEIN M., PARK C.D. 1964. A stereotaxic atlas of the hypothalamus of the guinea-pig. *J. Comp. Neurol.*, 122:201-217.
- MacCANN S.M. 1980. Control of anterior pituitary hormone release by brain peptides. *Neuroendocrinology*, 31:355-363.
- MacDONALD J.K., LUMPKIN M.D., SAMSON W.K., McCANN S.M. 1985. Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:561-564.
- MacDONALD J.K., PARNAVELAS J.G., KARAMANLIDIS A.N., ROSENQUIST G., BRECHA N. 1982. The morphology and distribution of peptide-containing neurons in the adult and developing visual cortex of the rat. III. Cholecystokinin. *J. Neurocytol.*, 11:881-895.
- MAKARA G.B., HODACS L. 1975. Rostral projections from the hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Res.*, 84:23-29.
- MAKARA G.B., PALKOVITS M., ANTONI F.A., KISS J.Z. 1983. Topography of the somatostatin-immunoreactive fibers to the stalk-median eminence of the rat. *Neuroendocrinology*, 37:1-8.
- MALARKEY W.B., O'DORISIO T.M., KENNEDY M., CATALAND S. 1981. The influence of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin on prolactin release in rat and human monolayer culture. *Life Sci.*, 28:2489-2495.
- MALESCI A., STRAUS E., YALOW R.S. 1980. Cholecystokinin converting enzymes in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:597-599.
- MANTYH C.R., MANTYH P.W. 1985. Differential localization of cholecystokinin-8 binding sites in the rat vs. the guinea pig brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 113:137-139.
- MARKSTEIN R., HOKFELT T. 1984. Effect of cholecystokinin octapeptide on dopamine release from slices of cat caudate nucleus. *J. Neurosci.*, 4:570-575.
- MARLEY P.D., LIGHTMAN S.L., FORSLING M.L., TODD K., GOEDERT M., REHFELD J.F., EMSON P.C. 1984a. Localization and actions of cholecystokinin in the rat pituitary neurointermediate lobe. *Endocrinology*, 114:1902-1911.
- MARLEY P.D., REHFELD J.F., EMSON P.C. 1984b. Distribution and chromatographic characterization of gastrin and cholecystokinin in the rat central nervous system. *J. Neurochem.*, 42:1523-1535.
- MARTIN J.R., BEINFELD M.C., WANG R.Y. 1986. Modulation of cholecystokinin release from posterior nucleus accumbens by D-2 dopamine receptor. *Brain Res.*, 397:253-258.
- MARTIN R., GEIS R., HOLL R., SCHAFER M., VOIGT K.H. 1983. Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophysis : immunoreactive methionine⁵-enkephalin-, leucine⁵-enkephalin and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience*, 8:213-227.
- MATSUMURA M., YAMANOI S., MORI H., SAITO S. 1984. In vivo and in vitro effects of cholecystokinin octapeptide on the release of growth hormone in rats. *Horm. Metabol. Res.*, 16:626-630.
- MATSUMURA M., YAMANOI A., YAMAMOTO S., SAITO S. 1983. In vivo and in vitro effects of cholecystokinin octapeptide on the release of β -endorphin-like immunoreactivity. *Neuroendocrinology*, 36:493-448.

- MAYO K.E., CERELLI G.M., LEBO R.V., BRUCE B.D., ROSENFELD M.G., EVANS R.M. 1985a. Gene encoding human growth hormone releasing factor precursor : structure, sequence and chromosomal assignment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:63-67.
- MAYO K.E., CERELLI G.M., ROSENFELD M.G., EVANS R.M. 1985b. Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. Nature, 314:464-467.
- MAYO K.E., VALE W., RIVIER J., ROSENFELD M.G., EVANS R.M. 1983. Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. Nature, 306:86-88.
- MEISTER B., HOKFELT T., VALE W.W., SAWCHENKO P.E., SWANSON L., GOLDSTEIN M. 1986. Coexistence of tyrosine hydroxylase and growth hormone-releasing factor in a subpopulation of tuberoinfundibular neurons of the rat. Neuroendocrinology, 42:237-247.
- MERCHANTHALER I., ARIMURA A. 1985. Effect of hypophysectomy on immunocytochemically demonstrated growth hormone releasing factor (GHRF) in the rat brain. Peptides, 6:865-867.
- MERCHANTHALER I., CSONTOS C., KALLO I., ARIMURA A. 1986a. The hypothalamo-infundibular growth hormone-releasing hormone (GH-RH) system of the rat. Brain Res., 378:297-302.
- MERCHANTHALER I., MADERDRUT J.L., ALTSCHULER R.A., PETRUSZ P. 1986b. Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. Neuroscience, 17:325-348.
- MERCHANTHALER I., THOMAS C.R., ARIMURA A. 1984a. Immunocytochemical localization of growth hormone releasing factor (GHRF)-containing structures in the rat brain using anti-rat GHRF serum. Peptides, 5:1071-1075.
- MERCHANTHALER I., VIGH S., SCHALLY A.V., PETRUSZ P. 1984b. Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. Endocrinology, 114:1082-1085.
- MEYER D.K., ANHUT H., NUTTO D., BEINFELD M.C., KNEPEL W. 1982c. Cholecystokinin releases β -endorphin from the anterior pituitary gland. Neuropeptides, 2:371-375.
- MEYER D.K., BEINFELD M.C., BROWNSTEIN M.J. 1982b. Corpus callosum lesions increase cholecystokinin concentrations in cortical areas with homeotopic connections. Brain Res., 240:151-153.
- MEYER D.K., BEINFELD M.C., OERTEL W.H., BROWNSTEIN M.J. 1982a. Origin of cholecystokinin-containing fibers in the rat caudatoputamen. Science, 215:187-188.
- MEYER D.K., KRAUSS J. 1983. Dopamine modulates cholecystokinin release in neostriatum. Nature, 30, 338-340.
- MEZEY E., KISS J.Z., MUELLER G.P., ESKAY R., O'DONOHUE T.L., PALKOVITS M. 1985. Distribution of the pro-opiomelanocortin derived peptides, adrenocorticotrope hormone, β -melanocyte-stimulating hormone and β -endorphin (ACTH, β -MSH, β -END) in the rat hypothalamus. Brain Res., 328:341-347.
- MEZEY E., REISINE T.D., SKIRBOLL L., BEINFELD M., KISS J.Z. 1986. Role of cholecystokinin in corticotropin release : coexistence with vasopressin and corticotropin-releasing factor in cells of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3510-3512.
- MICELI M.O., VAN DER KOOP D., POST C.A., DELLA-FERA M.A., BAILE C.A. 1987. Differential distributions of cholecystokinin in hamster and rat forebrain. Brain Res., 402:381-390.
- MICEVYCH P.E., PARK S.S., AKESSON T.R., ELDE R. 1987. Distribution of cholecystokinin immunoreactive cell bodies in the male and female rat. I. Hypothalamus. J. Comp. Neurol., 255:124-136.

- MINTH C.D., BLOOM S.R., POLAK J.M., DIXON J.E. 1984. Cloning characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4577-4581.
- MOORE R.Y., GUSTAFSON E.L., CARD J.P. 1984. Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitation peptide and neuropeptide Y. *Cell Tissue Res.*, 236:41-46.
- MORLEY J.E. 1980. The neuroendocrine control of appetite : the role of the endogenous opiates, cholecystokinin, TRH, gamma-amino-butyric-acid and the diazepam receptor. *Life Sci.*, 27:355- 368.
- MORLEY J.E. 1982. The ascent of cholecystokinin (CCK) from gut to brain. *Life Sci.*, 30:479-493.
- MORLEY J.E., MELMED S., BRIGGS J., CARLSON H.E., HERSHMAN J.M., SOLOMON T.E., LAMERS C., DAMASSA D.A. 1979. Cholecystokinin octapeptide releases growth hormone from the pituitary in vitro. *Life Sci.*, 25:1201-1206.
- MULLER J.E., STRAUS E., YALOW R.S. 1977. Cholecystokinin and its COOH- terminal octapeptide in the pig brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7:3035-3037.
- MUTT V. 1979. Some contributions to the chemistry of the gastrointestinal hormones. *Federation Proceedings*, 38:2309-2314.
- MUTT V., JORPES J.E. 1968. Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. *European J. Biochem.*, 6,156-162.
- MUTT V., JORPES H.E. 1971. Hormonal polypeptides of the upper intestine. *Biochem. J.*, 125:57- 58.
- NAKANE P.K. 1968. Simultaneous localization of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase-labeled antibody method : a study on pituitary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 16:557-560.
- NAKAGAWA Y., SHIOSAKA S., EMSON P.C., TOHYAMA M. 1985. Distribution of neuropeptide Y in the forebrain and diencephalon : an immunohistochemical analysis. *Brain Res.*, 361:52-60.
- NOTENBOOM C.D., GARAUD J.C., DOERR-SCHOTT J., TERLOU M. 1981. Localization by immunofluorescence of a gastrin-like substance in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 214:247- 255.
- O'DONOHUE T.L., CHRONWALL B.M., PRUSS R.M., MEZEY E., KISS J.Z., EIDEN L.E., MASSARI V.J., TESSEL R.E., PICKEL V.M., DI MAGGIO D.A., HOTCHKISS A.J., CROWLEY W.R., ZUKOWSKA-GROJEC Z. 1985. Neuropeptide Y and peptide YY neuronal and endocrine systems. *Peptides*, 6:755-768.
- OKADA S. 1914. *J. Physiol.*, 49:457.
- OKAMURA H., MURAKAMI S., CHIHARA K., NAGATSU I., IBATA Y. 1985. Coexistence of growth hormone releasing factor-like and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, 41:177-179.
- OLSCHOWKA J.A., O'DONOHUE T.L., JACOBOWITZ D.M. 1981. The distribution of bovine pancreatic polypeptide-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides*, 2:309-331.
- ONDETTI M.A., RUBIN B., ENGEL S.L., PLUSCEC J., SHEEHAN J.T. 1970. Cholecystokinin-pancreozymin. Recent developments. *Am. J. Digest. Dis.*, 15:149-156.
- OOMURA Y., OTITA M., KITA H., ISHIBASHI S., OKAJIMA T. 1978. Hypothalamic neurone response to glucose, phlorizins and cholecystokinin. In "Iontophoresis and transmitters mechanisms in the mammalian central nervous system", (Rual R.W. et Kelly J.S., Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp 120- 123.

- OSBORNE N.V., NICHOLAS D.A., CUELLO A.C., DOCKRAY G.J. 1981. Localization of cholecystokinin immunoreactivity in amacrine cells of the retina. *Neurosci. Lett.*, 26:31-35.
- PALKOVITS M. 1986. Afferents onto neuroendocrine cells. *Current Topics in Neuroendocrinology, Morphology of Hypothalamus and its Connections*, Vol. 7, pp 197-222. D. Ganten et D. Pfaff, Eds. Springer-Verlag, Berlin.
- PALKOVITS M., KISS J.Z., BEINFELD M.C., BROWNSTEIN M.J. 1984. Cholecystokinin in the hypothalamo-hypophyseal system. *Brain Res.*, 299:186-189.
- PALKOVITS M., KISS J.Z., BEINFELD M.C., WILLIAMS T.H. 1982. Cholecystokinin in the nucleus of the solitary tract of the rat : evidence for its vagal origin. *Brain Res.*, 252:386-390.
- PANULA P., YANG H.-Y.T., COSTA E. 1984. Comparative distribution of bombesin/GRP- and substa, ce-P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 224:606-617.
- PAXINOS G., WATSON C. 1982. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press.
- PEARSE A.G.E., TAKOR TAKOR T. 1979. Embryology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. *Federation Proceedings*, 38:2288-2294.
- PELLETIER G., DESY L., COTE J., LEFEVRE G., VAUDRY H. 1986. Light-microscopic immunocytochemical localization of growth-hormone-releasing factor in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 245:461-463.
- PELLETIER G., DESY L., KERKERIAN L., COTE J. 1984a. Immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 238:203-205.
- PELLETIER G., GUY J., ALLEN Y.S., POLAK J.M. 1984b. Electron microscope immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the rat brain. *Neuropeptides*, 4:319-324.
- PETERS A., MILLER M., KIMERER L.M. 1983. Cholecystokinin-like immunoreactive neurons in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 8:431-448.
- PETRUSZ P., MERCHENTHALER I., MADERDRUT J.L. 1985. Distribution of enkephalin-containing neurons in the central nervous system. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 4 : GABA and neuropeptides in the CNS, Part I pp 273-334. A. Björklund et T. Hökfelt, Eds. Elsevier.
- PINGET M., STRAUS E., YALOW R.S. 1978. Localization of cholecystokinin-like immunoreactivity in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:6324-6326.
- PINGET M., STRAUS E., YALOW R.S. 1979. Release of cholecystokinin peptides from a synaptosome-enriched fraction of rat cerebral cortex. *Life Sci.*, 25:339-342.
- PLOTSKY P., SAWCHENKO P.E. 1987. Hypophysial-portal plasma levels, median eminence content, and immunohistochemical staining of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. *Endocrinology*, 120:1361-1369.
- PLOTSKY P., VALE W. 1985. Patterns of growth hormone releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*, 230:461-463.
- PORTER J.R., SANDER L.D. 1981. The effect of cholecystokinin octapeptide on pituitary adrenal hormone secretion. *Regul. Pept.*, 2:245-252.
- POULAIN P. 1974. L'hypothalamus et le septum du Cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exp.*, 63:37-50.

- POULAIN P., CARETTE B. 1986. Effects of GRF on paraventricular neurons in slices of guinea-pig hypothalamus. *Brain Res.*, 371:355-359.
- RAPISARDA C., BACCHELLI B. 1977. The brain of the guinea-pig in stereotaxic coordinates. *Archivio di Scienze Biologiche*, Vol 61, N I-4, Cappelli Editore, Bologna.
- REEVE J.R., DIMALINE R., SHIVELY J.D., HAWKE D., CHEW P., WALSH J.H. 1981. Unique aminoterminal structure of rat little gastrin. *Peptides*, 2:453-458.
- REEVE J.R.Jr., EYSSELEIN V.E., WALSH J.H., BEN-AVRAM C.M., SHIVELY J.E. 1986. New molecular forms of cholecystokinin. *J. Biol. Chem.*, 261:16392-16397.
- REHFELD J.F. 1978a. Immunochemical studies on cholecystokinin: 1. "Development of sequence-specific radioimmunoassays for porcine triacontatriapeptide cholecystokinin". *J. Biol. Chem.*, 253:4016-4021.
- REHFELD J.F. 1978b. Immunochemical studies on cholecystokinin: 2. "Distribution and molecular heterogeneity in the CNS and small intestine of man and hog". *J. Biol. Chem.*, 253:4022-4030.
- REHFELD J.F. 1978c. Localization of gastrins to neuro- and adenohypophysis. *Nature*, 271:771-773.
- REHFELD J.F. 1981a. Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. *Am. J. Physiol.*, 240:255-266.
- REHFELD J.F. 1981b. General molecular aspects of the gastrin cholecystokinin system. "Hormones and Cell Regulation", INSERM European Symposium. J.E. DUMONT et J. NUNEZ ed. Elsevier/North Holland Biochemical Press.
- REHFELD J.F. 1980. Cholecystokinin. *Trends in Neurosci.*, 65-67.
- REHFELD J.F. 1985. Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters? *J. Neurochem.*, 44:1-10.
- REHFELD J.F. 1986. Accumulation of nonamidated preprogastrin and preprocholecystokinin products in porcine pituitary corticotrophs. *J. Biol. Chem.*, 261:5841-5847.
- REHFELD J.F., GOLTERMANN N.R. 1979. Immunochemical evidence of cholecystokinin tetrapeptides in hog brain. *J. Neurochem.*, 32:1339-1341.
- REHFELD J.F., GOLTERMANN N., LARSSON L.I., EMSON P.M., LEE M.C. 1979. Gastrin and cholecystokinin in central and peripheral neurons. *Fed. Proc.*, 38:2325-2329.
- REHFELD J.F., HANSEN H.F. 1986. Characterization of preprocholecystokinin products in the porcine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.*, 261:5832-5840.
- REHFELD J.F., HANSEN H.F., LARSSON L.I., STENGAARD-PEDERSEN K., THORN N.A. 1984. Gastrin and cholecystokinin in pituitary neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1902-1905.
- REHFELD J.F., LARSSON L.I. 1981. Pituitary gastrins. Different processing in corticotrophs and melanotrophs. *J. Biol. Chem.*, 256:10426-10429.
- REHFELD J.F., LARSSON L.I., GOLTERMANN N.R., SCHWARTZ T.W., HOLST J.J., JENSEN S.I., MORLEY J.S. 1980. Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature*, 284:33-38.
- REINER A., BEINFELD M.C. 1985. Distribution of cholecystokinin-8 in the central nervous system of turtles: an immunohistochemical and biochemical study. *Brain Res. Bull.*, 15:167-181.
- RETHELYI M. 1975. Neurons in the subependymal layer of the rat median eminence. *Neuroendocrinology*, 17:330-339.

- RIVIER J., SPIESS J., THORNER M., VALE W. 1982. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature*, 300:276-278.
- ROBBERECHT P., DESCHODT-LANCKMAN M., VANDERHAEGHEN J.J. 1978. Demonstration of biological activity of brain gastrin-like peptidic material in the human : its relationships with the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:524-528.
- ROBERTS G.W., ALLEN Y., CROW T.J., POLAK J.M. 1983. Immunocytochemical localization on neuropeptides in the fornix of rat, monkey and man. *Brain Res.*, 263:151-155.
- ROBERTS G.W., WOODHAMS P.L., POLAK J.M., CROW T.J. 1982. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat : the amygdaloid complex. *Neurosci.*, 7:99-131.
- RYDER S.W., ENG J., STRAUS E., YALOW R.S. 1981. Extraction and immunochemical characterization of cholecystokinin-like peptides from pig and rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3892- 3896.
- RYDER S.W., STRAUS E., YALOW R.S. 1980. Further characterization of brain cholecystokinin converting enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3669-3672.
- SABATINO F.D., MURNANE J.M., HOFFMAN R.A., McDONALD J.K. 1987. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the hypothalamus of the adult golden hamster. *J. Comp. Neurol.*, 257:93-104.
- SAITO A., SANKARAN H., GOLDFINE I.D., WILLIAMS J.A. 1980. Cholecystokinin receptors in the brain. Characterization and distribution. *Science*, 208:1155-1156.
- SAKAMOTO N., TAKATSUJI K., SHIOSAKA S., TATEISHI K., HASHIMURA E., MIURA S., HAMAOKA T., TOHYAMA M. 1984. Cholecystokinin-8-like immunoreactivity in the pre- and post-central gyri of the human cerebral cortex. *Brain Res.*, 307:77-83.
- SANDER L.D., PORTER J.R. 1982. Influence of cholecystokinin on hypothalamic-stalk median eminence-extract stimulation of ACTH out put from isolated pituitary cells. *Life Science*, 31:1103-1110.
- SAPER C., STANDAERT D.G., CURRIE M.G., SCHWARTZ D., GELLER D.M., NEEDLEMAN P. 1985. Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain : presence in cardiovascular regulatory areas. *Science*, 227:1047-1049.
- SAUTER A., FRICK W. 1983. Determination of cholecystokinin tetrapeptide and cholecystokinin octapeptide sulfate in different rat brain region by high-pressure liquide chromatography with electrochemical detection. *Analytical Biochem.*, 133:307-313.
- SAWCHENKO P.E., SWANSON L.W., JOSEPH S.A. 1982. The distribution and cells of origin of ACTH (1-39)-stained varicosities in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Brain Res.*, 232:365-374.
- SAWCHENKO P.E., SWANSON L.V., RIVIER J., VALE W.W. 1985. The distribution of growth hormone-releasing factor (GRF) immunoreactivity in the central nervous system of the rat : an immunohistochemical study using antisera directed against rat hypothalamic GRF. *J. Comp. Neurol.*, 237:100-115.
- SAWCHENKO P.I., SWANSON L.W., VALE W.W. 1984a. Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neuro-secretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1883-1887.
- SAWCHENKO P.E., SWANSON L.M., VALE W.W. 1984b. Corticotropin-releasing factor : co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin- and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* 4:1118-1129.
- SEROOGY K.B., FALLON J.H., LOUGHLIN S.E., LESLIE F.M. 1985. Few cortical cholecystokinin-immunoreactive neurons have long projections. *Exp. Brain Res.*, 59:533-542.

- SHEEHAN M.J., de BELLEROCHE J. 1983. Facilitation of GABA release by cholecystokinin and caerulein in rat cerebral cortex. *Neuropeptides*, 3:429-434.
- SHINOMURA Y., ENG J., YALOW R.S. 1987. Chincilla "big" and "little" gastrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143:7-14.
- SIEGEL R.E., YOUNG W.S III. 1985. Detection of preprocholecystokinin and preproenkephalin A mRNAs in rat brain by hybridization histochemistry using complementary RNA probes. *Neuropeptides*, 6:573-580.
- SIMERLY R.B., GORSKI R.A., SWANSON L.W. 1986. The neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 246:343-363.
- SIMERLY R.B., SWANSON L.W. 1987. The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications for the control of gonadotropin secretion in the rat. *Brain Res.*, 400:11-34.
- SIMON-ASSMANN P.M., YAZIGI R., GREELEY G.H. Jr, RAYFORD P.L., THOMPSON J.C. 1983. Biologic and radioimmunologic activity of cholecystokinin in regions of mammalian brains. *J. Neuroscience Res.*, 10:165-173.
- SKIRBOLL L.R., GRACE A.A., HOMMER D.W., REHFELD J., GOLDSTEIN M., HOKFELT T., BUNNEY B.S. 1981. Peptide monoamine coexistence: studies of the actions of cholecystokinin-like peptide on the electrical activity of midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*, 6:211-2124.
- SKIRBOLL L., HOKFELT T., REHFELD J.F., CUELLO A.C., DOCKRAY G.J. 1982. Coexistence of substance P and cholecystokinin-like immunoreactivity in neurons of the mesencephalic periaqueductal gray. *Neurosci. Lett.*, 28:35-39.
- SKOFITSCH G., JACOBOWITZ D.M., ESKAY R.L., ZAMIR N. 1985. Distribution of atrial natriuretic factor-like immunoreactive neurons in the rat brain. *Neuroscience*, 16:917-948.
- SMITH R.M., HOWE P.R.C., OLIVER J.R., WILLOUGHBY J.O. 1984. Growth hormone releasing factor immunoreactivity in rat hypothalamus. *Neuropeptides*, 4:109-115.
- SMITH Y., PARENT A., KERKERIAN L., PELLETIER G. 1985. Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the basal forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Neurol.*, 236:71-89.
- SOFRONIEW M.V. 1979. Immunoreactive β -endorphin and ACTH in the same neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *Am. J. Anat.*, 154:283-289.
- SOMOGYI P., HODGSON A.J., SMITH D.A., NUNZI G.M., GORIO A., WU J.Y. 1984. Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin or cholecystokinin-immunoreactive material. *J. Neurosci.*, 4:2590-2603.
- SPIESS J., RIVIER J., VALE W. 1983. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature*, 303:532-535.
- STANDAERT D.G., NEEDLEMAN P., SAPER C.B. 1986. Organisation of atriopeptin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 253:315-341.
- STANLEY B.G., LEIBOWITZ S.F. 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3940-3943.

- STEARDO L., KNIGHT M., TAMMINGA C.A., BARONE P., KASK A.M., CHASE T.N. 1985. CCK-26-33 degrading activity in brain and nonneuronal tissue : a metalloendopeptidase. *J. Neurochem.*, 45:784-790.
- STEFANINI M., DE MARTINO C., ZAMBONI L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216:173-174.
- STEIGERWALT.W., WILLIAMS J.A. 1984. Binding specificity of the mouse cerebral cortex receptor for small cholecystokinin peptides. *Regul. Pept.*, 8:51-59.
- STENGAARD-PEDERSEN K., LARSSON L.I. 1981a. Comparative immunocytochemical localization of putative opioid ligands in the central nervous system. *Histochem.*, 73:89-114.
- STENGAARD-PEDERSEN K., LARSSON L.I. 1981b. Localization and opiate receptor binding of enkephalin, CCK and ACTH/ β -endorphin in the rat central nervous system. *Peptides*, 2:3-19.
- STENGAARD-PEDERSEN K., LARSSON L.I., FREDENS K., REHFELD J.F. 1984. Modulation of cholecystokinin concentrations in the rat hippocampus by chelation of heavy metals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5876-5880.
- STRAUS E., MULLER J.E., CHOI H.S., PARONETTO F., YALOW R.S. 1977. Immunohistochemical localization in rabbit brain of a peptide resembling the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin. *Proc. Natl. Sci. USA*, 74:3033-3034.
- STRAUS E., MALESCI A., YALOW R.S. 1978. Characterization of a non trypsin cholecystokinin converting enzyme in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5711-5714.
- STRAUS E., RYDER S.W., ENG J., YALOW R.S. 1981. Immunochemical studies relating to cholecystokinin in brain ang gut. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 37:447-475.
- STRAUS E., YALOW R.S. 1978. Species specificity of cholecystokinin in gut and brain of several mammalian species. *Proc. Natl. Sci. USA*, 75:486- 489.
- STUDLER J.-M. La cholécystokinine dans le système nerveux central. Co-localisation et inter-relations avec la dopamine du système méso-limbique. Thèse de Sciences, Paris VI, 1985.
- STUDLER J.M., REIBAUD M., TRAMU G., BLANC G., GLOWINSKI J., TASSIN J.P. 1984. Pharmacological study on the mixed CCK-8/DA meso-nucleus accumbens pathway : evidence for the existence of storage sites containing the two transmitters. *Brain Res.* 298:91-97.
- STUDLER J.-M., REIBAUD M., TRAMU G., BLANC G., GLOWINSKI J., TASSIN J.-P. 1985. Distinct properties of cholecystokinin-8 and mixed dopamine-cholecystokinin-8 neurons innervating the nucleus accumbens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:306-314.
- STUDLER J.M., SIMON H., CESSÉLIN F., LEGRAND J.C., GLOWINSKI J., TASSIN J.P. 1981. Biochemical investigations on the localization of the cholecystokinin octapeptide in dopaminergic neurons originating from the ventral tegmental area of the rat. *Neuropeptides*, 2:131-139.
- SUGIMOTO T., ITOH K., YASUI Y., KANEKO T., MIZUNO N. 1985. Coexistence of neuropeptides in projection neurons of the thalamus in the cat. *Brain Res.*, 347:381-384.
- SWANSON L.W. 1983. Neuropeptides- new vistas on synaptic transmitters. *Trends Neurosci.*, 6:294-295.
- TAKAGI H., MIZUTA H., MATSUDA T., INAGAKI S., TATEISHI K., HAMAOKA T. 1984. The occurrence of cholecystokinin-like immunoreactive neurons in the rat neostriatum : light and electron microscopic analysis. *Brain Res.*, 346-349.
- TAKAHASHI Y., KATO K., HAYASHIZAKI Y., WAKABAYASHI T., OHTSUKA E., MATSUKI S., IKEHARA M., MATSUBARA K. 1985. Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1931-1935.

- TANNENBAUM G.S., LING N. 1984. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology*, 115:1952-1957.
- TATEMOTO K. 1982a. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:2514-2518.
- TATEMOTO K. 1982b. Neuropeptide Y : complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5485-5489.
- TATEMOTO K., CARLQUIST M., MUTT V. 1982. Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296:659-660.
- TATEMOTO K., JORNVAL H., SIIMESMAA S., HALLDEN G., MUTT V. 1984. Isolation and characterization of cholecystokinin-58 (CCK-58) from porcine brain. *FEBS Lett.*, 174:289-293.
- TATEMOTO K., MUTT V. 1980. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature*, 285:417-418.
- THORNER M.O., VANCE M.L., EVANS W.S., BLIZZARD R.M., ROGOL A.D., HO K., LEONG D.A., BORGES J.L.C., CRONIN M.J., McLEOD R.M., KOVACS K., ASA S., HORWATH E., FROHMAN L., FURLANETTO R., KLINGENSMITH G.J., BROOK C., SMITH P., REICHLIN S., RIVIER J., VALE W. 1986. Physiological and clinical studies of GRF and GH. *Recent Prog. Horm. Res.*, 42:589-640.
- TINDAL J.S. 1965. The forebrain of the guinea pig in stereotaxic coordinates. *J. Comp. Neurol.*, 124:259-266.
- TOTTERDELL S., SMITH A.D. 1986. Cholecystokinin-immunoreactive boutons in synaptic contact with hippocampal pyramidal neurons that project to the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 19:181-182.
- TRACY J.J., GREGORY R.A. 1964. Physiological properties of series of synthetic peptides structurally related to gastrin. *Nature*, 204:935-938.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.-C., CROIX D., LEONARDELLI J. 1981. Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. *Brain Res.*, 215:235-255.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.-C., CROIX D., PILLEZ A., DUBOIS M.P. 1982. Coexistence de peptides dans des neurones du système hypothalamo-adenohypophysaire. *INSERM*, 110:37-54.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C., CROIX D., PILLEZ A., GARAUD J.C. 1984. Coexistence of hypothalamic factors with other neuropeptides. Demonstration in the median eminence of rats and guinea pigs. *Neurochem. Int.*, 6:721-730.
- TRAMU G., CROIX D., PILLEZ A. 1983. Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. *Neuroendocrinology*, 37:467-469.
- TRAMU G., BEAUVILLAIN J.C., PILLEZ A., MAZZUCA M. 1983. Présence d'une substance immunologiquement apparentée à la somatolibérine extraite d'une tumeur pancréatique humaine (hpGRF) dans des neurones de l'aire hypophysiotrope du Cobaye et du Rat. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 297:495-440.
- TRAMU G., LEONARDELLI J. 1979. Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. *Brain Res.*, 168:4576471.
- TRAMU G., LEONARDELLI J., DUBOIS M.P. 1977. Immunohistochemical evidence for an ACTH-like substance in hypothalamic LH-RH neurons. *Neurosci. lett.*, 6:305-309.

- TRAMU G., PILLEZ A. 1982. Localisation immunocytochimique des terminaisons nerveuses à corticolibérine (CRF) dans l'émence médiane du Cobaye et du Rat. C.R. Held. Seanc. Acad. Sci. Paris, 294:107-114.
- TRAMU G., PILLEZ A., LEONARDELLI J. 1978. An efficient method of antibody elution for the successive or the simultaneous location of two antigens by immunocytochemistry. J. Histochem. Cytochem., 26:322-324.
- TRANCHAND-BUNEL D., JEGOU S., DELBENDE C., TONON M.-C., PELLETIER G., VAUDRY H. 1987. La proopiomélanocortine et ses dérivés dans le système nerveux central. Médecine/Sciences, 3:128-137.
- TSURUO Y., HISANO S., DAIKOKU S. 1984a. Morphological evidence for synaptic junctions between substance P-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat. neurosci. Lett., 46:65-69.
- TSURUO Y., HISANO S., OKAMURA Y., TSUKAMOTO N., DAIKOKU S. 1984b. Hypothalamic substance P-containing neurons. Sex-dependent topographical differences and ultrastructural transformations associated with stages of the estrous cycle. Brain Res., 305:331-341.
- TSURUO Y., KAWANO H., NISHIYAMA T., HISANO S., DAIKOKU S. 1983. Substance P-like immunoreactive neurons in the tubero infundibular area of rat hypothalamus. Light and electron microscopy. Brain Res., 289:1-9.
- TSURUO Y., HISANO S., NAKANISHI J., KATOH S., DAIKOKU S. 1987. Immunohistochemical studies on the roles of substance P in the rat hypothalamus : possible implication in the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis. Neuroendocrinology, 45:389-401.
- TWERY M.J., MOSS R. 1985. Sensitivity of rat forebrain neurons to growth hormone-releasing hormone. Peptides, 6:609-613.
- TWERY M.J., MOSS R.L. 1986. Effects of human pancreatic growth hormone-releasing hormone and fragments of rat hypothalamic growth hormone-releasing hormone on the activity of rat brain neurons. Neurosci. Lett., 69:176-181.
- VACCARINO F.J., BLOOM F.E., RIVIER J., VALE W. 1985. Stimulation of food intake in rats by centrally administered hypothalamic growth hormone-releasing factor. Nature, 314:167-168.
- VANDE POL C.J., LEIDY J.W., FINGER T.E., ROBBINS R.J. 1986. Immunohistochemical localization of GRF-containing neurons in rat brain. Neuroendocrinology, 42:143-147.
- VAN DEN POL A.N., CASSIDY J.R. 1982. The hypothalamic arcuate nucleus of rat - a quantitative golgi analysis. J. Comp. Neurol., 204:65-98.
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E., ROSS G.T. 1971. A method for producing antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metab., 33:988-991.
- VANCE V.K., SCHNURE J.J., REICHLIN M. 1968. Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non steroidogenic polymers of BSA and ACTH. Dans : "Protein and polypeptide hormones" (Ed. M. MARGOULIES) Int. Congr. Ser., 161:380-384. Experta Medica Foundation. Amsterdam.
- VANDERHAEGHEN J.J. 1981. Gastrins and cholecystokinins in central nervous system and hypophysis. "Hormones and Cell Regulation", T.5:149-168. INSERM European Symposium J.E. DUMONT et J. NUNEZ, Ed. Elsevier/North Holland Biochemical Press.
- VANDERHAEGHEN J.J. 1985. Neuronal cholecystokinin. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol.4 : GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I. pp 406- 435, A. Björklund and T. Hökfelt, Eds. Elsevier Science Publishers B.V.

- VANDERHAEGHEN J.J., DE MEY J., LOTSTRA F., GILLES C. 1978. Localization of gastrin-cholecystokinin like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Acta. Neurol. Belg.*, 79:62.
- VANDERHAEGHEN J.-J., GOLDMAN S., LOTSTRA F., VAN REETH O., DESCHEPPER C., ROSSIER J., SCHIFFMAN S. 1985. Co-existence of cholecystokinin- or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 448:334-344.
- VANDERHAEGHEN J.J., LOTSTRA F., DE MEY J., GILLES C. 1980a. Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1190-1194.
- VANDERHAEGHEN J.J., LOTSTRA F., GILLES C. 1980b. Gastrin(s) and cholecystokinin(s) in central nervous system and pituitary : relationship with dopamine, oxytocin and -MSH containing cells and with limbic and nigrostriatal system. *Hormones Res.*, 12:182-183.
- VANDERHAEGHEN J.J., LOTSTRA F., VIERENDEELS G., GILLES C., DESCHEPPER C., VERBANCK P. 1981b. Cholecystokinin in the central nervous system and neurohypophysis. *Peptides*, 2:81-88.
- VANDERHAEGHEN J.J., SIGNEAU J.C., GEPTS W. 1975. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature*, 257:604-605.
- VANDERHAEGHEN J.J., LOTSTRA F., VANDESANDE F., DIERICKX K. 1981a. Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamo-hypophyseal neurons. *Cell Tissue Res.*, 221:227-231.
- VARRO A., DOCKRAY G.J. 1986. Identification of the C-terminal flanking peptide of preprocholecystokinin in rat brain by a novel radioimmunoassay. *Brain Res.*, 376:213-216.
- VIGNA S.R. 1985. Cholecystokinin and its receptors in vertebrates and invertebrates. *Peptides, Suppl.* 3, 6:283-287.
- VIGNA S.R., THORNDYKE M.C., WILLIAMS J.A. 1986. Evidence for a common evolutionary origin of brain and pancreas cholecystokinin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83:4355-4359.
- VIJAYAN E., SAMSON W.K., McCANN S.M. 1978. Effect of intraventricular injection of gastrin on release of LH, prolactin, TSH and GH in conscious ovariectomized rats. *Life Sci.*, 23:2225-2232.
- VIJAYAN E., SAMSON W.K., McCANN S.M. 1979. In vivo and in vitro effects of cholecystokinin on gonadotropin, prolactin, growth hormone and thyrotropin release in the rat. *Brain Res.*, 172:295-302.
- VINCENT S.R., HOKFELT T., CHRISTENSSON I., TERENIUS L. 1982. Dynorphin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *Neurosci. Lett.*, 33:185-190.
- VOIGT M.M., WANG R.Y. 1984. In vivo release of dopamine in the nucleus accumbens of the rat : modulation by cholecystokinin. *Brain Res.*, 296:189-193.
- WAHLE P., ALBUS K. 1985. Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactive material in neurons of the intraminar nuclei of the cat's thalamus. *Brain Res.*, 327:348-353.
- WALSH J.H. 1975. Biological activity and disappearance rates of big, little and mini-gastrins in dog and man. Dans "Gastrointestinal hormones" Ed. J.C. THOMPSON, Austin Tex., Univ. Texas press, 75-83.
- WATSON S.J., AKIL H., RICHARD C.W.-III, BARCHAS J.D. 1978. Evidence for two separate opiate peptide neuronal system. *Nature*, 275:226-228.
- WATSON S.J., BARCHAS J.D., LI C.H. 1977. β -lipotropin : localization of cells and axons in rat brain by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5155-5158.

- WATSON S.J., KHACHATURIAN H., TAYLOR L., FISCHLI W., GOLDSTEIN A., AKIL H. 1983. Pro-dynorphin peptides are found in the same neurons throughout rat brain : immunocytochemical study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:891-894.
- WEBER E., EVANS C.J., SAMUELSSON S.J., BARCHAS J.D. 1981. Novel peptide neuronal system in rat brain and pituitary. Science, 214:1248-1251.
- WEBER E., ROTH K.A., BARCHAS J.D., 1982. Immunohistochemical distribution of -neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain : evidence for colocalization. Proc. natl. Acad. Sci. USA, 79:3061-3066.
- WEHREBERG W.B., ESCH F., BAIRD A., YING S.-Y., BOHLEN P., LING N. 1986. Growth hormone-releasing factor : a new chapter in neuroendocrinology. Hormone Res., 24:82-90.
- WEHREBERG W.B., LING N. 1983. In vivo biological potency of rat and human growth hormone-releasing factor and fragments of human growth hormone-releasing factor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 15:525-530.
- WEHREBERG W.B., LING N., BOHLEN P., ESCH F., BRAZEAU P., GUILLEMIN R. 1982. Physiological roles of somatocristin and somatostatin in the regulation of growth hormone secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun., 30:502-567.
- WHITE F., WANG R.Y. 1984. Interactions of cholecystokinin octapeptide and dopamine on nucleus accumbens neurons. Brain Res., 300:161-166.
- WHITNALL M.H., MEZEY E., GAINER H. 1985. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. Nature, 317:248-250.
- WHITNALL M., SMYTH D., GAINER H. 1987. Vasopressin coexists in half of the corticotropin-releasing factor axons present in the external zone of the median eminence in normal rats. Neuroendocrinology, 45:420-424.
- WILLIAMS R.G., DOCKRAY G.J. 1983a. Distribution of enkephalin-related peptides in rat brain⁶: immunohistochemical studies using antisera to Met-enkephalin and Met-enkephalin Arg⁶ Phe. Neuroscience, 9:563-586.
- WILLIAMS R.G., DOCKRAY G.J. 1983b. Immunohistochemical studies of FMRF-amide-like immunoreactivity in rat brain. Brain Res., 276:213-229.
- WILLIAMS R.G., JONSSON A.C., DESMOND H., PAUWELS S., DOCKRAY G.J. 1986. Antibodies to the N- terminus of human gastrin-34 react with material in rat and ferret brain. Neurochem. Int., 8:535-540.
- WOODHAMS P.L., ALLEN Y.S., MCGOVERN J., ALLEN J.M., BLOOM S.R., BALAZS R., POLAK J.M. 1985. Immunohistochemical analysis of the early ontogeny of the neuropeptide Y system in rat brain. Neuroscience, 15:173-202.
- WOODHAMS P.L., ROBERTS G.W., POLAK J.M., CROW T.J. 1983. Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat : the bed nucleus of the stria terminalis, septum and preoptic area. Neuroscience, 8:677-703.
- YAKSH T.L., FURUI T., KANAWATI I., GO L.W. 1987. Release of cholecystokinin from rat cerebral cortex in vivo : role of GABA and glutamate receptor system. Brain Res., 406:207-214.
- YAMANO M., INAGAKI S., TATEISHI N., HAMAKO T., TOHYAMA M. 1984. Ontogeny of neuropeptides in the nucleus ventromedialis hypothalami of the rat : an immunohistochemical analysis. Developmental Brain Res., 16:253-262.

RESUME

La distribution de la cholécystokinine (CCK) dans le prosencéphale du Cobaye a été étudiée par immunohistochimie à l'aide d'antisérums dirigés contre son octopeptide carboxyterminal (CCK-8) et croisant avec la gastrine. Quand elle est comparée à ce qui est observé dans cette région chez le Rat, la distribution de l'immunoréactivité anti-CCK (IR-CCK) chez le Cobaye présente les différences interspécifiques suivantes : son absence des systèmes neuroniques mésolimbiques et hypothalamo-neurohypophysaires, et sa présence dans de nombreux neurones striataux thalamiques et infundibulaires. Dans l'adénohypophyse, la majorité des cellules corticomélanotropes et thyroïdotropes contient l'IR-CCK. La distribution de l'IR-CCK a été comparée à celle de divers neuropeptides dans l'hypothalamus. Dans cette région, l'IR-CCK est colocalisée avec la corticolibérine du système paraventriculo-infundibulaire hypophysiotrope, et avec le neuropeptide Y dans des neurones du noyau arqué. Ces derniers, qui de plus contiennent une substance apparentée à la somatolibérine humaine, constituent un système neuronique tubéro-extra-infundibulaire multipeptidergique (STM) sans projections neurohemales au contact du plexus porte hypophysaire de l'éminence médiane externe. Le STM a été retrouvé chez d'autres mammifères comme le Rat, le Chat et l'Homme, chez lesquels il présente les mêmes caractéristiques.

Cette étude fait ressortir l'importance de l'approche comparée des travaux morphologiques en neuroanatomie chimique, et de plus, renforce la notion de contrôle plurifactoriel qu'exerce directement et indirectement l'hypothalamus sur la fonction hypophysaire.



- YAMANO M., TOHYAMA M., SHIOSAKA S., SHIOTANI Y., INAGAKI S., KITO S. 1985. Leucine-enkephalin-like immunoreactive fibers in the medial preoptic area of the rat : their distribution and origin. *Exp. Brain Res.*, 60:535-541.
- ZABORSZKY L., ALHEID G.F., BEINFELD M.C., EIDEN L.E., HEIMER L., PALKOVITS M. 1985. Cholecystokinin innervation of the ventral striatum : a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14:427-453.
- ZABORSZKY L., BEINFELD M.C., PALKOVITS M., HEIMER L. 1984. Brainstem projection to the hypothalamic ventromedial nucleus in the rat : a CCK- containing long ascending pathway. *Brain Res.*, 303:225-231.
- ZADINA J.E., BANKS W.A., KASTIN A.J. 1986. Central nervous system effects of peptides, 1980- 1985: a cross-listing of peptides and their central actions from the first six years of the *Journal Peptides*. *Peptides*, 7:497-537.
- ZARBIN M.A., INNIS R.B., WAMSLEY J.K., SNYDER S.H., M.J. KUCHAR 1983. Anto radiographic localization of cholecystokinin receptors in rodent brain. *The J. of Neuroscience*, 3:877-906.
- ZARBIN M.A., INNIS R.B., WAMSLEY J.K., SNYDER S.H., M.J. 1981. Autoradiographic localization of CCK receptors in guinea pig brain. *Euroepen Journal of Pharmacology*, 71:349- 350.
- ZHOU Z.Z., ENG J., PAN Y-C.E., CHANG M., HULMES J., RAUFMAN J.P., YALOW R.S. 1985. Unique cholecystokinin peptides isolated from guinea-pig intestine. *Peptides*, 6:337-341.
- ZIMMERMAN E.A., LIOTTA A., KRIEGER D.T. 1978. β -lipotropin in brain : localization in hypothalamic neurons by immunoperoxidase technique. *Cell Tissue Res.*, 186:393-398.
- ZUZEL K.A., ROSE C., SCHWARTZ J.C. 1985. Assesiment of the role of "enkephalinase" in cholecystokinin in inactivation. *Neuroscience*, 15:149- 158.

