

50376
1988
175

50376
1988
175

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année Universitaire : 1987-1988



N° ordre : 275

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

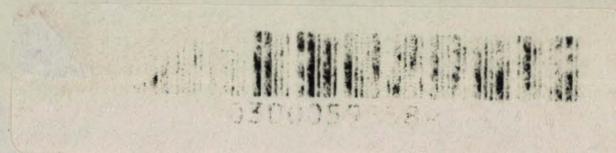
Mention Neurosciences

par

Luc MARTIN-BOUYER

ETUDE NEUROANATOMIQUE DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL DE L'HYPOTHALAMUS DU COBAYE :

**CARACTERISATION DE SES TYPES CELLULAIRES
ET DESCRIPTION DE SES EFFERENCES**



Soutenu le 1^{er} Décembre 1988 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : M. M. PORCHET

Rapporteurs : M. M. MAZZUCA

M. J.P. DUPOUY

Examineurs : M. P. POULAIN

M. A. LEPRETRE

J'exprime tous mes remerciements :

à Monsieur le Professeur M. PORCHET

qui, après m'avoir dispensé son enseignement au cours de mes études, me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

à Monsieur le Professeur M. MAZZUCA,

Directeur du laboratoire (I.N.S.E.R.M., Unité 156) dans lequel j'ai travaillé à l'élaboration de cette thèse, tout en bénéficiant de son aide et de ses conseils. Je le remercie vivement d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail.

à Monsieur le Professeur J.P. DUPOUY

qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être un de mes juges et qui a rédigé le rapport de mon travail.

à Monsieur P. POULAIN,

Chargé de Recherche, auquel je suis très reconnaissant d'avoir été l'animateur de ma formation de recherche. Je rends hommage à ses qualités scientifiques et humaines ; qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

à Monsieur A. LEPRETRE,

Maître de Conférences, dont les conseils avisés m'ont permis de mener à bien l'analyse statistique réalisée dans l'un des chapitres de cette thèse.

à Monsieur le Professeur J. BARRY,

qui m'a accueilli dans son laboratoire pour mes premières années de recherche.

à Messieurs J.C. BEAUVILLAIN et G. TRAMU

qui ont participé aux expériences d'immunocytochimie qui figurent dans cette thèse.

aux membres de l'Unité 156 et en particulier à Mademoiselle E. FREMAUX pour son travail patient de dactylographie.

J'exprime également tous mes remerciements :

à Florence,

mon épouse, pour avoir contribué activement à l'élaboration de cette thèse et m'avoir supporté et soutenu au cours de ces longues années parfois difficiles.

à mes parents,

pour m'avoir permis d'effectuer ces longues études par leur soutien à la fois moral et matériel.

à mes beaux-parents,

pour leur soutien et leur compréhension.

à tous mes amis,

trop nombreux pour être cités, mais qui sauront se reconnaître, j'en suis sûr.

à la Faculté Libre des Sciences (F.L.S.), au Collège Saint-Joseph et à tous mes collègues qui m'ont permis par des aménagements d'horaire parfois difficiles de rendre compatible mon travail d'enseignant et la réalisation de cette thèse.

RESUME

Cette étude est consacrée au noyau magnocellulaire dorsal (NMD) de l'hypothalamus du cobaye, qui est constitué d'un groupe de neurones enképhalinerigiques parfaitement bien individualisé.

Une étude morphologique des péricaryons du NMD a été réalisée à partir de blocs d'hypothalamus imprégnés par la méthode de GOLGI. Un traitement statistique multivariable (ACP, AFD, CAH, D^2 de MAHALANOBIS), effectué sur 213 cellules, a permis d'identifier 4 groupes de péricaryons présentant une morphologie significativement différente. Cette partition a été confirmée par l'observation de péricaryons du NMD mis en évidence par injection intracellulaire de Lucifer Yellow sur tranches d'hypothalamus maintenues "in vitro".

Une étude des efférences du NMD a été effectuée en combinant différentes techniques neuroanatomiques. Des lésions électrolytiques unilatérales et bilatérales du NMD ont permis de constater l'absence de projections de ce noyau vers l'éminence médiane, résultats confirmés par des injections intraveineuses de peroxydase. Ces mêmes lésions ont permis d'établir l'existence d'une relation directe bilatérale entre le NMD et le septum latéral (SL). Cette relation a été définitivement démontrée par le marquage des corps cellulaires du NMD après transport rétrograde de peroxydase et de marqueurs fluorescents implantés sous forme cristalline dans le SL. La nature enképhalinerigique de la projection du NMD vers le SL a été prouvée grâce à l'association de la technique de transport rétrograde de marqueurs et d'une technique immunocytochimique. L'observation d'un transport antérograde après injection de peroxydase dans le NMD sur tranches d'hypothalamus maintenues "in vitro" a mis en évidence plusieurs projections du NMD dans l'hypothalamus (en particulier vers l'hypothalamus latéral et l'aire périventriculaire) et le thalamus (vers le noyau réticulaire thalamique, le thalamus médian et la zona incerta).

MOTS CLEFS :

Neuroanatomie.

Hypothalamus.

Noyau magnocellulaire dorsal.

Golgi.

Injections intracellulaires.

Analyses Multivariables.

Enképhalines.

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... p 1

MATERIEL ET METHODES..... P 6

PREMIERE PARTIE TECHNIQUES D'ETUDES MORPHOLOGIQUES UTILISANT LA METHODE DE GOLGI

I - TECHNIQUE D'IMPREGNATION ARGENTIQUE..... p 9

A - Choix de la technique..... p 9

B - Description de la technique..... p 9

1) Perfusion..... p 9

2) Dissection du bloc contenant l'hypothalamus..... p 10

3) Post-fixation..... p 10

4) Imprégnation..... p 11

5) Obtention des coupes..... p 11

a - Microtome à congélation..... p 11

b - Vibratome..... p 11

6) Déshydratation et montage..... p 12

a - Montage entre lame et lamelle..... p 12

b - Montage entre lamelle et lamelle..... p 12

II - OBTENTION DU TABLEAU DE DONNEES..... p 14

A - Dessin et mesure des cellules..... p 14

B - Choix des paramètres de mesure..... p 14

1) Paramètres liés au corps cellulaire..... p 14

2) Paramètres d'abondance des ramifications dendritiques..... p 15

3) Paramètres de taille des dendrites..... p 15

SOMMAIRE

4) <u>Paramètres mesurant l'extension du champ dendritique..</u>	p 16
5) <u>Paramètres d'extension du neurone.....</u>	p 16
6) <u>Paramètres d'orientation des dendrites.....</u>	p 16
7) <u>Paramètres liés à l'axone.....</u>	p 17
<u>III - METHODES D'ANALYSE STATISTIQUE.....</u>	p 18
<u>A - Analyse en Composantes Principales (A.C.P.).....</u>	p 18
1) <u>Objectif.....</u>	p 18
2) <u>Définition des Composantes Principales.....</u>	p 18
3) <u>Principe de l'Analyse en Composantes Principales.....</u>	p 19
4) <u>Présentation des résultats de l'Analyse en Composantes Principales.....</u>	p 20
<u>B - Recherche des noyaux d'affinités.....</u>	p 21
<u>C - Classification automatique.....</u>	p 21
<u>D - Analyse Factorielle Discriminante (A.F.D.).....</u>	p 23
1) <u>Introduction.....</u>	p 23
2) <u>Définition.....</u>	p 23
3) <u>Présentation des résultats.....</u>	p 25
<u>E - Distance Généralisée de MAHALANOBIS (D^2 de MAHALANOBIS).....</u>	p 26
1) <u>Introduction.....</u>	p 26
2) <u>Définition.....</u>	p 26
3) <u>Présentation des résultats.....</u>	p 27

DEUXIEME PARTIE
TECHNIQUES D'ETUDES NEUROANATOMIQUES"IN VIVO"

<u>I - LESIONS ELECTROLYTIQUES.....</u>	p 29
<u>A - Anesthésie.....</u>	p 29
<u>B - Fabrication des électrodes.....</u>	p 29

<u>C - Lésions</u>	p 29
<u>D - Obtention des fragments d'hypothalamus, de septum latéral et d'émittance médiane</u>	p 30
1) <u>Fixation par perfusion</u>	p 30
2) <u>Dissection</u>	p 31
3) <u>Congélation des fragments de septum et d'émittance médiane</u>	p 32
<u>E - Techniques histologiques et immunocytochimiques</u>	p 33
1) <u>Obtention des coupes</u>	p 33
a - Coupes à congélation.....	p 33
b - Coupes au cryostat.....	p 34
2) <u>Coloration des coupes à congélation</u>	p 34
3) <u>Réaction immunocytochimique sur les coupes au cryostat</u>	p 35
4) <u>Coloration de la myéline</u>	p 37
<u>II - IMPLANTATION DE PEROXYDASE ET DE FLUOROCHROMES SOUS FORME CRISTALLINE</u>	p 39
<u>A - Anesthésie</u>	p 39
<u>B - Fabrication et remplissage des micropipettes</u>	p 39
<u>C - Intervention stéréotaxique</u>	p 41
<u>D - Injection de Colchicine</u>	p 41
<u>E - Techniques histologiques</u>	p 42
1) <u>Techniques relatives à la mise en évidence de la peroxydase</u>	p 42
a - Perfusion	p 42
b - Cryoprotection.....	p 42
c - Obtention des coupes.....	p 42
d - Réaction histochimique.....	p 42
2) <u>Techniques relatives à la mise en évidence des fluorochromes</u>	p 43

a - Transport rétrograde.....	p 43
b - Couplage transport rétrograde-immunocytochimie..	p 43
c - Immunocytochimie.....	p 44
d - Observation microscopique.....	p 44
<u>III - INJECTIONS IONTOPHORETIQUES DE PEROXYDASE.....</u>	p 45
<u>A - Fabrication et remplissage des micropipettes.....</u>	p 45
<u>B - Repérage électrophysiologique et injections de peroxydase.....</u>	p 45
1) <u>Enregistrement électrophysiologique.....</u>	p 45
2) <u>Injection de peroxydase</u>	p 47
<u>C - Obtention des coupes et techniques histologiques.....</u>	p 47
<u>IV - INJECTIONS INTRAVEINEUSES DE PEROXYDASE.....</u>	p 48
<u>A - Technique d'injection.....</u>	p 48
<u>B - Techniques histologiques.....</u>	p 48
TROISIEME PARTIE	
TECHNIQUES D'ETUDES NEUROANATOMIQUES "IN VITRO"	
<u>I - MATERIEL.....</u>	p 50
<u>A - Confection des tranches d'hypothalamus.....</u>	p 50
<u>B - Survie des tranches.....</u>	p 51
<u>II - INJECTIONS IONTOPHORETIQUES DE PEROXYDASE.....</u>	p 52
<u>A - Fabrication et remplissage des micropipettes.....</u>	p 52
<u>B - Injection de peroxydase.....</u>	p 52

<u>C - Techniques histologiques.....</u>	p 52
<u>III - INJECTIONS INTRACELLULAIRES DE LUCIFER YELLOW.....</u>	p 54
<u>A - Fabrication et remplissage des microélectrodes.....</u>	p 54
<u>B - Injection de LUCIFER YELLOW.....</u>	p 54
<u>C - Techniques histologiques.....</u>	p 55

RESULTATS.....	p 56
----------------	------

PREMIERE PARTIE
 ETUDE MORPHOLOGIQUE DES NEURONES DU NOYAU
 MAGNOCELLULAIRE DORSAL

<u>I - MORPHOLOGIE DES NEURONES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL MIS EN EVIDENCE PAR LA TECHNIQUE DE GOLGI MODIFIEE.....</u>	p 59
---	------

<u>A - Analyse morphométrique des péricaryons et prolongements dendritiques.....</u>	p 60
1) <u>Obtention du tableau de données définitif.....</u>	p 60
a - Tri des variables.....	p 60
b - Etude des corrélations entre variables.....	p 61
c - Classification Automatique.....	p 62
d - Tableau de données définitif.....	p 63
2) <u>Analyse en Composantes Principales (A.C.P.).....</u>	p 63
a - Etude des plans factoriels.....	p 64
b - Etude des individus.....	p 66
3) <u>Analyse Factorielle Discriminante (A.F.D.).....</u>	p 69
4) <u>Distance Généralisée de MAHALANOBIS (D^2 de MAHALANOBIS).....</u>	p 71
5) <u>Caractérisation statistique des groupes de cellules...</u>	p 72
6) <u>Caractérisation morphologique des groupes de cellules.....</u>	p 74
a - Groupe I (cellules de type I).....	p 74

b - Groupe II (cellules de type II).....	p 75
c - Groupe III (cellules de type III).....	p 75
d - Groupe IV (cellules de type IV).....	p 76
7) <u>Répartition topographique des groupes de cellulaires..</u>	p 76
<u>B - Morphologie et direction des axones.....</u>	p 76
1) <u>Groupe I.....</u>	p 77
2) <u>Groupe II.....</u>	p 77
3) <u>Groupe III.....</u>	p 77
4) <u>Groupe IV.....</u>	p 78

II - MORPHOLOGIE DES NEURONES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL MIS EN EVIDENCE PAR INJECTION INTRACELLULAIRE DE LUCIFER YELLOW "IN VITRO".....

<u>A - Morphologie des péricaryons et des prolongements dendritiques..</u>	p 79
<u>B - Direction des axones.....</u>	p 81

SECONDE PARTIE
 ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFERENCES DES
 NEURONES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL

<u>I - CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES.....</u>	p 85
<u>A - Généralités sur le transport intra-axonal de la peroxydase et des fluorochromes.....</u>	p 85
<u>B - Mécanismes de capture des traceurs.....</u>	p 87
1) <u>Péroxydase.....</u>	p 87
a - Incorporation dans le neurone.....	p 87
b - Marquage de type "solide".....	p 87
2) <u>Fluorochromes.....</u>	p 90
<u>C - Transport intra-axonal bi-directionnel des traceurs.....</u>	p 90
1) <u>Transport rétrograde.....</u>	p 90
2) <u>Transport antérograde.....</u>	p 91

<u>D - Site efficace de capture des traceurs à l'emplacement de l'injection.....</u>	P 92
1) <u>Implantation de cristaux de peroxydase.....</u>	p 93
2) <u>Implantation de cristaux de composés fluorescents.....</u>	p 93
<u>E - Compatibilité des traceurs entre eux et combinaison avec la technique immunocytochimique.....</u>	p 93
1) <u>Application de plusieurs traceurs fluorescents : choix des traceurs.....</u>	p 94
2) <u>Combinaison de la technique des traceurs fluorescents avec la technique immunocytochimique.....</u>	p 96
<u>F - Marquage d'éléments névrogliques.....</u>	p 97
<u>G - Utilisation des traceurs "in vitro".....</u>	p 97
<u>II - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS L'EMINENCE MEDIANE.....</u>	p 100
<u>A - Lésions électrolytiques du noyau magnocellulaire dorsal.....</u>	p 100
<u>B - Injections intraveineuses de peroxydase.....</u>	p 101
1) <u>Incorporation de la peroxydase au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.....</u>	p 103
2) <u>Topographie des neurones hypothalamiques marqués.....</u>	p 103
<u>III - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS LE SEPTUM LATERAL.....</u>	p 105
<u>A - Lésions électrolytiques du noyau magnocellulaire dorsal.....</u>	p 106
1) <u>Lésions électrolytiques unilatérales.....</u>	p 106
2) <u>Lésions électrolytiques bilatérales.....</u>	p 107
<u>B - Implantations "in vivo" de traceurs dans le septum latéral.....</u>	p 107
1) <u>Description du site d'implantation du traceur.....</u>	p 108
a - <u>Situation du site d'implantation du traceur.....</u>	p 108

b - Aspect de la région ayant reçu une application de peroxydase.....	p 108
c - Aspect de la région ayant reçu une application de DAPI ou de PI.....	p 109
2) <u>Localisation des corps cellulaires marqués par transport rétrograde.....</u>	p 109
a - Aspect des corps cellulaires marqués par transport rétrograde de peroxydase et de fluorochromes.....	p 110
a.1 - Transport rétrograde de peroxydase.....	p 110
a.1.1 - Neurones marqués dans le noyau magnocellulaire dorsal.....	p 110
a.1.2 - Neurones marqués dans l'hypothalamus latéral.....	p 111
a.2 - Transport rétrograde de fluorochromes....	p 112
b - Etude quantitative réalisée sur les cellules marquées par la peroxydase.....	p 113
b.1 - Corrélation entre les sites d'implantation et la localisation des cellules marquées.	p 113
b.2 - Décussation.....	p 114
3) <u>Implantations bilatérales de deux traceurs fluorescents différents.....</u>	p 115
4) <u>Etude immunocytochimique des neurones identifiés après transport rétrograde de DAPI.....</u>	p 116

IV - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS LE THALAMUS ET D'AUTRES REGIONS DE L'HYPOTHALAMUS..... p 117

A - <u>Etude après injection de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal "in vivo".....</u>	p 117
1) <u>Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus basal.....</u>	p 118
2) <u>Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus dorsal.....</u>	p 118
3) <u>Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus latéral.....</u>	p 118

B - Etude après injection de peroxydase dans le noyau magnocellulaire

<u>dorsal "in vitro".....</u>	p 119
1) <u>Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers le</u>	
<u>thalamus.....</u>	p 122
a - Thalamus latéral.....	p 122
a.1 - Thalamus latéral homolatéral.....	p 122
a.2 - Thalamus latéral controlatéral.....	p 123
b - Thalamus médian.....	p 123
c - Zona incerta.....	p 124
c.1 - Zona incerta homolatérale.....	p 124
c.2.- Zona incerta controlatérale.....	p 124
2) <u>Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers</u>	
<u>l'hypothalamus.....</u>	p 124
a - Noyau paraventriculaire.....	p 125
a.1 - Noyau paraventriculaire homolatéral.....	p 125
a.2 - Noyau paraventriculaire controlatéral....	p 125
b - Aire hypothalamique latérale.....	p 126
c - Aire périventriculo-fornicale.....	p 126
d - Aire périventriculaire.....	p 126
d.1 - Aire périventriculaire homolatérale.....	p 126
d.2 - Aire périventriculaire controlatérale....	p 126
e - Hypothalamus médio-dorsal.....	p 126
f - Hypothalamus latéro-dorsal.....	p 127
g - Hypothalamus médio-basal.....	p 127
DISCUSSION.....	p 129
CONCLUSIONS GENERALES.....	p 156
ANNEXES.....	p 159
BIBLIOGRAPHIE.....	p 164

INTRODUCTION

A côté des neurotransmetteurs classiques, les neuropeptides jouent un rôle essentiel dans l'activité du système nerveux central, non seulement en raison de leurs capacités neuroendocrines mais aussi par leur pouvoir d'interférer avec les mécanismes de la communication inter-neuronale.

L'isolement dans le cerveau et la caractérisation d'un groupe de ces neuropeptides, les enképhalines (Leu- et Met-enképhalines), ont été accomplis par HUGHES et al. en 1975. Ces substances, qui font partie du groupe des peptides opiacés endogènes, sont des pentapeptides présentant une haute affinité pour les récepteurs opiacés et dérivent d'un précurseur commun : la proenképhaline. Ce précurseur est synthétisé dans de nombreux systèmes neuronaux à tous les niveaux du système nerveux central. L'intérêt particulier porté aux enképhalines provient de leurs effets potentiels dans de multiples fonctions nerveuses (NORTH et al., 1979, IVERSEN et al., 1980, MILLER et PICKEL, 1980).

De nombreuses études immunocytochimiques ont permis de détailler la topographie des neurones élaborant les enképhalines dans le système nerveux, en particulier chez le Rat (revues dans KHACHATURIAN et al., 1985, NIEUWENHUYS, 1985). Chez le Cobaye, des corps cellulaires enképhalinergiques ont été décrits dans différents territoires de l'hypothalamus : aire périventriculaire, noyaux dorso- et ventro-médians, noyau arqué et aire mamillaire (TRAMU et al., 1981 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981). Dans la région périfornicale, au niveau du noyau paraventriculaire (NPV), des corps cellulaires enképhalinergiques de grande taille sont rassemblés en un groupe compact à l'intérieur des limites du noyau magnocellulaire dorsal (NMD).

Le noyau magnocellulaire dorsal (NMD):

La dénomination de ce noyau est due à WAHREN (1957) ("Großzelligen Dorsalkerns") puis à GERHARD (1966) ("nucleus magnocellularis dorsalis hypothalami") qui, par cette appellation, désignent chez le Lapin une large population de neurones magnocellulaires occupant en réalité les aires hypothalamiques dorsale et latérale et s'étendant dans l'aire périfornicale. Repris par MUHLEN (1966) chez le Cobaye, le terme NMD a été ensuite utilisé par POULAIN (1974) pour nommer chez le même animal une accumulation de cellules de grande taille, constituant un ensemble parfaitement bien différencié, situé dorso-médialement par rapport aux colonnes du fornix et nettement séparé de la partie latérale, également magnocellulaire, du NPV (Fig.1). Le NMD est également localisé par BLEIER (1983) dans son atlas cytoarchitectonique de l'hypothalamus du Cobaye, mais bien qu'occupant une position tout à fait semblable à celle décrite par POULAIN (1974), le noyau est dénommé "noyau magnocellulaire dorso-latéral" par cet auteur, terme qui semble impropre puisque les images présentées situent le noyau tout à fait dans la région dorso-médiale du fornix. Après la description originale de TRAMU et al. (1981), qui indiquait la présence d'enképhalines dans le NMD, une étude ultrastructurale a démontré que les neurones de ce noyau synthétisaient bien ces substances (BEAUVILLAIN et al., 1982).

Différences entre le Rat et le Cobaye:

Des différences régionales existent entre le Cobaye et le Rat en ce qui concerne la topographie des neurones enképhalinergiques de la région hypothalamique périfornicale. Chez le Rat, des cellules enképhalinergiques isolées ont tout d'abord été observées entre le NPV et l'aire périfornicale (HOKFELT et al., 1977 ; SAR et al., 1978 ; WAMSLEY et al., 1980 ; FINLEY et al., 1981 ; SAKANAKA et al., 1982). Dans la même espèce, KRUKOFF et CALARESU (1984) ont décrit une formation circulaire de cellules présentant une immunoréactivité intense vis-à-vis des enképhalines et située à mi-distance du NPV et du fornix. Plus antérieurement, ces cellules sont disséminées dans l'aire périfornicale. De manière tout à fait semblable, ONTENIENTE et al. (1986) et ONTENIENTE-KAH (1987) décrivent un groupe de neurones enképhalinergiques jouxtant la face interne du fornix, au niveau du NPV, qui est cette fois nommé NMD, comme chez le Cobaye. Si cette formation, chez le Rat, peut

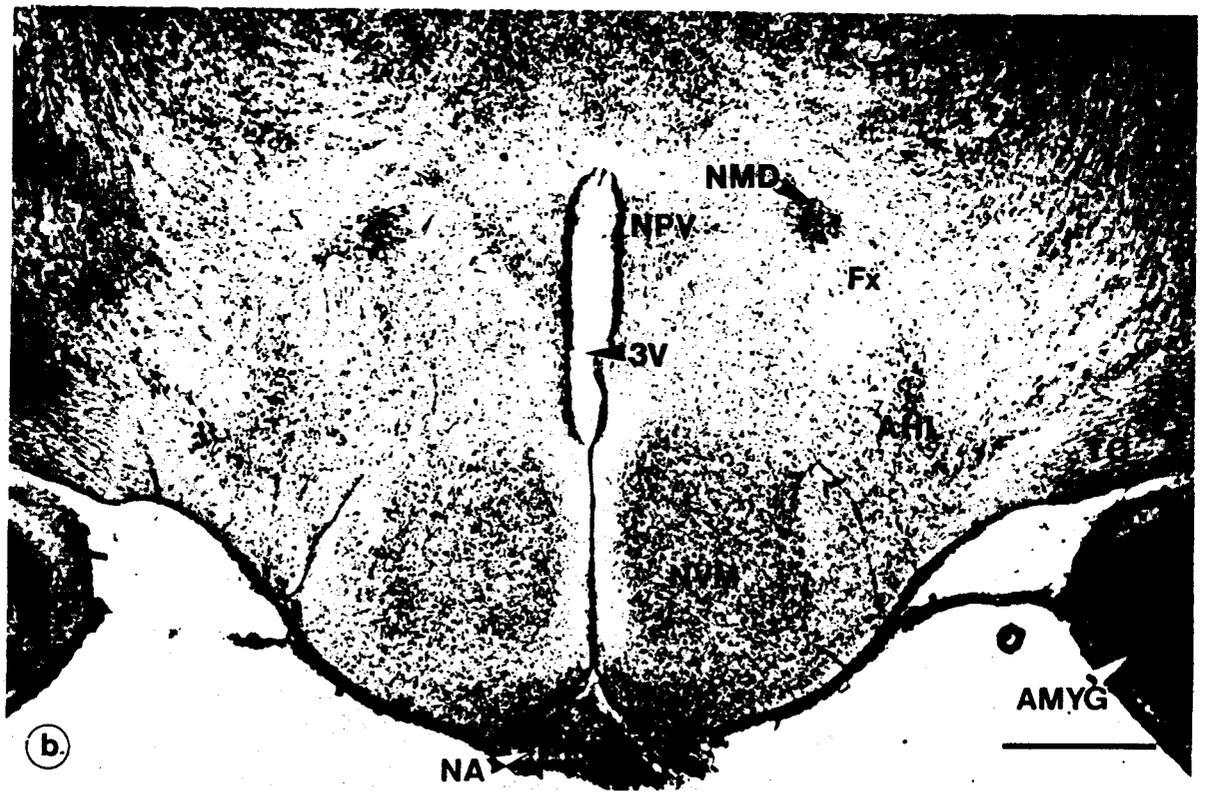
FIGURE 1

Localisation des structures hypothalamiques dans un plan frontal contenant le noyau magnocellulaire dorsal, chez le Cobaye.

- a) Mise en évidence des fibres myélinisées par la coloration au bleu-luxol sur coupe à la paraffine.
- b) Mise en évidence des noyaux hypothalamiques par la coloration à la thionine sur coupe à congélation.

Barre de calibration en a et b : 1 mm.

Pour toutes les figures, se reporter à la liste des abréviations en annexe 1.



être à certains égards comparée au NMD observé chez le Cobaye, elle ne présente toutefois pas le caractère très compact et parfaitement distinct des structures avoisinantes qui fait l'originalité de ce noyau (Fig. 1).

Les caractéristiques du NMD chez le Cobaye lui confèrent un très grand intérêt dans l'étude de la physiologie des neurones enképhalinerigiques, tant pour la connaissance de leur structure fine que pour celle des interactions de différents agents (neurotransmetteurs et neuropeptides) étant supposés jouer un rôle dans l'activité de ces neurones. Cet intérêt justifiait que l'on examinât d'abord la morphologie cellulaire des constituants de ce noyau. Cette étude a été menée en utilisant les techniques classiques d'imprégnation argentique et les techniques plus récentes d'injection intracellulaire de produits fluorescents, rendues abordables par l'utilisation de tranches maintenues en survie. Les résultats de cette étude, qui a nécessité la mise en oeuvre d'un traitement statistique, seront présentés dans la première partie de cette thèse.

Les caractéristiques du NMD chez le Cobaye offrent également un grand avantage du point de vue neuroanatomique. En effet les neurones élaborant les neuropeptides constituent en général des populations disséminées ou imbriquées dont il est difficile d'appréhender les connexions (exception faite des populations magnocellulaires élaborant les neurohormones destinées au lobe postérieur de l'hypophyse : vasopressine et ocytocine). Certaines connexions enképhalinerigiques, formant des tractus plus ou moins organisés, ont été décrites dans le système nerveux central (revue dans NIEUWENHUYS, 1985). Chez le Rat, plusieurs tractus enképhalinerigiques sont originaires de l'hypothalamus :

- des relations intra-hypothalamiques constituées de neurones enképhalinerigiques ont été démontrées entre le noyau arqué et l'aire préoptique (YAMANO et al., 1985b), la partie parvicellulaire du NPV et le noyau ventro-médian (YAMANO et al., 1985a), la partie magnocellulaire du NPV et le lobe postérieur de l'hypophyse (ROSSIER et al., 1979). A propos de cette dernière relation, il faut noter que dans le lobe postérieur de l'hypophyse, les enképhalines coexistent avec la vasopressine et l'ocytocine (MARTIN et VOIGT, 1981).

- d'origine hypothalamique mais se dirigeant vers d'autres régions du cerveau, ont été décrites également chez le Rat des relations enképhalinergiques du noyau ventro-médian vers le tronc cérébral (YAMANO et al., 1986), des corps mamillaires vers le noyau thalamique antéro-ventral (FUJII et al., 1987) et l'aire tegmentale ventrale de GUDDEN (YAMANO et TOHYAMA, 1987), de l'hypothalamus latéral (HL) (SAKANAKA et al., 1982) et du "NMD" (ONTENIENTE et al., 1986) vers le septum, et de l'HL vers l'habenula (SHINODA et TOHYAMA, 1987). La démonstration de telles relations tend à réfuter les conclusions issues des premières observations reportant que les neurones enképhalinergiques étaient généralement des inter-neurones établissant des relations locales (ZIEGLGANSBERGER, 1982).

Dans ce travail, nous avons tenté par différentes méthodes faisant appel aux techniques de neuroanatomie expérimentale, de définir les projections efférentes du NMD chez le Cobaye. Les résultats de cette étude constitueront la seconde partie cette thèse.

MATERIEL
ET
METHODES

Le présent travail a été effectué chez le Cobaye tricolore (*Cavia porcellus* L.) femelle.

Les expériences nécessitant une approche stéréotaxique ont été réalisées sur des animaux pesant de 380 g à 400 g afin de pouvoir utiliser les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas de POULAIN (1974).

Il n'a en aucun cas été tenu compte de la phase du cycle oestral de l'animal. Toutefois, toutes les femelles utilisées étaient non gestantes.

L'ensemble des animaux utilisés était soumis à des conditions d'élevage stables :

- température constante (20°C).
- rythme nyctéméral de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité.
- accès libre à la nourriture et à la boisson.

PREMIERE PARTIE

TECHNIQUES D'ETUDES MORPHOLOGIQUES
UTILISANT LA METHODE DE GOLGI

I - TECHNIQUE D'IMPREGNATION ARGENTIQUE

A - Choix de la technique

Une variante de la technique d'imprégnation fine du neuroplasma par un dépôt de chromate d'argent (GOLGI, 1873), décrite par Mac MULLEN et ALMLI (1981), elle-même modifiée à partir de RAMON-MOLINER (1957), est citée comme étant la plus appropriée à l'étude de l'hypothalamus. C'est cette technique qui a été choisie pour la présente étude.

B - Description de la technique

Sept Cobayes femelles adultes, de 380 g à 400 g, ont été utilisés. Après une anesthésie profonde au NEMBUTAL, le cerveau a été perfusé par injection intracardiaque.

1) Perfusion

L'animal est placé en décubitus dorsal. La peau est incisée longitudinalement du bas de l'abdomen jusqu'au cou. La paroi abdominale est ouverte médialement jusqu'au diaphragme. De là, en pratiquant deux incisions latérales, un volet est découpé dans la cage thoracique. Après avoir délicatement dégagé le cœur du péricarde, 0,5 ml d'héparine sont injectés dans le ventricule gauche. L'oreillette droite est ouverte, puis le ventricule gauche dans lequel une sonde métallique est introduite. Cette sonde est reliée par des tubes souples comportant un goutte à goutte à deux ampoules en verre suspendues à 1,50 m au dessus du plan de travail et remplies des liquides destinés à être introduits dans le système circulatoire de l'animal. Environ 50 ml d'une solution de nitrate de

sodium à 1% sont rapidement injectés de manière à bien vidanger le sang et à créer une vasodilatation. Cinq cents millilitres du liquide de fixation sont ensuite injectés et le goutte à goutte réglé de telle sorte que le passage du liquide s'effectue en 30 minutes environ.

Le liquide de perfusion, dit fixateur de GOLGI, est préparé d'après Mac MULLEN et ALMLI (1981) :

- 12 g de bichromate de potassium dans 200 ml d'eau distillée, soit une concentration de 6% ;
- 5 g de chlorate de potassium dans 100 ml d'eau distillée, soit une concentration de 5% ;
- 30 g d'hydrate de chloral dans 150 ml d'eau distillée, soit une concentration de 20% ;
- 50 ml de paraformaldéhyde (solution du commerce à 38%).

Le liquide de perfusion est préparé juste avant l'emploi par mélange de ces 4 solutions.

2) Dissection du bloc contenant l'hypothalamus

A la suite de la perfusion, l'animal est rapidement décapité. La boîte crânienne est ouverte et la tête placée dans l'appareil stéréotaxique (BALTIMORE INSTRUMENTS COMPANY) dont les plans de référence sont ajustés selon l'atlas de POULAIN (1974). A l'aide d'une lame de rasoir fixée au micromanipulateur, une section parfaitement verticale est réalisée au plan antéro-postérieur + 12,8 mm, puis au plan antéro-postérieur + 9,4 mm. Ces 2 sections ont pour but d'isoler l'hypothalamus des autres régions du cerveau, ainsi que d'obtenir 2 plans parfaitement parallèles pouvant servir de plans de référence lors de la confection des coupes épaisses, après l'imprégnation argentique.

L'encéphale est alors délicatement disséqué. La tranche d'hypothalamus ainsi obtenue est réduite latéralement puis dorsalement afin d'obtenir un bloc à peu près cubique de 4 à 5 mm d'arête.

3) Post-fixation

Le bloc ainsi obtenu est déposé dans un filet de gaze et immergé dans une solution de post-fixation, identique à la solution de perfusion, pendant 24 heures.

Cette post-fixation est suivie de 2 immersions de 24 heures chacune dans une solution préparée comme le fixateur mais sans addition de paraformaldéhyde, lequel est remplacé par un même volume d'eau distillée.

Par la suite, le bloc d'hypothalamus est transféré dans un bain de bichromate de potassium à 3% (100 ml par bloc) qui est renouvelé toutes les 12 heures, et ce à 6 reprises.

4) Imprégnation

L'imprégnation du bloc se fait par immersion dans une solution de nitrate d'argent à 1% (100 ml par bloc).

La mise en contact du bloc fixé et du nitrate d'argent provoque instantanément l'apparition d'un précipité épais de couleur rouge brique dû au sel d'argent qui se forme, cette couche de sel pouvant par la suite gêner la bonne pénétration du nitrate d'argent à l'intérieur du tissu. Le bloc est donc plongé quelques instants dans un premier bain de nitrate d'argent et agité pour éviter le dépôt du précipité. Le bloc est ensuite retiré de cette première solution et immergé pendant 14 jours dans une autre solution de même composition.

5) Obtention des coupes

Nous avons choisi d'effectuer des coupes épaisses de 100 à 150 μm afin de pouvoir suivre les prolongements cellulaires sur une assez longue distance. Deux techniques ont été utilisées :

a - Microtome à congélation

Dans la description de leur technique, Mac MULLEN et ALMLI (1981) préconisaient l'emploi du cryotome pour réaliser les coupes après enrobage du bloc dans le TISSUE-TEK. Nous avons observé que dans ces conditions existait un fort risque d'effritement des coupes au cours de leur réalisation et pour cette raison la technique a été abandonnée.

b - Vibratome

Cette technique a l'avantage de permettre la découpe du bloc sans inclusion ni congélation préalables. Le bloc est simplement fixé à la platine du vibratome (OXFORD INSTRUMENTS) par une goutte de

cyanoacrylate, puis immergé dans un bain d'eau distillée.

6) Déshydratation et montage

Les coupes subissent alors une déshydratation à l'intérieur de paniers compartimentés plongés dans des bains successifs d'alcool :

- 30 minutes dans un bain d'alcool à 70° ;
- 30 minutes dans un bain d'alcool à 95° ;
- 2 fois 30 minutes dans un bain d'alcool absolu.

Suit un bain de toluène pour éclaircissement.

Le montage des préparations a été réalisé de deux manières différentes :

a - Montage entre lame et lamelle

Pour le montage classique entre lame et lamelle, après éclaircissement au toluène, les coupes sont disposées au pinceau sur la lame de verre, recouvertes d'EUKITT puis d'une lamelle.

b - Montage entre lamelle et lamelle

La relative épaisseur des coupes ne permet pas une bonne observation des corps cellulaires situés dans les plans inférieurs de la préparation. Nous avons donc, pour les coupes ayant la meilleure imprégnation, effectué un montage entre lamelle et lamelle permettant une observation de la coupe par ses deux faces (Fig. 2).

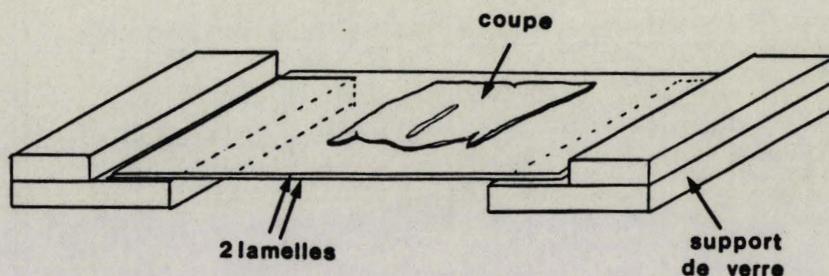


FIGURE 2 : Montage des coupes épaisses (100 à 150 μm) imprégnées par la méthode de GOLGI modifiée entre lamelle et lamelle. Ce procédé permet une bonne observation des 2 faces de la coupe.

Des petits taquets sont réalisés à partir de lames de verre. Ils serviront à supporter les 2 lamelles entre lesquelles la coupe est montée dans l'EUKITT. L'ensemble des 2 lamelles est fixé aux taquets par une goutte de cyanoacrylate.

II - OBTENTION DU TABLEAU DE DONNEES

A - Dessin et mesure des cellules

Toutes les cellules imprégnées par la technique de GOLGI, réalisée sur des coupes sériées pour l'animal choisi dans cette étude et localisées dans la région du noyau magnocellulaire dorsal (NMD), sont dessinées à la chambre claire, repérées sur une microphotographie à faible grossissement et orientées par rapport au 3^e ventricule. Chaque cellule est dessinée à l'objectif 100 à immersion pour le péricaryon et à l'objectif 40 pour l'ensemble de la cellule et de ses prolongements.

Par la suite, un certain nombre de paramètres sont mesurés sur les dessins représentant chaque cellule.

B - Choix des paramètres de mesure

Pour chaque cellule, 30 paramètres différents sont mesurés, lesquels peuvent être classés en 7 groupes :

1) Paramètres liés au corps cellulaire

La limite entre le corps cellulaire et les troncs dendritiques est établie en prolongeant le contour naturel du péricaryon dans la base de chaque tronc dendritique (PEARSON et al., 1985) (Fig. 3a).

. LON : plus grande longueur du corps cellulaire.

. LAR : plus grande largeur du corps cellulaire, perpendiculaire à la longueur définie précédemment.

FIGURE 3

Schémas représentant la méthode d'obtention des paramètres mesurés sur chaque cellule imprégnée par la méthode de GOLGI modifiée et dessinée à la chambre claire.

a) - Paramètres liés à la taille du corps cellulaire :

LON : plus grande longueur du corps cellulaire

LAR : plus grande largeur du corps cellulaire perpendiculaire à la longueur définie précédemment

- Paramètres liés à l'axone :

AXO : distance entre la limite du corps cellulaire et le cône d'émergence de l'axone

AXT : angle entre la droite reliant le cône d'émergence de l'axone avec l'extrémité visible de celui-ci et le plan du 3^e ventricule

b) - Paramètres d'abondance des ramifications dendritiques.

Chaque segment dendritique est représenté sur le schéma par le signe $\underline{S_p}$ où l'indice p indique l'ordre du segment dendritique.

Le nombre de segments dendritiques d'ordre p est : $\underline{SE_p} = \sum S_p$

Par exemple sur ce schéma : $\underline{SE_1} = \sum S_1 = 4$

$\underline{SE_2} = \sum S_2 = 6$

(Les mesures sont effectuées jusqu'à l'ordre 7).

Le nombre de terminaisons dendritiques observées est matérialisé par le nombre de signe \otimes :

Par exemple sur ce schéma : $\underline{TER} = 12$

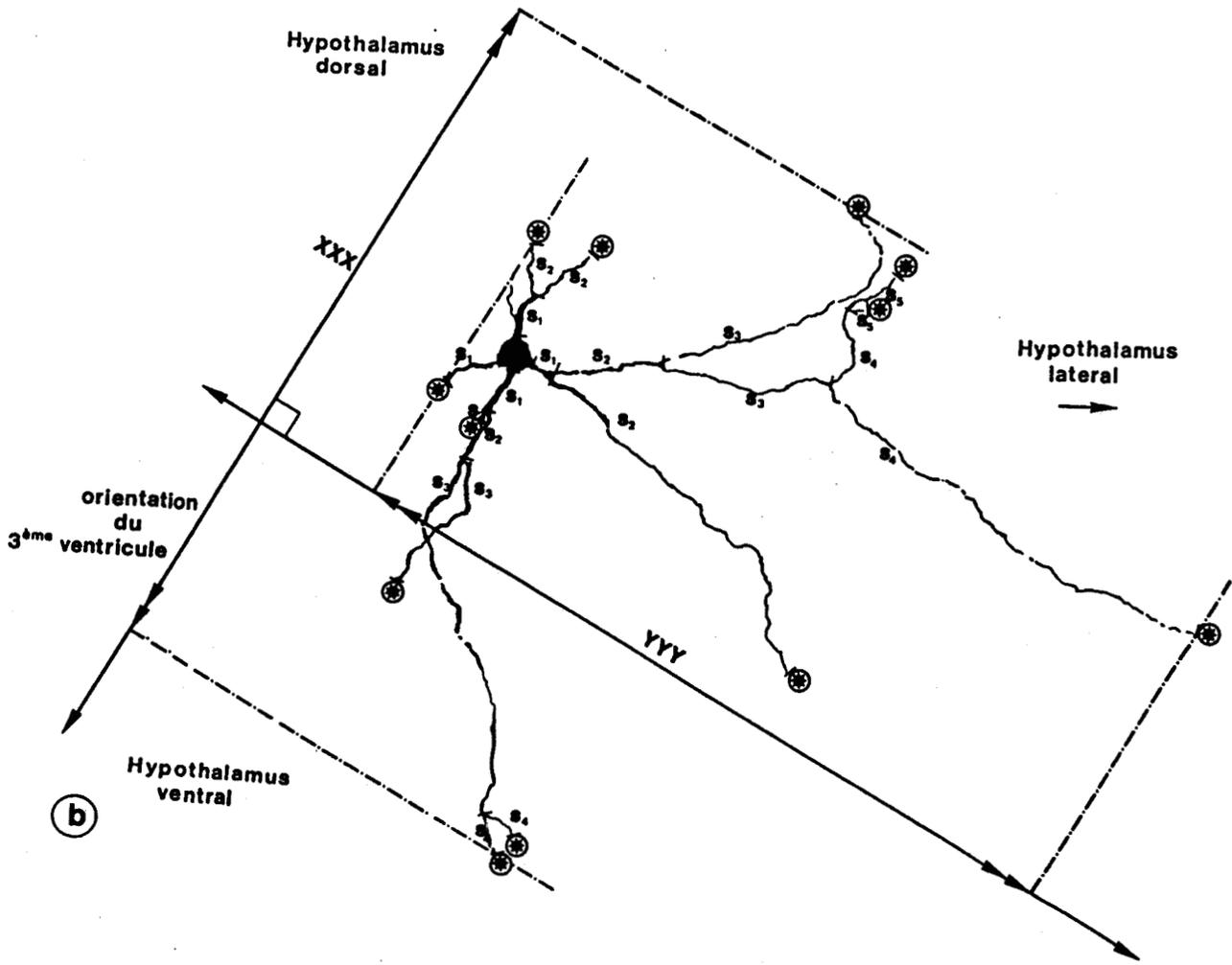
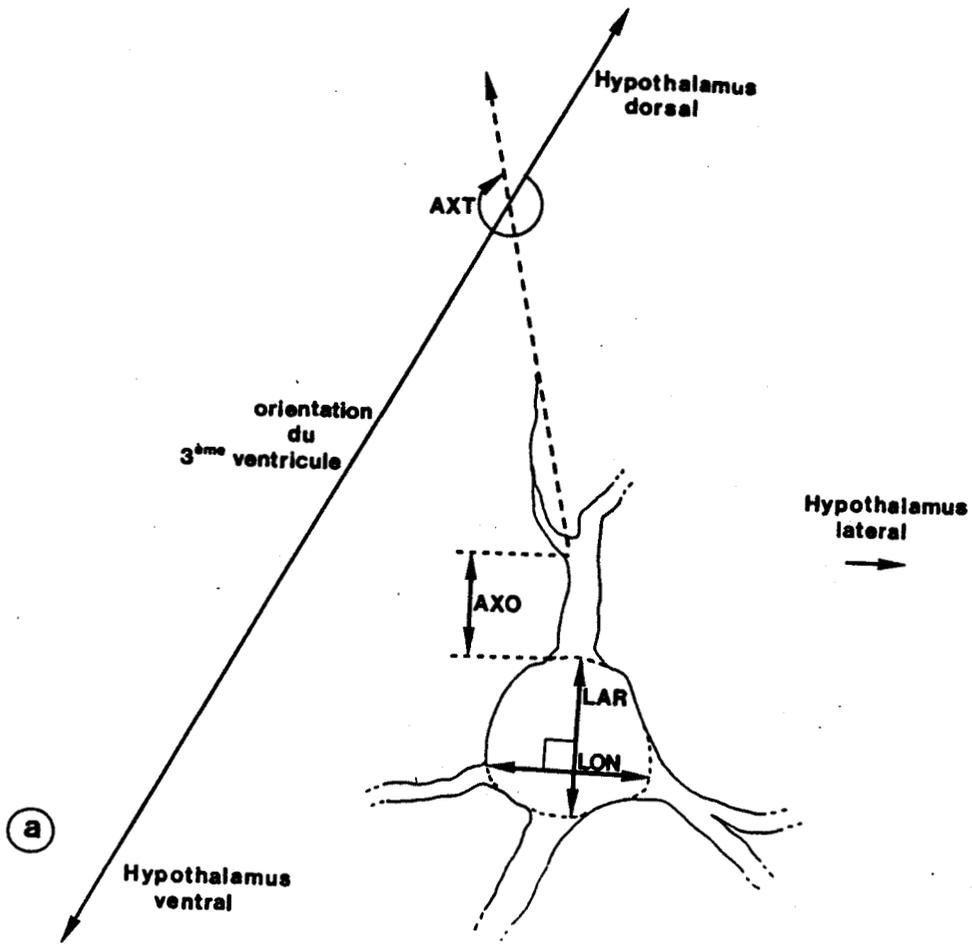
Le nombre de troncs dendritiques principaux $\underline{DP_1}$ correspond au nombre de troncs dendritiques de 1^{er} ordre de diamètre important :

Par exemple sur ce schéma : $\underline{DP_1} = \underline{SE_1} = 4$

- Paramètres d'extension du neurone :

XXX : mesure de la projection orthogonale du champ dendritique dans le champ du 3^e ventricule

YYY : mesure de la projection orthogonale du champ dendritique dans un plan horizontal perpendiculaire au champ du 3^e ventricule et parallèle à la surface basale du cerveau



2) Paramètres d'abondance des ramifications dendritiques

Un segment dendritique est défini comme étant la portion de dendrite comprise entre le corps cellulaire et la première ramification ou entre deux ramifications successives de la dendrite (ARENDE et al., 1986) (Fig. 3b).

- . SE1 : nombre de segments dendritiques de 1^{er} ordre, c'est-à-dire entre le péricaryon et la 1^{ère} ramification de chaque dendrite.
- . SE2 : nombre de segments dendritiques de 2^e ordre, c'est-à-dire entre la 1^{ère} ramification et la 2^e ramification de chaque dendrite.
- . SE3 : nombre de segments dendritiques de 3^e ordre.
- . SE4 : nombre de segments dendritiques de 4^e ordre.
- . SE5 : nombre de segments dendritiques de 5^e ordre.
- . SE6 : nombre de segments dendritiques de 6^e ordre.
- . SE7 : nombre de segments dendritiques de 7^e ordre.
- . DP1 : nombre de troncs dendritiques principaux, c'est-à-dire de dendrites de diamètre important
- . TER : nombre total d'extrémités de dendrites imprégnées par cellule.

3) Paramètres de taille des dendrites

La longueur de chaque dendrite principale est estimée par la distance entre le point d'intersection de la plus grande longueur du corps cellulaire et de sa plus grande largeur perpendiculaire, et l'extrémité dendritique la plus éloignée du péricaryon. Cinq longueurs dendritiques sont ainsi mesurées ; dans notre étude, aucune cellule imprégnée n'a présenté plus de 5 dendrites principales :

- . DE1 : longueur de la dendrite de rang 1.
- . DE2 : longueur de la dendrite de rang 2.
- . DE3 : longueur de la dendrite de rang 3.
- . DE4 : longueur de la dendrite de rang 4.
- . DE5 : longueur de la dendrite de rang 5.

La longueur de la dendrite la plus longue est toujours affectée à la variable DE1, puis les autres longueurs de dendrites par valeurs décroissantes aux variables DE2 à DE5 (Fig. 4a).

FIGURE 4

Méthode d'obtention des paramètres liés à chaque tronc dendritique :

a) - Paramètres de taille des dendrites :

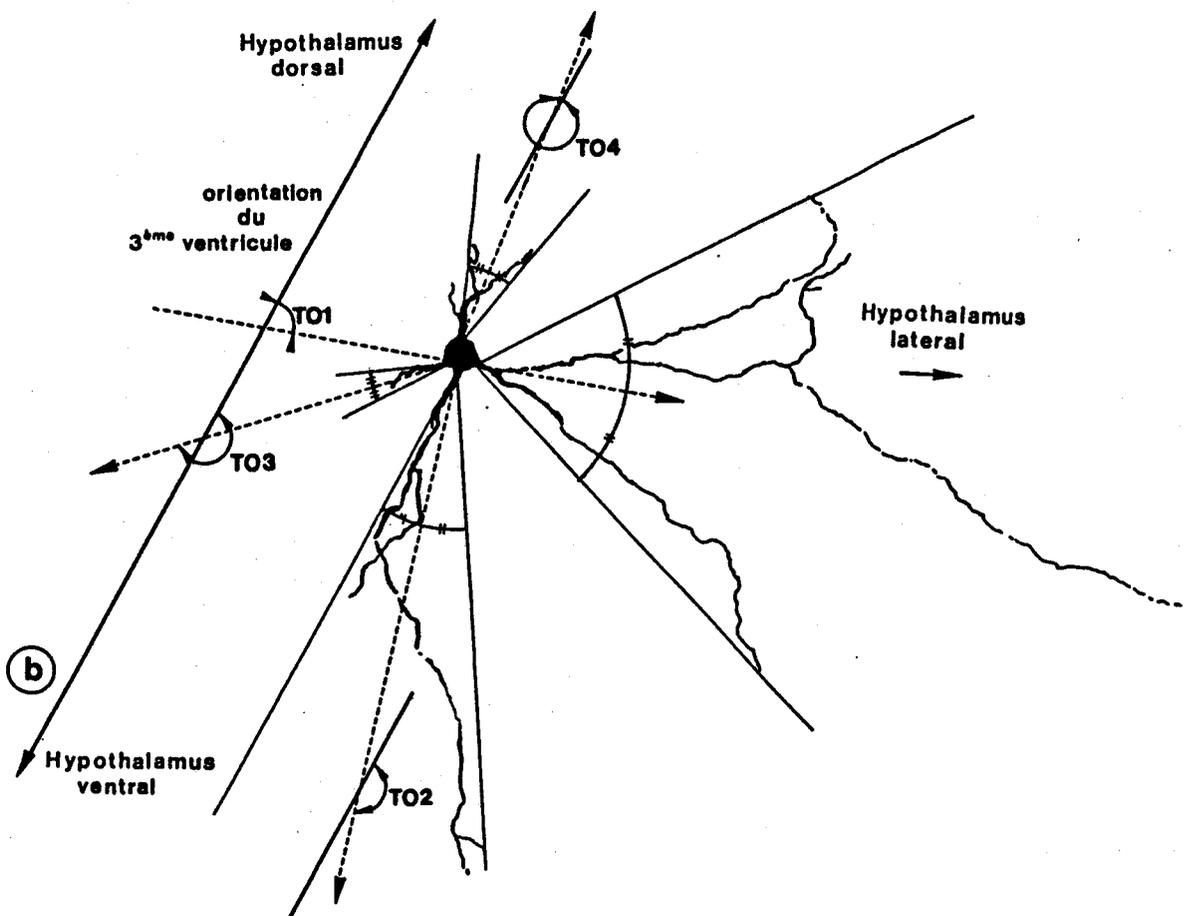
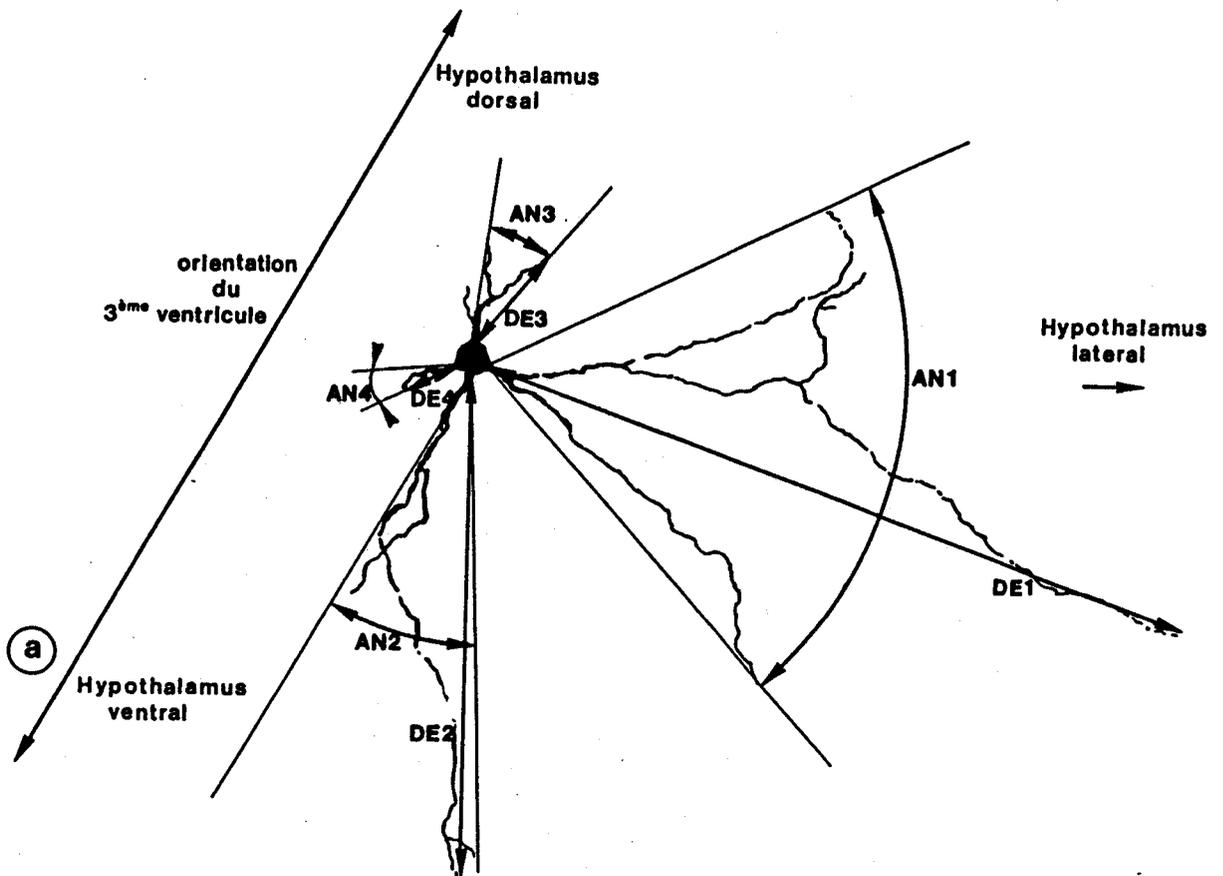
A chaque tronc dendritique est affectée une longueur DE_n correspondant à la distance entre le point d'intersection de la plus grande longueur du corps cellulaire et de sa plus grande largeur perpendiculaire, et l'extrémité dendritique la plus éloignée du péricaryon. Les indices n correspondent à des valeurs décroissantes de cette mesure (4 mesures sont réalisées pour cette cellule).

- Paramètres mesurant l'extension du champ dendritique :

A chaque tronc dendritique est affecté un angle de recouvrement AN_n (l'indice n étant le même que celui affecté à la mesure de la longueur).

b) - Paramètres d'orientation des dendrites :

L'orientation de chaque dendrite est estimée par l'angle existant entre la bissectrice de l'angle d'extension du tronc dendritique et le plan du 3^e ventricule. Chaque valeur de cet angle est TO_n où n est l'indice affecté à la longueur du tronc dendritique. Dans l'hypothalamus droit, cet angle est mesuré dans le sens des aiguilles d'une montre, dans l'hypothalamus gauche, dans le sens inverse.



4) Paramètres mesurant l'extension du champ dendritique

Pour chaque dendrite dont la longueur a été mesurée, une mesure de l'angle qu'elle recouvre est effectuée. Cet angle a son sommet au point d'émergence du tronc dendritique sur le péricaryon et est limité par deux demi-droites issues de ce sommet, de telle manière que toute la dendrite soit comprise dans le secteur angulaire. Cinq variables sont ainsi définies (Fig. 4a) :

- . AN1 : angle de recouvrement de la dendrite de rang 1.
- . AN2 : angle de recouvrement de la dendrite de rang 2.
- . AN3 : angle de recouvrement de la dendrite de rang 3.
- . AN4 : angle de recouvrement de la dendrite de rang 4.
- . AN5 : angle de recouvrement de la dendrite de rang 5.

Ces variables possèdent toujours le numéro d'ordre des dendrites auxquelles elles correspondent.

5) Paramètres d'extension du neurone

- . XXX : mesure de la projection orthogonale du champ dendritique dans le plan du 3^e ventricule.
- . YYY : mesure de la projection orthogonale du champ dendritique dans un plan horizontal perpendiculaire au plan du 3^e ventricule et parallèle à la surface basale du cerveau (Fig. 3b).

6) Paramètres d'orientation des dendrites

Pour chaque dendrite dont l'angle d'extension du champ dendritique est mesuré, la bissectrice de l'angle est tracée, et l'angle qu'elle forme avec le plan du 3^e ventricule mesuré. Cet angle est toujours mesuré par rapport au plan du 3^e ventricule, dans le sens des aiguilles d'une montre dans l'hypothalamus droit et dans le sens inverse dans l'hypothalamus gauche. Cinq mesures d'angle sont ainsi effectuées (Fig. 4b) :

- . T01 : angle d'orientation de la dendrite de rang 1.
- . T02 : angle d'orientation de la dendrite de rang 2.
- . T03 : angle d'orientation de la dendrite de rang 3.

. T04 : angle d'orientation de la dendrite de rang 4.

. T05 : angle d'orientation de la dendrite de rang 5.

Les numéros d'ordre correspondent à ceux des longueurs de dendrites et des angles d'extension des champs dendritiques.

7) Paramètres liés à l'axone

Pour chaque cellule où l'axone est imprégné, 2 paramètres sont mesurés (Fig. 3a) :

. AXO : distance entre la limite du corps cellulaire et le cône d'émergence de l'axone.

. AXT : angle entre la droite reliant le cône d'émergence de l'axone avec l'extrémité visible de celui-ci et le plan du 3^e ventricule. Cet angle, mesuré dans les mêmes conditions que les angles d'orientation des dendrites principales, nous renseigne sur la direction qu'emprunte l'axone au départ de la région du NMD.

III - METHODES D'ANALYSE STATISTIQUE

A - Analyse en Composantes Principales (A.C.P.)

1) Objectif

L'Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) est une méthode statistique ancienne dont les idées essentielles ont été formulées par K. PEARSON en 1901. La première publication à ce sujet est due à H. HOTELLING en 1933. Bien que de conception ancienne, l'utilisation de l'A.C.P. est récente et étroitement liée à l'avènement des ordinateurs depuis 1960 et surtout à l'apparition de la microinformatique depuis 1980.

L'A.C.P. est une méthode statistique essentiellement descriptive : son objectif est de présenter, sous forme graphique, l'essentiel de l'information contenue dans un tableau de données (LEBART et al., 1982). Ce tableau est constitué, en lignes, par des "individus" sur lesquels sont mesurées des "variables quantitatives" elles-mêmes disposées en colonnes.

La première phase d'une A.C.P. est le choix des individus et des variables. Ce choix doit être en accord avec les objectifs de l'étude. Dans notre cas, l'étude des individus de l'A.C.P. s'appliquait à tous les neurones marqués par la technique de GOLGI modifiée et présents dans la région du NMD de l'animal choisi.

2) Définition des Composantes Principales

Etant donnée une matrice d'observations de N individus sur lesquels ont été réalisées les mesures de n variables :

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{N1} & x_{N2} & \dots & x_{Nn} \end{bmatrix}$$

Les composantes principales de cette matrice sont les combinaisons linéaires des variables x_1, x_2, \dots, x_n :

$$y_i = b_{i1} x_1 + b_{i2} x_2 + \dots + b_{in} x_n = b_i' x$$

dont les variances sont maximales.

Remarque : le calcul de ces composantes principales est complètement indépendant des natures des distributions des variables dont les relations sont étudiées.

3) Principe de l'Analyse en Composantes Principales

Si le tableau de données comporte n variables quantitatives, chaque individu peut être représenté dans un "espace vectoriel à n dimensions". Un tel espace étant impossible à visualiser, le but de l'A.C.P. est de trouver des espaces comportant moins de dimensions, dits espaces réduits, dans lesquels il sera possible d'observer "au mieux" les individus.

Le nuage de points constitué dans l'espace à n dimensions a des directions d'allongement qui vont être recherchées et vont constituer les axes factoriels successifs et perpendiculaires de l'espace réduit. Les axes factoriels 1, 2, 3, ..., n permettent de représenter les points dans des plans 1x2, 1x3, 2x3, etc. qui donnent une meilleure visualisation de la dispersion des individus étudiés.

Les axes et les plans factoriels de l'A.C.P. ne correspondent pas aux variables initiales mais sont des "indices synthétiques" obtenus par combinaisons linéaires de ces variables initiales (TOMASSONE, 1975). Parmi tous les indices possibles, l'A.C.P. détermine d'abord celui qui permet de représenter le mieux les individus, c'est-à-dire celui pour lequel la variance des individus est maximale : cet indice est appelé 1^{ère} composante principale ou encore 1^{er} axe principal. Une certaine proportion

de la variation totale des individus est expliquée par cette composante principale.

Ensuite, une 2^e composante principale est définie, et ceci sous deux conditions :

- avoir une corrélation linéaire nulle avec la 1^{ère} (TRANCHEFORT, 1974).

- avoir, à son tour, la plus grande variance.

Cette 2^e composante principale fournissant ainsi la plus grande information complémentaire de la 1^{ère}.

Le processus se déroule jusqu'à obtention de la p^{ième} et dernière composante principale, les parts d'information expliquées par chacune d'elles devenant de plus en plus faibles.

4) Présentation des résultats de l'Analyse en Composantes Principales

L'observation des individus se fait sur les plans constitués à partir des composantes principales renfermant le plus d'information. Le plan défini par les axes 1 et 2 est appelé "plan 1x2" ou "plan principal". Selon la part d'information prise en compte par ce plan principal, il pourra ou non être intéressant d'examiner d'autres plans renfermant moins d'informations comme par exemple les plans 2x3, 1x3...

D'autre part, il est souvent important de connaître les variables "initiales" qui ont joué un rôle prépondérant dans la constitution des composantes principales et qui expliquent donc les positions des individus. C'est pourquoi il est intéressant de reporter sur ces plans les directions des variables initiales.

Il ne faut pas oublier cependant que les représentations graphiques ainsi obtenues ne donnent qu'une vision imparfaite de la réalité puisque la visualisation obtenue n'est que la projection en 2 dimensions d'un espace à n dimensions.

B - Recherche des noyaux d'affinités

Cette méthode a pour but de mettre en évidence des groupes de variables très corrélées et de découvrir ainsi d'éventuels phénomènes de redondance. La méthode des polygones ou diagrammes de BONNET (BONNET, 1964) permet de visualiser ces corrélations.

Les n caractères correspondant aux variables du tableau de mesure sont disposés sur la circonférence d'un cercle, de façon équidistante, en plaçant d'abord côte à côte les variables les plus corrélées. Tous ces caractères sont reliés entre eux par des segments de droite qui ont une épaisseur de trait proportionnelle à leur inter-corrélation.

Nous obtenons ainsi un certain nombre de polygones dont les sommets correspondent aux variables du tableau de mesure. Ces regroupements de variables sont nommés "noyaux d'affinité".

Nous pouvons donc, de cette manière, identifier puis éventuellement éliminer des variables qui sont très corrélées et apportent des informations redondantes sur les objets à l'étude.

C - Classification automatique

On désigne sous le nom de classification automatique (ou taxinomie, analyse typologique, "cluster analysis"), l'ensemble des processus aptes à être exécutés par ordinateur pour constituer des hiérarchies de classes (JAMBU et LEBEAUX, 1978), c'est à dire une suite de partitions emboîtées, de plus en plus fines, sur l'ensemble d'observations initial.

Une telle hiérarchie peut avantageusement être résumée par un arbre hiérarchique, ou dendrogramme, dont les noeuds symbolisent les subdivisions de l'échantillon, les éléments de ces subdivisions étant les objets placés à l'extrémité supérieure des branches auxquelles ils sont reliés (ROUX, 1985).

Parmi les méthodes existantes (JAMBU, 1978 ; CHANDON et PINSON, 1981 ; BENZECRI et al., 1984 ; LEGENDRE et LEGENDRE, 1984 ; ROUX, 1985), nous avons opté pour la classification ascendante hiérarchique (C.A.H.).

Les individus sont positionnés dans un espace vectoriel à autant de dimensions que la matrice d'observation possède de variables, chaque axe correspondant à une variable.

Dans un premier temps, la C.A.H. passe par le calcul d'une distance inter-individus. L'A.C.P. étant fondée sur la distance euclidienne, nous avons choisi cette même métrique par souci d'homogénéité. Cette opération aboutit à la constitution d'une matrice de proximité inter-individus.

Dans un second temps, un algorithme d'agrégation (critères: classification ascendante, distance euclidienne maximale) permet, par étapes successives, de réunir les individus les plus proches. A la fin de chaque étape, les distances entre le groupe nouvellement créé et les individus restants sont recalculées. Le processus est réitéré jusqu'à ce que tous les individus soient réunis dans un seul groupe. L'ensemble des résultats est présenté graphiquement sous forme d'un dendrogramme (Fig 5).

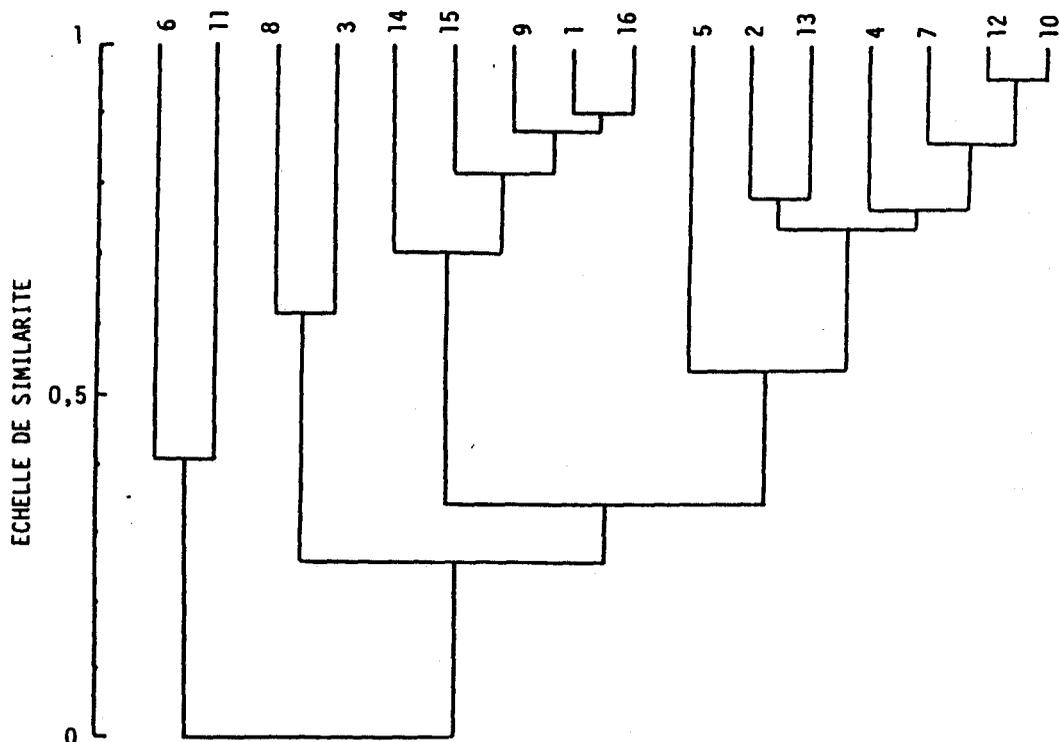


FIGURE 5 : Exemple de dendrogramme réalisé par une classification ascendante hiérarchisée à partir d'un groupe de 16 cellules prises au hasard dans notre population générale et numérotées de 1 à 16 (critère d'agrégation : distance Euclidienne maximale). Les cellules 6 et 11 sont nettement dissociées du reste de la population considérée ici.

Cette méthode est complémentaire des ordinations en espace réduit utilisées dans cette étude: A.C.P., A.F.D., D^2 de MAHALANOBIS. Elle a de plus valeur critique, permettant en particulier d'identifier les observations aberrantes ou exceptionnelles qui pourraient nuire à l'analyse multivariable.

D - Analyse Factorielle Discriminante (A.F.D.)

1) Introduction

L'analyse factorielle discriminante (A.F.D.), dite aussi analyse canonique, peut être considérée comme une généralisation de la fonction discriminante introduite par FISHER en 1938. Pour cette analyse, les différentes observations sont réparties à priori en groupes et ne sont donc pas au contraire de l'A.C.P. considérées comme équivalentes et donc ne sont pas réunies en une seule matrice d'observations.

L'analyse multivariable est alors réalisée en intégrant aux calculs l'appartenance des individus à un groupe. Cette analyse permet ainsi de vérifier la constitution des groupes établis par l'A.C.P..

2) Définition

Dans le cas de l'A.F.D., nous avons g populations comportant N_1, N_2, \dots, N_g observations, toutes avec n variables x_1, x_2, \dots, x_n .

Les matrices d'observations sont de la forme :

$$X_k = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{N1} & x_{N2} & \dots & x_{Nn} \end{bmatrix}$$

A chacune d'elles correspond une matrice de dispersion:

$$P_k = \begin{bmatrix} p_{11} & \dots & p_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ p_{n1} & \dots & p_{nn} \end{bmatrix}$$

une matrice de covariance :

$$V_k = \frac{1}{N_k - 1} P_k = \begin{bmatrix} v_{11} & \dots & v_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ v_{n1} & \dots & v_{nn} \end{bmatrix}$$

et un vecteur point moyen :

$$\bar{x}_k = (\bar{x}_{k1}, \bar{x}_{k2}, \dots, \bar{x}_{kn})$$

Ces g points moyens, centres des g ellipsoïdes de dispersion des g populations, constituent eux-mêmes une matrice :

$$\bar{X} = \begin{bmatrix} \bar{x}_{11} & \bar{x}_{12} & \dots & \bar{x}_{1n} \\ \bar{x}_{21} & \bar{x}_{22} & \dots & \bar{x}_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \bar{x}_{g1} & \bar{x}_{g2} & \dots & \bar{x}_{gn} \end{bmatrix}$$

à laquelle correspond une matrice de covariance que nous appellerons "matrice inter-populations" et que nous désignerons par :

$$A = \begin{bmatrix} a_{11} & \dots & a_{1n} \\ \dots & \dots & \dots \\ a_{n1} & \dots & a_{nn} \end{bmatrix}$$

Les dispersions des populations étant supposées homogènes, nous pouvons définir la matrice moyenne de dispersion :

$$P = P_1 + P_2 + \dots + P_g$$

et une matrice moyenne de covariance, dite "matrice intra-population" :

$$V = \frac{1}{\sum N_{k-g}} P$$

L'A.F.D. consiste à rechercher les axes sur lesquels les centres des populations se projettent avec le maximum de dispersion, ce qui revient à calculer les composantes principales de la matrice X des points moyens et à définir les nouvelles variables :

$$y_i = c_{i1}x_1 + c_{i2}x_2 \dots + c_{in}x_n = c'_i X$$

telles que :

$$c'_i V c_i = 1$$

Ce qui est équivalent à rendre égales à l'unité les variances de tous les y_i .

3) Présentation des résultats

Comme pour l'A.C.P., les variables et les individus sont représentés dans un espace vectoriel à autant de dimensions qu'il y a de variables dans les matrices d'observations. Chaque axe discriminant étant lui-même constitué à partir des variables initiales selon le même principe qu'en A.C.P..

Pour chaque groupe d'individus, un centre de gravité est calculé. L'analyse discriminante teste alors la position de chaque individu du groupe par rapport au centre de gravité de son groupe et vérifie ainsi la bonne appartenance de l'individu au groupe. Dans le cas contraire, la position de l'individu est testée par rapport aux centres de gravité des autres groupes et sa réaffectation est ainsi réalisée.

Dans notre étude, les groupes testés par l'A.F.D. sont les groupes cellulaires mis en évidence par l'A.C.P..

E - Distance Généralisée de MAHALANOBIS (D^2 de MAHALANOBIS)

1) Introduction

La méthode du D^2 de MAHALANOBIS, comme l'A.F.D., permet de situer plusieurs populations dans un espace à n dimensions (n étant le nombre de variables) et de déterminer dans quelle mesure ces populations peuvent être distinguées les unes des autres. Chronologiquement, c'est la première des analyses multidimensionnelles (MAHALANOBIS, 1927 ; 1930 ; 1936). A l'origine, elle consistait à calculer des "distances" entre populations, et ce n'est qu'en 1952 avec RAO que les représentations géométriques et les projections ont été développées.

2) Définition

Comme en A.F.D., la méthode est appliquée à g populations comportant N_1, N_2, \dots, N_g observations toutes avec n variables x_1, x_2, \dots, x_n . A chaque population correspond donc une matrice d'observations:

$$X_k = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{N1} & x_{N2} & \dots & x_{Nn} \end{bmatrix}$$

d'où l'on déduit g matrices de dispersion P_k , g matrices de covariance V_k et g points moyens :

$$\bar{x}_k = (\bar{x}_{k1}, \bar{x}_{k2}, \dots, \bar{x}_{kn})$$

Les matrices de covariances devant être homogènes, il est possible de définir une matrice moyenne des covariances V et une matrice moyenne des corrélations :

$$R = D_V^{-1/2} V D_V^{-1/2}$$

Soit alors la matrice inverse de R, R^{-1} , de terme général r^{ij} .
Entre deux populations quelconques p et q, les variances étant réduites,
le D^2 de MAHALANOBIS est défini par :

$$D_{pq}^2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (\bar{x}_{pi} - \bar{x}_{qi})(\bar{x}_{pj} - \bar{x}_{qj}) r^{ij}$$

Si on pose :

$$d_i = \bar{x}_{pi} - \bar{x}_{qi} \qquad d_j = \bar{x}_{pj} - \bar{x}_{qj}$$

$$d' = (d_1, d_2, \dots, d_n)$$

alors :

$$D_{pq}^2 = \sum \sum d_i d_j r^{ij} = d' R^{-1} d$$

3) Présentation des résultats

Entre les g populations, nous avons donc $g(g-1)/2$ distances du D^2 dont il est possible de dresser le tableau :

	2	3	4	g
1	D_{12}	D_{13}	D_{14}	⋮	D_{1g}
2		D_{23}	D_{24}	⋮	D_{2g}
3			D_{34}	⋮	D_{3g}
	-	-	-	⋮	-
	-	-	-	⋮	-
g-1	-	-	-	⋮	$D_{(g-1)g}$

La statistique : $D_{pq}^2 \times \frac{N_p N_q (N_p + N_q - n - 1)}{(N_p + N_q) (N_p + N_q - 2) n}$

utilisée comme un F avec n et $(N_p + N_q - n - 1)$ degrés de liberté permet de déterminer les populations qui sont significativement distinctes et de réunir éventuellement celles qui ne le sont pas.

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES D'ETUDES NEUROANATOMIQUES "IN VIVO"

I - LESIONS ELECTROLYTIQUES

A - Anesthésie

Les animaux sont mis à jeûn 12 heures avant l'intervention afin de faciliter l'anesthésie qui est réalisée par voie intrapéritonéale à l'aide d'un mélange Uréthane-NEMBUTAL dans les proportions de 45 mg d'Uréthane et de 2 mg de NEMBUTAL pour 100 g de poids.

B - Fabrication des électrodes

Les électrodes utilisées pour les lésions sont confectionnées à partir d'aiguilles entomologiques, de diamètre égal à 0,4 mm. Un fil métallique est tout d'abord soudé à l'extrémité renflée de l'aiguille, ce qui permet son raccordement à l'appareil d'électrocoagulation au moment de l'opération. L'aiguille est ensuite soigneusement recouverte d'une couche de vernis isolant et séchée à l'étuve à 60°C pendant 12 heures environ. Le vernis étant sec, la pointe de l'aiguille est mise à nu sur 0,7 mm à l'aide d'un scalpel. Cette opération est réalisée sous loupe binoculaire. La bonne isolation du reste de l'aiguille est alors vérifiée à l'aide d'un ohmmètre.

C - Lésions

L'animal étant placé dans l'appareil stéréotaxique, un trou de trépan d'environ 4 mm de diamètre est réalisé grâce à une fraise de dentiste. L'électrode est ensuite amenée à la surface de la dure-mère, puis descendue dans l'hypothalamus selon les coordonnées suivantes :

- Antéro-postérieure : + 10,2 mm.
- Latérale : 1,2 mm
- Profondeur : 8 mm.

La quantité de courant électrique utilisée pour l'électrocoagulation est de 30 mC (1 mA pendant 30 s ou 3 mA pendant 10 s).

Une fois la stimulation effectuée l'électrode est remontée. Le trou de trépan est rebouché avec du ciment dentaire et la plaie refermée par des agrafes.

L'animal est alors libéré de l'appareil stéréotaxique et placé dans une cage de réveil réchauffée par une lampe.

Un délai de 9 à 27 jours précède le sacrifice.

D - Obtention des fragments d'hypothalamus, de septum latéral et d'éminence médiane (Fig. 7)

1) Fixation par perfusion

A l'issue de la période de survie, le cerveau de l'animal est fixé par perfusion intracardiaque, dans les mêmes conditions que lors de la fixation par le fixateur de GOLGI indiquées page 9.

Le liquide de fixation est une solution de paraformaldéhyde-acide picrique (PAF) préparée d'après STEFANINI et al. (1967) modifié :

- 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 0,1M pH 7,4 (1), ce qui porte la concentration finale de paraformaldéhyde à 2%.

(1) : Composition du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 :

- . Na_2HPO_4 à 14,2 g/l d' H_2O : 800 ml
- . NaH_2PO_4 à 12 g/l d' H_2O : 200 ml

2) Dissection

Après la perfusion, l'animal est rapidement décapité. La boîte crânienne est ouverte et la tête est replacée dans l'appareil stéréotaxique. A l'aide d'une lame de rasoir fixée au micromanipulateur, une section parfaitement verticale est réalisée au plan antéro-postérieur + 11,2 mm, soit 1 mm en avant de la lésion. Cette section a pour but de séparer l'hypothalamus du septum.

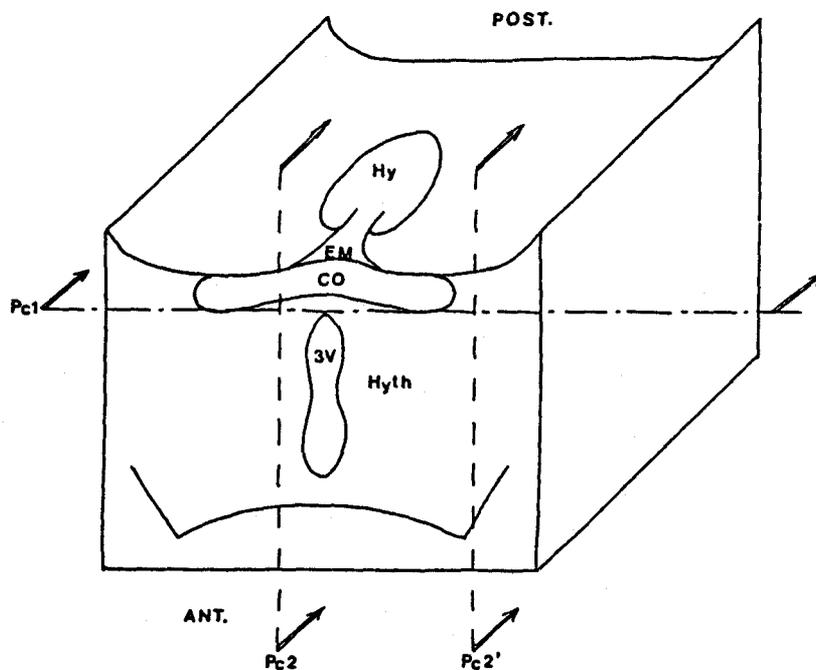


FIGURE 6 : Dissection de l'hypothalamus

La région contenant le chiasma optique (CO), l'éminence médiane (EM) et l'hypophyse (Hy) est séparée du reste de l'hypothalamus (Hyth) en sectionnant dans le sens antéro-postérieur selon le plan Pc1. Deux autres sections (en Pc2 et Pc2') délimitent la partie d'hypothalamus qui est conservée. La dissymétrie du fragment d'hypothalamus par rapport au 3^e ventricule (3V) facilitera son orientation.

L'encéphale est alors délicatement disséqué et les deux fragments contenant l'hypothalamus et le septum sont séparés et plongés dans le fixateur.

Après 1 h 30 de post-fixation, la région contenant le chiasma optique, l'éminence médiane (EM) et l'hypophyse est séparée du reste de l'hypothalamus (Fig. 6) à l'aide d'une lame de rasoir. Le fragment contenant le septum, ainsi que celui qui vient d'être obtenu et qui correspond à la région de l'EM, sont immergés dans une solution à 5% de saccharose dans le tampon phosphate pendant 12 heures. Le saccharose aura une action cryoprotectrice. Le fragment contenant l'hypothalamus est réduit bilatéralement mais de manière asymétrique pour des raisons d'orientation, et laissé dans le fixateur jusqu'à la confection des coupes à congélation.

3) Congélation des fragments de septum et d'éminence médiane

Les blocs contenant le septum et ceux contenant l'EM sont destinés à un examen immunocytochimique et doivent être congelés puis conservés à très basse température jusqu'au moment de la confection des coupes au cryostat. Pour éviter la formation de cristaux de glace nuisibles à la conservation des structures, la congélation doit être rapide et a été réalisée à l'azote liquide.

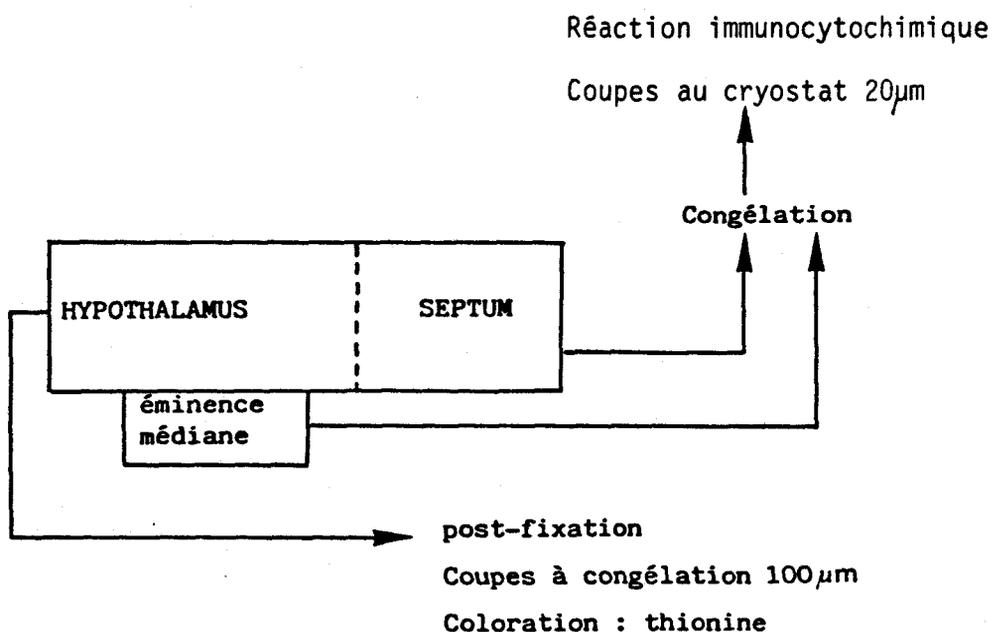


FIGURE 7 : Protocole de traitement des blocs de cerveaux ayant subi une lésion du noyau magnocellulaire dorsal.

Il est toutefois déconseillé de plonger les blocs directement dans l'azote liquide aussi l'utilisation d'un intermédiaire est-elle nécessaire : le méthyl-butane refroidi par immersion dans l'azote liquide.

Les blocs destinés à être congelés sont inclus dans du TISSUE-TEK à l'intérieur de récipients parallélépipédiques confectionnés par pliage d'une feuille d'aluminium. Ces récipients sont ensuite placés dans une petite boîte cylindrique dont le fond est percé de trous afin de faciliter le passage du méthyl-butane.

La boîte est plongée pendant 15 à 20 secondes dans le récipient contenant le méthyl-butane refroidi à l'azote liquide, puis le tout est amené dans l'azote liquide pendant une trentaine de secondes. Cette congélation en deux temps diminue les risques de cassure des blocs qui pourrait survenir s'ils étaient directement plongés dans l'azote liquide. En effet, le méthyl-butane permet de réaliser un palier intermédiaire de température entre -20°C et -198°C . De plus la pénétration du froid est meilleure par ce procédé car l'immersion directe dans l'azote liquide crée une couche d'azote gazeux autour de la pièce, nuisible à la bonne congélation de l'ensemble de celle-ci.

Après congélation, les blocs sont retirés de la boîte cylindrique et laissés dans l'azote liquide jusqu'au moment de leur stockage, qui s'effectue dans un congélateur, à -80°C .

E - Techniques histologiques et immunocytochimiques

1) Obtention des coupes

a - Coupes à congélation

Afin de localiser l'emplacement des lésions, des coupes transversales des blocs d'hypothalamus sont réalisées sur un microtome à congélation. Le microtome utilisé est un microtome à glissière de type 1300 (LEITZ) dont la platine porte-objet a été modifiée en platine à congélation, réfrigérée par un groupe KRYOMAT LEITZ 1700.

Les coupes sériées ont une épaisseur de $100\ \mu\text{m}$ et sont déposées dans des verres de montre remplis d'alcool gélatiné.

Obtention de l'alcool gélatiné :

- dissoudre 5 g de gélatine dans 1 litre d'H₂O distillée, à chaud et sous agitation.
- ajouter 1 litre d'alcool à 80°.

Les coupes sont ensuite disposées en ordre sur des lames numérotées, puis séchées pendant une journée à température ambiante.

b - Coupes au cryostat

Les blocs contenant le septum et ceux contenant l'EM, préalablement inclus dans le TISSUE-TEK et congelés, sont débités en coupes fines de 10 µm réalisées au cryostat. Pendant le refroidissement de l'enceinte et de la platine porte-objet, les blocs sont retirés du congélateur à -80°C et ramenés à -20°C. Dès que l'enceinte est à la température de -20°C, le bloc est fixé sur la platine porte-objet (à -40°C) à l'aide d'une goutte de TISSUE-TEK.

Une coupe sur 5 est récupérée et appliquée sur lame gélatinée portée à température ambiante.

Obtention des lames gélatinées

Les lames bien nettoyées sont plongées dans l'eau puis égouttées sans être séchées. Elles sont ensuite immergées quelques secondes dans une solution contenant 0,5 g de gélatine et 0,05 g d'alun de chrome pour 100 ml d'eau. Les lames égouttées sont conservées à -20°C.

2) Coloration des coupes à congélation

La coloration des coupes épaisses d'hypothalamus devait être choisie de telle manière que l'on puisse bien apprécier l'architecture de l'hypothalamus dans son ensemble mais aussi obtenir une coloration nette des cellules du NMD.

La technique de coloration à la thionine a donc été utilisée, selon le protocole suivant :

- immersion pendant 5 minutes dans un mélange de formol à 4% (50 ml) et d'alcool à 95° (200 ml) ;
- rinçage dans l'alcool à 95° ;
- réhydratation dans l'alcool à 70° puis dans l'eau distillée ;

- coloration dans une solution aqueuse de thionine 1% pendant 10 minutes;
- différenciation dans l'eau acétifiée à 1,5% puis dans l'alcool à 70° légèrement acétifié ;
- déshydratation;
- montage entre lame et lamelle.

Cette coloration révèle en bleu intense sur fond incolore les corps de Nissl et la chromatine des noyaux (GABE, 1968).

3) Réaction immunocytochimique sur les coupes au cryostat

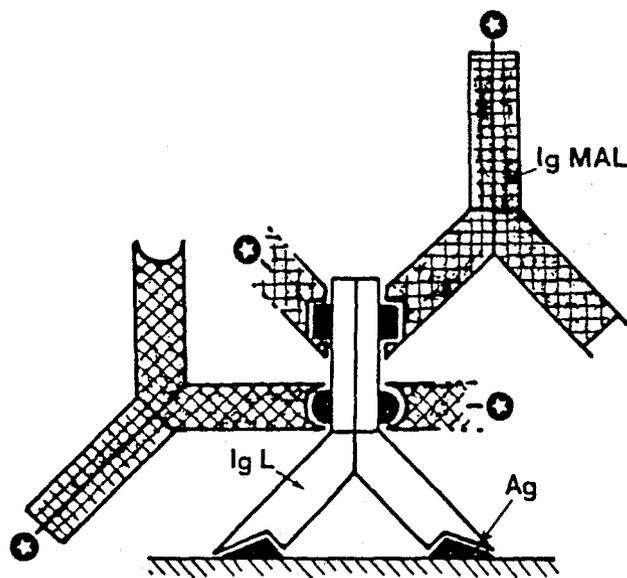


FIGURE 8 : Réaction immunocytochimique indirecte avec immunoglobulines entières (document G. TRAMU).

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

Ig.MAL : immunoglobuline de Mouton anti-immunoglobuline de Lapin marquée à la peroxydase (étoiles).

La réaction immunocytochimique utilisée pour mettre en évidence les fibres renfermant les enképhalines dans le septum et dans l'EM est de type indirect (COONS, 1978). Son principe est le suivant : un anticorps de

Lapin anti-enképhaline se fixe d'abord sur les enképhalines présentes, puis un anticorps de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin marqué à la peroxydase se fixe sur le premier anticorps. Par la suite, la révélation met en évidence la peroxydase (Fig. 8).

Deux sérums de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin conjugués à la peroxydase sont commercialisés par l'Institut Pasteur. Le premier est obtenu par couplage de la peroxydase sur les immunoglobulines entières (Fig. 8) alors que pour le second, seule la fraction Fab est utilisée. C'est ce dernier conjugué qui a été utilisé (Fig. 9).

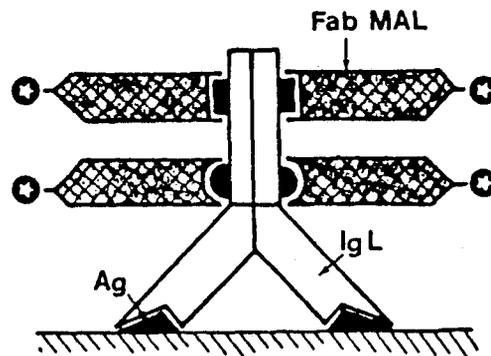


FIGURE 9 : Réaction immunocytochimique indirecte utilisant la fraction Fab seule (document G. TRAMU).

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

Fab.MAL : fraction Fab de l'immunoglobuline de Mouton anti-immunoglobuline de Lapin marquée à la peroxydase (étoiles).

Les anticorps dirigés contre la Met- et la Leu-enképhaline ont été produits d'après la procédure décrite par TRAMU et LEONARDELLI (1979). En utilisant l'un ou l'autre de ces anticorps, des résultats identiques sont obtenus, ce qui indique soit que la Met- et la Leu-enképhaline sont présentes aux mêmes sites, soit qu'une réaction croisée survient. Les tests de spécificité (TRAMU et LEONARDELLI, 1979, BEAUVILLAIN et al., 1980) ont montré qu'il existe en réalité une possibilité de réaction entre l'anticorps anti Leu-enképhaline et la Met-enképhaline. En conséquence, nos observations ne permettent pas d'effectuer la distinction entre les deux peptides et nous utiliserons le terme "enképhaline" lorsqu'il s'agira

de nommer l'anticorps ou la structure immunoréactive mise en évidence par cet anticorps.

L'anticorps de Lapin anti-enképhaline, est déposé sur les coupes de 10 μm (réalisées au cryostat) à raison d'une goutte par coupe (dilution de l'anticorps 1/250).

L'anticorps agit pendant 12 heures à 4°C puis, après rinçage dans du tampon de COONS pH 7,2 (1), l'anticorps de Mouton anti-immunoglobulines de Lapin est déposé de la même manière (dilution 1/60).

Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les lames sont rincées dans le tampon de COONS (1), puis immergées dans une solution de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (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 (2) et additionnés de 0,1 ml d' H_2O_2 à 0,003% .
- cette solution est appliquée quelques minutes sur les coupes et l'apparition du précipité brun est contrôlée au microscope.
- les coupes sont déshydratées et montées à l'EUKITT entre lame et lamelle.

(1) : Composition du tampon de COONS 0,1M pH 7,2 :

- . Véronal (diéthylmalonylurée) sodique 20,6 g
- . NaCl 85 g
- . HCl normal 80,6 ml
- . H_2O distillée 5 litres

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

(2) : Composition du tampon TRIS 0,1M pH 7,6 :

- . H_2O distillée 1 litre
- . TRIS (hydroxyméthyl) aminométhane 12 g
- . HCl normal 83 ml

4) Coloration de la myéline

A des fins de mise en évidence morphologique des faisceaux myélinisés, certaines coupes à la paraffine, obtenues à partir de blocs d'hypothalamus fixés au formol à 4%, ont été colorées au bleu luxol solide

selon le protocole suivant :

- déparaffinage ;
- coloration dans une solution de bleu luxol à 0,1% dans l'alcool à 95° acétifié, pendant 12 à 16 heures à l'étuve à 60°C ;
- rinçage dans l'alcool à 70° ;
- différenciation dans une solution aqueuse de carbonate de lithium à 0,05% ;
- rinçage dans l'eau ;
- contre-coloration dans une solution de rouge neutre à 1% dans l'eau pendant 2 minutes, puis dans une solution de crésyl violet à 1% dans l'eau pendant 30 à 60 minutes ;
- déshydratation
- montage entre lame et lamelle.

Cette coloration révèle en bleu profond les gaines de myéline, le cytoplasme en rouge et les corps de Nissl en violet.

II - IMPLANTATION DE PEROXYDASE ET DE FLUOROCHROMES SOUS FORME CRISTALLINE

A - Anesthésie

Pour la réalisation des implantations de cristaux de peroxydase dans le septum, les Cobayes ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'Uréthane à raison de 120 mg pour 100 g de poids. L'utilisation d'Uréthane est préférable à celle du mélange Uréthane-NEMBUTAL car il a été prouvé que les barbituriques réduisaient considérablement le transport intra-axonal de peroxydase (ROGERS et al., 1980) et qu'au contraire l'activité électrique des noyaux hypothalamiques était peu influencée par l'Uréthane (CROSS et DYER, 1971).

Pour les implantations de fluorochromes, le mélange Uréthane-NEMBUTAL a été utilisé.

B - Fabrication et remplissage des micropipettes

Des tubes de verre de 2 mm de diamètre extérieur sont étirés sur 1 cm à l'aide d'une étireuse verticale pour microélectrodes (NARISHIGE). La pointe est ensuite recassée sous loupe binoculaire à l'aide d'un scalpel pour obtenir un diamètre de 100 μm . Au préalable une tige métallique de 100 μm de diamètre (tire-nerf de dentiste) a été introduite par la grosse extrémité de la micropipette. Sous la loupe binoculaire, la position de la tige métallique est soigneusement ajustée de telle sorte que son extrémité arrive très précisément à la pointe de la micropipette. Un fragment d'étiquette DYMO est collé sur la tige en place, pour éviter que celle-ci ne puisse faire saillie hors de la pointe de la micropipette lors de l'implantation (Fig 10).

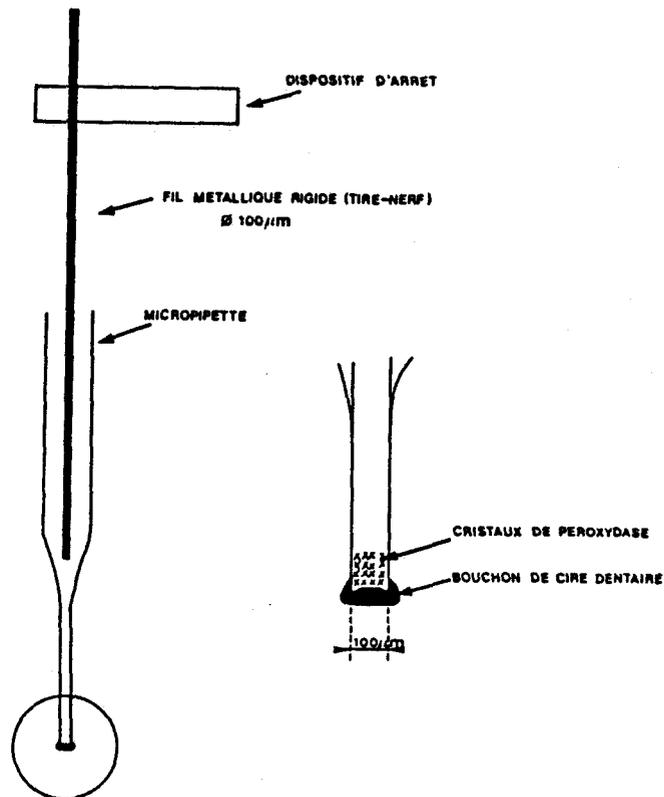


FIGURE 10 : Dispositif d'implantation des cristaux de peroxydase.

a) Représentation schématique de la micropipette et du dispositif d'éjection de la peroxydase.

b) Détail de l'extrémité de la micropipette.

La tige métallique est ensuite retirée et les cristaux de peroxydase (BOEHRINGER Grade I) ou de composés fluorescents : 4',6-diamidino-2-phénylindol (DAPI ; SIGMA) ou propidium iodide (PI ; SIGMA) sont introduits sur une longueur de 150 à 200 μm en tapotant délicatement la pointe de la micropipette dans un petit amas de produit. On scelle alors de manière étanche l'extrémité de la micropipette en lui faisant traverser une mince feuille de cire dentaire.

C - Intervention stéréotaxique

La micropipette contenant le traceur est introduite par stéréotaxie dans le septum latéral (SL), selon les coordonnées suivantes :

- Antéro-postérieure : + 12,3 mm
- Latérale : 1,2 mm
- Profondeur : 5 mm

La tige métallique de la micropipette est utilisée comme piston pour évacuer les cristaux de traceur ainsi que le bouchon de cire dentaire. La micropipette est laissée en place 30 minutes.

Dans le cas de l'implantation de peroxydase, le temps de survie a été de 24 heures. Pour les implantations de DAPI, ou de DAPI et de PI, il a été prolongé jusque 5 à 6 jours.

D - Injection de Colchicine

Dans les expériences comportant une détection immunocytochimique des enképhalines, une injection de Colchicine a été utilisée afin de bloquer le transport axonal du peptide et de provoquer son accumulation dans les péricaryons (BARRY et al., 1973).

Cette injection (75 à 100 µg de Colchicine dans 50 µl de NaCl 9%) est réalisée à l'aide d'une seringue HAMILTON placée verticalement dans l'appareil stéréotaxique et introduite dans le ventricule cérébral latéral selon les coordonnées suivantes :

- Antéro-postérieure : + 11,8 mm
- Latérale : 1,7 mm
- Profondeur : 4,5 mm

L'animal est maintenu en vie de 24 à 48 heures à la suite de cette intervention.

E - Techniques histologiques

1) Techniques relatives à la mise en évidence de la peroxydase

a) Perfusion

Après 24 heures, les animaux, sous anesthésie profonde au NEMBUTAL, sont perfusés avec une solution à 1,25% de glutaraldéhyde et 1% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 fraîchement préparé, puis par 500 ml d'une solution de saccharose à 10% dans le tampon phosphate.

b) Cryoprotection

Après dissection, le cerveau est laissé pendant 3 à 4 jours dans une solution de saccharose à 10% dans le tampon phosphate 0,1M jusqu'à confection des coupes.

c) Obtention des coupes

Elles sont réalisées à l'aide du microtome à congélation. Les coupes de 100 μ m sont sèriées et récupérées dans le tampon phosphate 0,1M.

d) Réaction histochimique

Suivant la technique de MESULAM (1978), les coupes sont incubées sous agitation pendant 15 minutes dans une solution contenant :

- 80 mg de nitroprussiate de sodium ;
- 5 ml de tampon acétate pH 3,3 (1);
- 92,5 ml d'eau distillée ;
- 5 mg de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dissous à 40°C dans 2,5 ml d'alcool absolu.

(1) : Composition du tampon acétate pH 3,3

. H ₂ O distillée	180 ml
. acétate de sodium	2,72 g
. HCl 1M	19 ml

Toujours sous agitation, les coupes sont laissées encore 15 minutes dans la même solution à laquelle on a ajouté 2 ml d'H₂O₂ à 0,3%.

L'étape de stabilisation du produit de réaction préconisée par MESULAM (1978) est supprimée en accord avec MESULAM et al. (1980). Les coupes sont donc ensuite rincées 6 fois dans le tampon acétate puis disposées sur lames gélatinées et séchées.

La coloration est effectuée dans une solution de rouge neutre à 1% dans le tampon acétate pendant 2 minutes, puis les lames sont déshydratées très rapidement, passées dans le toluène et enfin montées à l'EUKITT. Le chromogène utilisé (TMB) donne avec la peroxydase, en présence d'eau oxygénée, un produit de réaction bleu-noir facilement identifiable au microscope optique.

2) Techniques relatives à la mise en évidence des fluorochromes

a - Transport rétrograde

* - fixation par perfusion, cryoprotection

Dans le cas où le marquage des corps cellulaires par transport rétrograde ne doit pas être associé à une détection immunocytochimique des enképhalines, les cerveaux ayant reçu des applications de fluorochromes DAPI et/ou PI, sont fixés par perfusion intracardiaque de 500 ml de solution de formol à 4% dans du tampon phosphate 0,1M. Les cerveaux, après dissection, sont laissés une nuit dans le tampon phosphate contenant 10% de saccharose, à 4°C.

* - obtention des coupes :

Des coupes frontales du septum et de l'hypothalamus (30 à 50 µm d'épaisseur) sont réalisées au microtome à congélation, montées sur lame dans la gélatine 0,5%, séchées à température ambiante, déshydratées dans des bains d'alcool de degrés croissants, éclaircies dans un bain de toluène et placées sous lamelle dans du DePeX (GURR).

b - Couplage transport rétrograde-immunocytochimie

* - fixation par perfusion, cryoprotection

Lorsque le transport rétrograde de DAPI doit être associé à une détection immunocytochimique des enképhalines, les cerveaux sont fixés par perfusion intracardiaque de 500 ml de solution de PAF fraîchement préparée. Les cerveaux sont ensuite plongés, après dissection, dans le même fixateur pendant 1 heure, puis laissés 1 nuit dans le tampon phosphate contenant 10% de saccharose, à 4°C.

* - obtention des coupes :

Les blocs de tissu contenant l'hypothalamus sont congelés dans l'azote liquide puis coupés au cryostat (coupes de 25 μ m d'épaisseur). Ces coupes sont montées sur lame gélatinée et, après séchage, examinées au microscope à fluorescence. Celles qui contiennent des neurones marqués par le DAPI sont alors rapidement traitées par la technique immunocytochimique.

c - Immunocytochimie

Les sections sont incubées avec les antisérums anti-enképhalines à une dilution de 1/500 dans du tampon de COONS (pH 7,5) pendant 15 heures à 4°C. Après rinçage, les coupes sont incubées avec les Immunoglobulines (IgG) de Mouton anti-Lapin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Institut Pasteur Production, dilution 1/60) pendant 45 minutes. Les coupes sont finalement montées dans la glycérine tamponnée (glycérol tamponné à 10% par du tampon de COONS).

d - Observation microscopique

Les préparations sont examinées au microscope LEITZ - ORTHOPLAN équipé d'un illuminateur de fluorescence en lumière réfléchie PLOEMOPAK (source de lumière d'excitation : lampe au Xénon). Le dispositif accepte simultanément jusqu'à 4 blocs de filtres, ce qui permet de réaliser la fluorescence selon différentes longueurs d'onde pour une même préparation.

III - INJECTIONS IONTOPHORETIQUES DE PEROXYDASE

A - Fabrication et remplissage des micropipettes

Les micropipettes destinées aux injections iontophorétiques de peroxydase sont réalisées à partir de tubes de verre de type "Omega Dot", de diamètre extérieur 2 mm, contenant une fibre de verre pour faciliter le remplissage, étirés à l'aide de l'étireuse verticale NARISHIGE. Les pointes des micropipettes sont recassées sous microscope (CARETTE, 1978) pour obtenir un diamètre de 4 μ m environ. Elles sont ensuite remplies d'une solution de peroxydase à 20% à l'aide d'une seringue HAMILTON. Les 25 μ l de solution de peroxydase employés (BOEHRINGER, Grade I) sont préparés à partir d'un tampon TRIS 0,05M contenant 0,2M de KCl (AMTHOR, 1984).

B - Repérage électrophysiologique et injections de peroxydase

1) Enregistrement électrophysiologique

L'animal anesthésié à l'Uréthane (120 mg pour 100 g de poids) par voie intrapéritonéale est placé dans l'appareil stéréotaxique. La stimulation est obtenue à partir d'une électrode concentrique bipolaire insérée verticalement selon les coordonnées suivantes :

- Antéro-postérieure : + 12,3 mm
- Latérale : 1,2 mm
- Profondeur : 5 mm

Des impulsions de 0,5 ms à 1 Hz sont délivrées par un stimulateur isolé (DEVICES). L'enregistrement extracellulaire (NEUROLOG) des neurones du NMD est effectué à partir des micropipettes contenant la

péroxydase dont la fabrication est décrite dans le paragraphe précédent.

L'identification des neurones du NMD en réponse aux chocs appliqués au SL est basée sur les critères de l'activation antidromique : latence stable, réponse à haute fréquence, test de collision (FULLER et SCHLAG, 1976) lorsque les neurones déchargent de manière spontanée (Fig. 11).

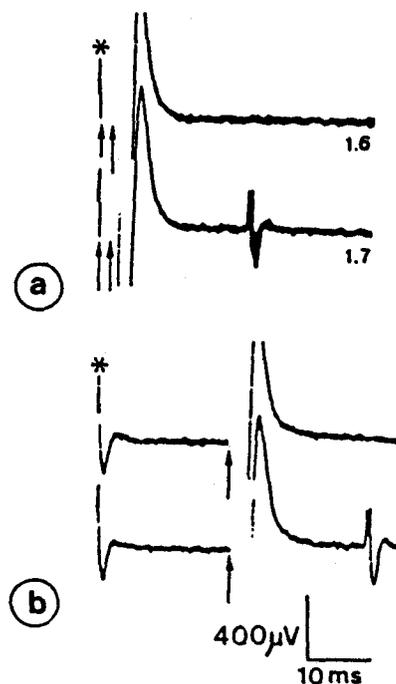


FIGURE 11 : Test de collision

Le test de collision est appliqué aux neurones du noyau magnocellulaire dorsal stimulés à partir du septum latéral.

a) Mesure de la période réfractaire absolue par deux chocs (flèches) séparés de 1,6 et 1,7 ms et appliqués après un potentiel d'action spontané (*).

b) Blocage de la réponse antidromique (observée sur le tracé du bas à droite) par collision lorsque le choc est appliqué 21 ms après un potentiel spontané (tracé du haut).

La valeur mesurée de l'intervalle de collision correspond bien à la valeur calculée du même intervalle (c'est-à-dire latence de la réponse antidromique 20 ms + période réfractaire absolue 1,7 ms).

2) Injection de peroxydase

Après identification antidromique de plusieurs neurones proches, ce qui indique avec certitude la situation de la micropipette dans le NMD, la peroxydase est expulsée par un courant continu positif de 500 nA appliqué pendant 5 minutes (MEDICAL SYSTEM CORPORATION).

L'animal est ensuite transféré dans une cage de réveil et maintenu en vie pendant 24 heures .

C - Obtention des coupes et techniques histologiques

Après une perfusion et une fixation du cerveau, l'ensemble de l'encéphale est débité en coupes sériées qui sont traitées par la méthode de révélation à la TMB (cf pp 42 et 43). Les coupes sont ensuite montées à l'EUKITT et observées au microscope optique.

IV - INJECTIONS INTRAVEINEUSES DE PEROXYDASE

A - Technique d'injection

Les injections ont été réalisées sur des animaux de 145 à 177g. Sous anesthésie à l'éther, les animaux sont placés en décubitus dorsal et la peau est incisée longitudinalement au milieu du cou. Une rapide dissection fait apparaître les veines jugulaires dont le trajet est partiellement masqué par les glandes parotides.

L'injection de peroxydase (BOEHRINGER, Grade I), à raison de 50 ou 100 µg dissous dans 0,5 ml de solution de NaCl à 0,9%, est opérée à l'aide d'une aiguille de 0,45 mm de diamètre, introduite dans l'une des veines. L'hémostase se fait lors du retrait de l'aiguille grâce à un tampon de COALGAN appliqué quelques instants sur la veine.

Le temps de survie après cette intervention est de 24 à 31 heures.

B - Techniques histologiques

La perfusion et la fixation du cerveau, ainsi que le traitement des coupes d'hypothalamus pour révéler la peroxydase par la méthode à la TMB sont identiques à ce qui a été décrit précédemment pages 42 et 43.

TROISIEME PARTIE

TECHNIQUES D'ETUDES NEUROANATOMIQUES "IN VITRO"

I - MATERIEL

Pour les études "in vitro" sur tranche d'hypothalamus, nous avons utilisé le système développé par POULAIN à partir d'une chambre de survie (Fig. 12) réalisée selon le modèle décrit par SCHWARTZKROIN (1975). Ce système permet un accès direct aux structures nerveuses, que ce soit pour des études électrophysiologiques (POULAIN et CARETTE, 1986, 1987) ou morphologiques (MITCHELL et al., 1988).

A - Confection des tranches d'hypothalamus

Pour l'obtention des tranches, l'animal est décapité et la boîte crânienne rapidement ouverte afin d'extraire le cerveau dans son entier. Celui-ci est immergé quelques secondes dans le milieu de survie refroidi à 6-10°C. Un parallélépipède d'environ 10 mm x 10 mm x 4 mm contenant l'hypothalamus est prélevé dans le cerveau. Ce bloc d'hypothalamus est alors collé sur le support d'un VIBROSLICE (CAMPDEN) par une goutte de cyanoacrilate. Les tranches frontales d'hypothalamus d'une épaisseur de 400 µm sont réalisées dans le milieu de survie refroidi. Elles sont récupérées au pinceau et immergées quelques minutes dans le milieu de survie à température du laboratoire. Elles sont finalement transférées dans la chambre de survie. Sept à 10 minutes sont nécessaires depuis le moment du sacrifice jusqu'à la mise en place des tranches (3 en général) dans la chambre de survie

FIGURE 12

Chambre de survie destinée à maintenir les tranches de cerveau "in vitro".

a) Vue d'ensemble du dispositif :

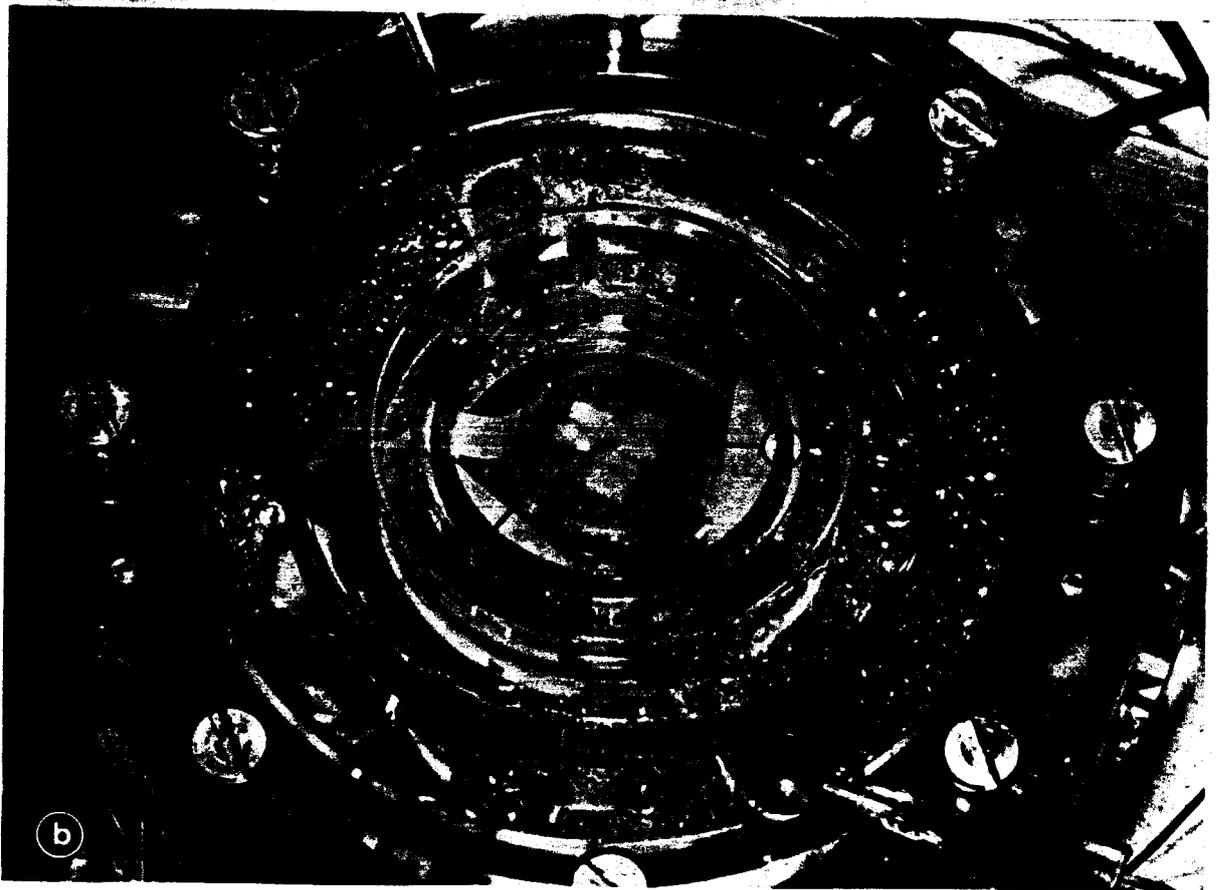
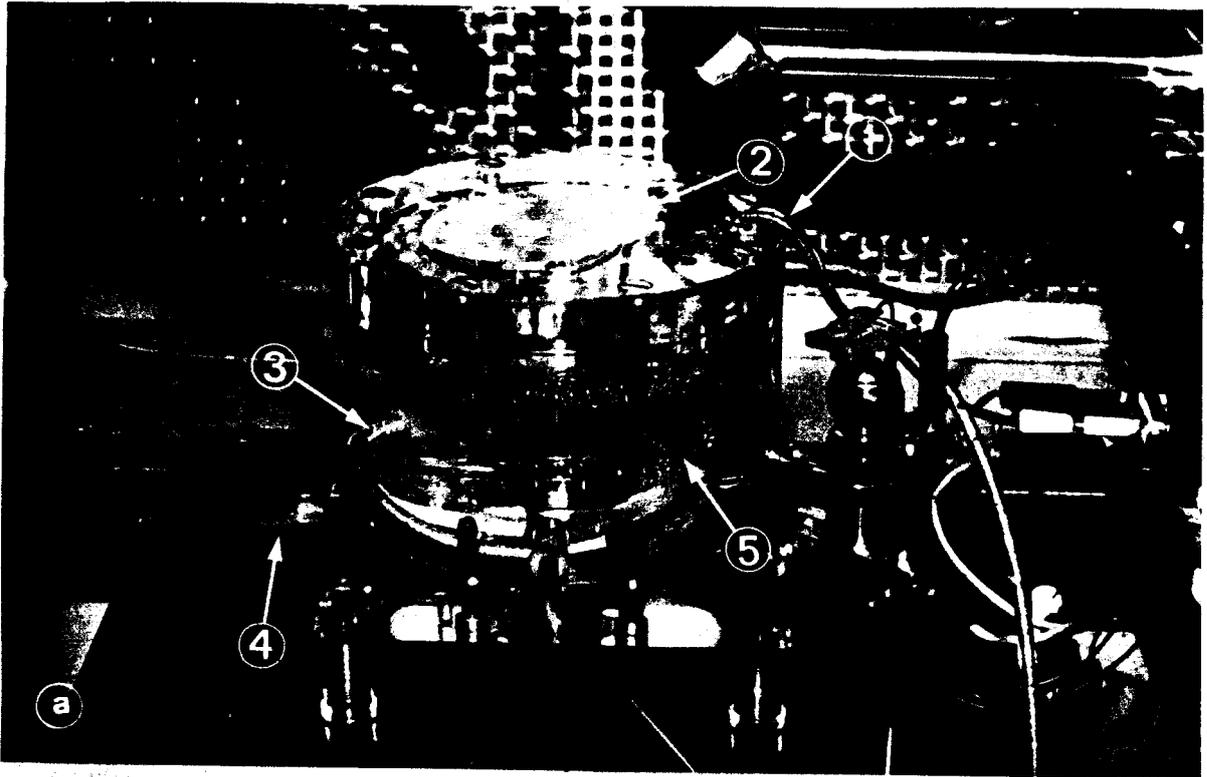
Le dispositif se compose de 2 parties distinctes :

- une partie inférieure : remplie d'eau distillée chauffée à 36°C qui servira à réchauffer et hydrater le gaz qui y est introduit. Le gaz arrive par les événements sur la partie supérieure de la tranche. Le liquide de perfusion circule dans un serpentin et est réchauffé par l'eau à 36°C.
- une partie supérieure où sont placées les tranches. Les tranches sont déposées sur un filet nylon recouvert d'un morceau de papier filtre. Elles sont imbibées par en dessous par le liquide de perfusion réchauffé. Elles sont oxygénées et hydratées par le gaz. Le liquide de perfusion, après avoir traversé les tranches, est aspiré et rejeté.

- 1) Dispositif d'aspiration par le vide du trop plein de liquide de perfusion
- 2) Partie supérieure de la chambre de survie
- 3) Résistance chauffante
- 4) Arrivée du liquide de perfusion
- 5) Oxygénation du liquide de perfusion

b) Vue de la partie supérieure de la chambre de survie :

- 1) Dispositif d'aspiration
- 2) Tranches de cerveau
- 3) Support de nylon recouvert de papier filtre
- 4) Piège à bulles



B - Survie des tranches

Dans la chambre de survie, les tranches sont délicatement déposées sur un carré de papier filtre reposant sur un filet de nylon. Les tranches sont maintenues en interface entre le milieu de survie circulant contre leur face inférieure et un mélange gazeux (95% O₂, 5% CO₂) dirigé vers leur face supérieure. Le mélange gazeux est humidifié et réchauffé dans la partie inférieure de la chambre remplie d'eau distillée maintenue à 36°C (Fig. 12a). Son débit est réglé de telle sorte qu'une buée modérée se dépose sur les parois autour des tranches. Le milieu de survie est constamment oxygéné. Il est amené au contact des tranches par une pompe péristaltique dont le débit est réglé à 2 ml/min.

La composition du milieu de survie est la suivante (YAMAMOTO, 1973) :

- NaCl	124	mM
- KCl	5	mM
- NaHCO ₃	26	mM
- KH ₂ PO ₄	1,24	mM
- CaCl ₂ (2 H ₂ O)	2,4	mM
- Mg SO ₄ (7 H ₂ O)	1,3	mM
- Glucose	10	mM

II - INJECTIONS IONTOPHORETIQUES DE PEROXYDASE

A - Fabrication et remplissage des micropipettes

Les micropipettes sont fabriquées et remplies de la même manière que pour les injections iontophorétiques réalisées "in vivo" (cf page 45).

B - Injection de peroxydase

Après un temps d'incubation dans la chambre de survie de 1 à 3 heures, ce qui permet d'obtenir une certaine "transparence" de la tranche et donc une bonne visualisation des structures, le NMD est repéré à l'aide de la loupe binoculaire.

La micropipette remplie de peroxydase est reliée à une source de courant permettant l'iontophorèse (MEDICAL SYSTEM CORPORATION) et approchée du noyau grâce à un micromanipulateur NARISHIGE. Elle est ensuite enfoncée de 200 μm environ dans la tranche. La peroxydase est alors éjectée en utilisant des courants positifs de 100 à 500 nA pendant 3 à 10 minutes. Une fois cette injection de peroxydase réalisée, le circuit électrique est ouvert et la micropipette ressortie de la tranche en utilisant le micromanipulateur. La tranche est maintenue en survie pendant 5 heures.

C - Techniques histologiques

Les tranches sont retirées de la chambre de survie sur le papier filtre qui les supporte. L'ensemble est immergé dans le fixateur (identique à celui décrit page 42) pendant une à deux heures, puis dans le

tampon phosphate 0,1M contenant 10% de saccharose où il séjourne une nuit à 4°C.

Les tranches sont alors recoupées transversalement au microtome à congélation. Pour ce faire un petit support de TISSUE TEK est réalisé sur la platine refroidie du microtome puis sectionné avec le rasoir afin obtenir une surface plane et horizontale sur laquelle la tranche est déposée, papier filtre contre le support. La congélation de la tranche est très rapide et des coupes transversales de 50 μm sont effectuées et récupérées dans le tampon phosphate 0,1M. La procédure utilisée ensuite pour révéler la peroxydase est celle déjà décrite page 42.

III - INJECTIONS INTRACELLULAIRES DE LUCIFER YELLOW

A - Fabrication et remplissage des microélectrodes

Les microélectrodes destinées aux injections intracellulaires sont réalisées à partir de tubes de verre de type "Omega Dot" de diamètre extérieur 1 mm, étirés à l'aide d'une étireuse CAMPDEN. Elles sont immédiatement remplies d'une solution de LUCIFER YELLOW CH (LY ; FLUKA) à 5% dans du chlorure de lithium 0,25M à l'aide d'une seringue HAMILTON. Elles sont ensuite biseautées (AMTHOR, 1984) pour réduire leur résistance jusqu'à une valeur de 90 à 120 M Ω .

B - Injection de LUCIFER YELLOW

Les injections intracellulaires ont été réalisées "in vitro" sur tranches frontales d'hypothalamus contenant le NMD.

Les microélectrodes remplies de LY sont guidées sous contrôle visuel dans le NMD. Elles sont ensuite descendues par pas successifs de 2 μm à l'aide d'un NANOSTEPER. Les neurones empalés par les microélectrodes doivent, pour être injectés, présenter un potentiel de repos suffisamment bas (< -50 mV) et constant, une résistance membranaire bien développée et des potentiels d'action fins et de forte amplitude.

Après quelques minutes d'enregistrement intracellulaire stable (NEUROLOG), le LY est expulsé par un courant négatif. En règle générale, le courant utilisé est poussé jusqu'à 1 ou 1,5 nA, selon les possibilités de passage de courant offertes par la microélectrode, et appliqué le plus longtemps possible : de quelques minutes à 20 minutes. L'expulsion du LY est interrompue au moment où la dégradation de l'empalement est signalée par une modification des paramètres de départ.

Après l'injection, la microélectrode est remontée et la tranche laissée en place une heure environ avant d'être immergée dans le fixateur composé de formol du commerce à 4% dans un tampon phosphate 0,1M.

C - Techniques histologiques

Afin d'éviter une forte diminution de taille des neurones injectés au LY au cours de la déshydratation de la tranche (GRACE et LLINAS, 1985), un agent éclaircissant miscible à la fois avec les milieux aqueux et organiques a été choisi. Après fixation, les tranches sont donc transférées directement dans le diméthylsulfoxyde (DMSO ; SIGMA) où elles séjournent de 15 à 20 minutes. Après éclaircissement, elles sont montées entre lame et lamelle dans le même produit. Les lamelles sont lutées à la paraffine.

Les cellules injectées sont observées au microscope de fluorescence équipé du bloc de filtres pour lumière réfléchie E3. Elles sont dessinées et photographiées (EKTAKROME 800/1600, traitement poussé, ILFORD HP5).

RESULTATS

PREMIERE PARTIE
ETUDE MORPHOLOGIQUE DES
NEURONES DU
NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL

Dans le but de détailler la morphologie des neurones constituant le noyau magnocellulaire dorsal (NMD), tant au niveau des péricaryons que des arborisations dendritiques ou des directions axoniques, nous avons utilisé la technique d'imprégnation argentique de GOLGI modifiée ainsi que la technique d'injection intracellulaire du composé fluorescent LUCIFER YELLOW (LY). Les résultats obtenus à l'aide de ces deux techniques seront exposés successivement.

I - MORPHOLOGIE DES NEURONES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL MIS EN EVIDENCE PAR LA TECHNIQUE DE GOLGI MODIFIEE

Notre étude a porté sur 7 animaux. Une observation préalable au microscope optique (qui ne sera pas rapportée dans ce travail) a permis de constater une certaine hétérogénéité cellulaire dans le NMD (Fig. 13). Cette hétérogénéité n'était pas surprenante dans l'hypothalamus, où les "noyaux" décrits de manière anatomique sont en réalité constitués d'un grand nombre de types cellulaires. Toutefois, dans le cas du NMD, cette hétérogénéité aurait pu sembler improbable à première vue, si l'on considère ce noyau comme étant constitué chez le Cobaye d'une population homogène de neurones enképhalinergiques.

L'existence de plusieurs types de cellules présentant un aspect différent au sein du NMD nous a conduit à effectuer une étude statistique descriptive multivariable des composants de ce noyau. La difficulté à reproduire de manière parfaitement identique tous les paramètres de l'imprégnation argentique d'un animal à l'autre entraîne de grandes variations dans la qualité des résultats obtenus. Nous avons donc délibérément choisi d'effectuer les mesures et comptages cellulaires sur un seul animal, lequel présentait la meilleure qualité d'imprégnation et le plus grand nombre de cellules imprégnées dans la région du NMD. A partir de cet animal, l'étude statistique a porté sur 213 neurones. Elle a permis d'aboutir à l'identification de 4 types cellulaires différant par la forme de leur péricaryon, ainsi que par l'abondance et les ramifications de leurs dendrites. Ces résultats seront présentés dans un 1^{er} chapitre.

FIGURE 13

Microphotographie à faible grossissement d'une demi coupe frontale d'hypothalamus imprégnée par la méthode de GOLGI modifiée.

Barre de calibration : 250 μm



La méthode d'imprégnation utilisée n'a pas toujours permis d'obtenir une bonne imprégnation de l'axone. Lors de notre étude, seulement 47% des neurones imprégnés dans la région du NMD ont présenté un axone identifiable. C'est donc à partir de ces neurones qu'il a été possible d'étudier la position du cône d'émergence de l'axone, ainsi que de déterminer la direction prise par celui-ci. Pour des raisons mathématiques, le faible effectif de corps cellulaires présentant un axone visible nous a empêché d'intégrer ces données à l'étude statistique multivariable. Dans un 2^e chapitre, nous présenterons les données relatives à l'aspect de l'axone, à son site d'émergence et à son orientation, en fonction des types cellulaires précédemment identifiés.

A - Analyse morphométrique des péricaryons et des prolongements dendritiques

L'ensemble des mesures effectuées sur les dessins des neurones réalisés à la chambre claire nous a fourni un ensemble de données constituant un tableau brut de format 213 lignes x 30 colonnes. Les 213 lignes correspondent aux 213 cellules participant à l'analyse et les 30 colonnes aux 30 variables mesurées sur chaque cellule (cf. p 14 à 17).

1) Obtention du tableau de données définitif

a - Tri des variables

L'observation initiale du tableau de données nous a obligé à effectuer une première sélection à l'intérieur des paramètres bruts (cf p 14 à 17). En effet, le principe de l'Analyse en Composantes Principales (A.C.P.) que nous employons ne permet pas le traitement de tableaux renfermant un grand nombre de valeurs nulles. De plus, le logiciel que nous utilisons (STAT-ITCF; SESI-ITCF, 1987) ne peut pas traiter des tableaux présentant des valeurs manquantes. Enfin le nombre de troncs dendritiques principaux et le nombre de segments dendritiques de 1^{er} ordre étant identiques dans 98% des cas, la variable SE1 a été éliminée. Ainsi nous avons donc dû, sur les 30 paramètres mesurés initialement, en éliminer 19. Paramètres éliminés : SE1, SE3, SE4, SE5, SE6, SE7, DE3, DE4, DE5, AN3, AN4, AN5, T01, T02, T03, T04, T05, AX0 et AXT. Pour ne pas

perdre l'ensemble de ces informations, nous avons créé, à partir de ces 19 paramètres éliminés, 7 nouveaux paramètres synthétiques.

$$SN = \sum_{i=1}^7 SN_i$$

$$LTD = \sum_{i=1}^5 DE_i$$

$$ANT = \sum_{i=1}^5 AN_i$$

$$DIA = \frac{XXX}{YYY}$$

$$RAP = \frac{LON}{LAR}$$

$$SUR = \sum_{i=1}^5 \frac{10 \cdot \pi}{360} \cdot DE_i \cdot AN_i$$

$$SUF = 10 \cdot \pi \cdot XXX \cdot YYY$$

L'étude des corrélations portera donc sur un tableau de 18 variables (11 paramètres mesurés et 7 paramètres synthétiques) pour 213 observations.

b - Etude des corrélations entre variables

Une première étude des corrélations (Fig. 14a) entre les 18 variables retenues nous a amené à la construction d'un diagramme de BONNET (BONNET, 1964) (Fig. 14b).

Ce diagramme permet de mettre en évidence une très forte corrélation d'une part entre le nombre total de segments dendritiques (SN) et le nombre total de terminaisons dendritiques observées (TER) et d'autre part entre la longueur du corps cellulaire (LON) et le rapport longueur sur largeur du corps cellulaire (RAP). Il faut de plus remarquer un noyau d'affinité de variables intercorrélées qui apportent donc une information redondante et qui, pour cette raison, seront éliminées. Les variables que nous conserveront pour effectuer notre A.C.P. seront donc :

LON = plus grande longueur du corps cellulaire

LAR = plus grande largeur du corps cellulaire,

perpendiculaire à la longueur définie précédemment

FIGURE 14

Etude des 18 variables correspondant aux paramètres mesurés et aux paramètres synthétiques :

a) Matrice des corrélations entre les 18 variables retenues.

b) Diagramme de BONNET mettant en évidence les noyaux d'affinité entre les 18 variables :

■ : Corrélations supérieures à 0,9

■ : Corrélations comprises entre 0,8 et 0,9

— : Corrélations comprises entre 0,7 et 0,8.

- SN = nombre total de segments dendritiques
 DPI = nombre de troncs dendritiques principaux
 DIA = rapport de la longueur de la projection orthogonale du champ dendritique dans le plan du 3^e ventricule sur celle de sa projection orthogonale dans un plan perpendiculaire horizontal
 AN1 = angle de recouvrement de la dendrite de rang 1
 SE2 = nombre de segments dendritiques de 2^e ordre
 ANT = angle total de recouvrement de toutes les dendrites
 AN2 = angle de recouvrement de la dendrite de rang 2
 XXX = mesure de la projection orthogonale du champ dendritique dans le plan du 3^e ventricule
 SUR = estimation de la surface de recouvrement du champ dendritique
 LTD = longueurs cumulées de tous les troncs dendritiques

c - Classification Automatique

Cette analyse permet d'effectuer une classification des individus en fonction de leur degré de ressemblance. Le principe est de placer tous les individus de l'analyse dans un espace à 12 dimensions (correspondant ici aux 12 variables retenues), puis d'estimer leur degré de ressemblance par la distance euclidienne qui les sépare les uns des autres. Plus cette distance est grande, plus les individus sont différents. Une première analyse a permis de constater que la population totale étudiée était constituée, dans l'espace, d'un groupe important et compact de cellules et d'un petit nombre de cellules dispersées dans différentes directions de l'espace. Pour pouvoir éclater le grand groupe compact de cellules et y distinguer des sous-groupes à morphologie différente, ces cellules dont la dispersion est très forte doivent être éliminées (17 cellules).

Les résultats de cette analyse se présentent sous forme d'un arbre hiérarchique où les groupes de cellules sont d'autant plus différents que leur séparation du rameau principal se produit plus près de la base de l'arbre.

d - Tableau de données définitif

Ces différentes études permettent d'obtenir un tableau de données final constitué de 196 lignes (cellules) et de 12 variables. Bien que réduit par rapport au tableau de données brut, ce tableau est difficile à analyser par des méthodes statistiques classiques telle que l'Analyse de la Variance.

Une première méthode d'analyse consisterait à étudier ce tableau variable par variable, à construire un histogramme pour chacune d'elles et à essayer de caractériser les populations en comparant ces histogrammes deux à deux. A cette façon de procéder nous avons préféré une approche tenant compte de la totalité de l'information contenue dans le tableau de données, et non pas d'une information découpée en autant de colonnes qu'il y a de paramètres morphométriques. Pour analyser globalement ce tableau, nous emploierons une méthode statistique multidimensionnelle : l'A.C.P., utilisée depuis longtemps dans de nombreuses disciplines : Sociologie (COOLEY et LOHNES, 1971), Ecologie (ROMANE, 1972 ; KERSHAW, 1973), Géographie (KING, 1969), Climatologie (MARTIN et DE SAINTIGNON, 1974 ; FABRE ET GUERRIER, 1980) et en Océanographie (IBANEZ, 1973 ; 1975), mais seulement depuis peu en Neuroanatomie (YELNIK et al., 1983; BRAS et al., 1987).

2) Analyse en Composantes Principales (A.C.P.)

Le but que nous poursuivons ici étant uniquement descriptif et non inférentiel, nous ne chercherons pas à donner une quelconque signification biométrique aux résultats de l'A.C.P..

L'observation des valeurs propres et de leur contribution à la variance totale (Tab. 1) nous indique que 81,3% de l'information initiale sont exprimés par les 5 axes synthétiques principaux, c'est-à-dire qu'en passant d'un espace à 12 dimensions à un espace réduit à 5 dimensions, seulement 18,7% de l'information sont perdus ce qui est acceptable à ce niveau de l'analyse statistique. Il est souvent admis en biométrie (TOMASSONNE, 1967; TORRENS-IBERN, 1972) que les seules valeurs propres significatives sont celles qui ont une valeur supérieure à l'unité, c'est-à-dire pour cette analyse les 4 premières valeurs (Tab. 1). Nous nous limiterons donc à l'observation des axes factoriels 1, 2, 3 et 4 et principalement aux plans 1x2, 2x3, 3x4 et 1x4, définis par ces 4 axes.

TABEAU 1 : Variances des valeurs propres et contribution de ces valeurs à la variance totale.

1E LIGNE : VALEURS PROPRES (VARIANCES SUR LES AXES PRINCIPAUX)
2E LIGNE : CONTRIBUTION A LA VARIATION TOTALE (POURCENTAGES EXPLIQUES PAR LES AXES PRINCIPAUX)

4.4018	1.6820	1.4385	1.2668	0.9599
36.7 %	14.0 %	12.0 %	10.6 %	8.0 %

a - Etude des plans factoriels

Pour interpréter correctement les informations contenues dans l'étude des variables, il faut tenir compte des points suivants :

1° - Dans un plan, une variable participe d'autant plus à la ségrégation des individus que la somme des carrés des corrélations de cette variable (Tab. 2) sur les deux axes constituant ce plan est proche de 1.

TABEAU 2 : Corrélations et carrés des corrélations entre chaque variable et les axes principaux.

ETUDE DES VARIABLES

1E COLONNE : CORRELATIONS ENTRE LES VARIABLES ET LES AXES PRINCIPAUX
2E COLONNE : CORRELATIONS AU CARRE

VARIABLES	COMPOSANTES PRINCIPALES									
	AXE 1	AXE 2	AXE 3	AXE 4	AXE 5					
LON **	0.4104	0.1684 *	-0.1524	0.0232 *	0.0991	0.0098 *	0.5752	0.3309 *	0.5372	0.2886 *
LAR **	0.3570	0.1274 *	-0.2198	0.0483 *	-0.3678	0.1353 *	0.4008	0.1607 *	-0.0464	0.0022 *
SN **	0.8563	0.7333 *	0.0035	0.0000 *	-0.1369	0.0187 *	0.0309	0.0010 *	0.1161	0.0135 *
DPI **	0.2494	0.0622 *	-0.1766	0.0312 *	-0.6623	0.4386 *	-0.0153	0.0002 *	-0.5609	0.3146 *
DIA **	-0.2624	0.0688 *	-0.5271	0.2778 *	0.1722	0.0297 *	-0.6077	0.3693 *	0.1231	0.0152 *
AN1 **	0.4891	0.2392 *	0.2633	0.0693 *	0.6486	0.4207 *	0.1518	0.0230 *	-0.4095	0.1677 *
SE2 **	0.7265	0.5279 *	0.1358	0.0185 *	-0.3405	0.1160 *	-0.1715	0.0294 *	0.1069	0.0114 *
ANT **	0.8167	0.6669 *	0.4316	0.1862 *	0.0870	0.0076 *	-0.2742	0.0752 *	-0.0597	0.0036 *
AN2 **	0.5768	0.3327 *	0.3746	0.1403 *	-0.2467	0.0609 *	-0.4531	0.2053 *	0.3463	0.1200 *
XXX **	0.4810	0.2314 *	-0.7473	0.5585 *	0.2460	0.0605 *	-0.2458	0.0604 *	-0.0043	0.0000 *
SUR **	0.8690	0.7551 *	0.0091	0.0001 *	0.3737	0.1397 *	0.0225	0.0005 *	-0.1467	0.0215 *
LTD **	0.6990	0.4886 *	-0.5732	0.3286 *	-0.0336	0.0011 *	0.1045	0.0109 *	-0.0428	0.0018 *

Par exemple pour la variable LTD, dans le plan 1x2 :

$$\Sigma r^2 = (r_1)^2 + (r_2)^2 = 0,4886 + 0,3286 = 0,8172$$

Dans ce cas, on peut dire que 81% de l'information de la variable LTD sont représentés sur le plan principal (plan 1x2), alors que dans ce même plan principal, seulement 0,9% ($0,0622 + 0,0312 = 0,0934$) de l'information fournie par la variable DP1 sont représentés. Sur les cercles des corrélations correspondant à chacun des plans (Fig. 15 et 16), ce pourcentage est représenté par la longueur du vecteur propre correspondant à la variable, c'est-à-dire qu'une variable sera d'autant mieux représentée dans un plan que sa position dans le cercle des corrélations correspondant sera plus proche de la circonférence du cercle. C'est le cas par exemple des variables LTD et XXX dans le plan 1x2 (Fig. 15a). La contribution d'une variable à l'élaboration de l'un ou de l'autre des axes constituant le plan sera d'autant plus grande que l'angle formé par son vecteur propre et l'axe sera faible, ce qui est le cas par exemple des variables SN et SUR pour l'axe 1 dans le plan 1x2 (Fig. 15a).

2° - Deux variables seront dites anti-corrélées, c'est-à-dire que l'une augmentera alors que l'autre diminuera conjointement, si leurs vecteurs propres ont même direction mais des sens opposés, comme par exemple les variables DP1 et AN1 dans le plan 2x3 (Fig. 15b).

Nous pouvons donc observer que dans les plans factoriels retenus, les informations intervenant le plus dans le plan 1x2 (Fig. 15a) sont issues des variables LTD (longueur totale des dendrites principaux), XXX (longueur de la projection du champ dendritique sur le plan sagittal), SN (nombre de segments dendritiques total), SUR (surface dendritique totale) et ANT (angle total occupé par les dendrites principales). Dans ce plan, les variables SUR et SN interviennent uniquement dans la constitution de l'axe 1.

D'autre part, l'observation du plan 2x3 (Fig. 15b) nous indique que l'axe 3 est surtout constitué à partir des variables SUR et SN, mais aussi des variables DP1 (nombre de dendrites principales) et AN1 (angle du champ dendritique le plus long) qui sont de plus anti-corrélées.

Les plans 3x4 et 1x4 confirment ces observations (Fig. 16).

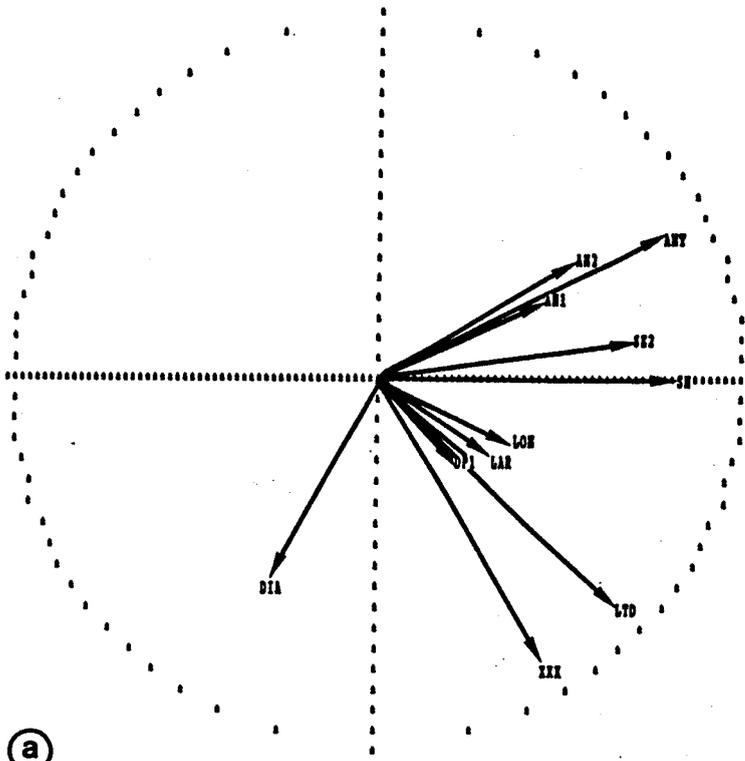
FIGURE 15

Cercles des corrélations des 12 variables, avec indication des vecteurs propres pour chacune d'elles, dans différents plans d'observation de l'espace réduit à 12 dimensions :

a) plan 1 x 2

b) plan 2 x 3

PLAN 1 2 AXE 1 HORIZONTAL AXE 2 VERTICAL

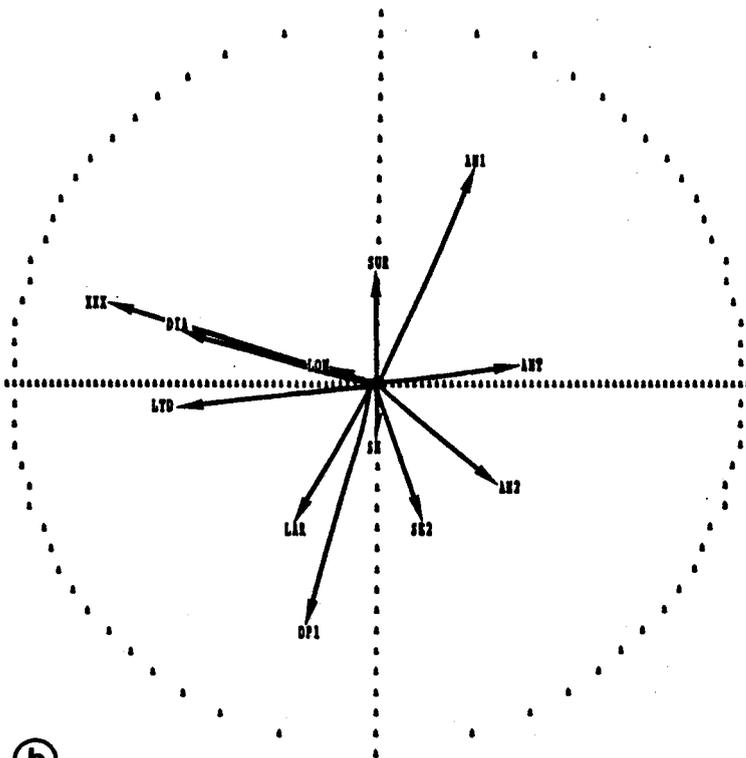


(a)

POINT VU : SH

POINT CACHE : SUR

PLAN 2 3 AXE 2 HORIZONTAL AXE 3 VERTICAL



(b)

FIGURE 16

Cercles des corrélations des 12 variables, avec indication des vecteurs propres pour chacune d'elles, dans différents plans d'observation de l'espace réduit à 12 dimensions :

a) plan 3 x 4

b) plan 1 x 4

b - Etude des individus

La répartition des individus est observée dans les mêmes systèmes d'axes que ceux déterminés pour l'étude des variables.

Chaque cellule (individu) est représentée par un point I_n dans un espace vectoriel à 12 dimensions toutes perpendiculaires entre elles. La position de ce point I_n est donc caractérisée par un vecteur OI_n (0 étant l'origine commune à tous les axes) résultat de la somme vectorielle de 12 vecteurs qui sont eux-mêmes le produit des coefficients caractéristiques du point I_n sur chaque axe par le vecteur unité.

Soient les vecteurs unités des 12 axes correspondants aux 12 variables :

$$\vec{u}_1, \vec{u}_2, \dots, \vec{u}_{12}$$

Soient les coefficients du point I_n sur ces 12 axes :

$$\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_{12}$$

Alors :

$$\vec{OI}_n = \alpha_1 \vec{u}_1 + \alpha_2 \vec{u}_2 + \dots + \alpha_{12} \vec{u}_{12}$$

Ces points rapportés à un espace euclidien à 12 dimensions de type \mathbb{R}^{12} sont donc tous caractérisés par un ensemble de 12 coordonnées.

$$I_n = \begin{bmatrix} \alpha_1 \\ \alpha_2 \\ \vdots \\ \alpha_{12} \end{bmatrix}$$

Le nuage de points I_n sera représenté par sa projection dans les plans constitués par la combinaison des axes synthétiques principaux (plans 1x2, 2x3, 3x4, 1x4). Ceci explique la présence dans chaque plan de points cachés. En effet, dans un plan deux points L et M remplissant les conditions $\alpha_L \approx \alpha_M$ et $\beta_L \approx \beta_M$ seront superposés du fait des limites de définition graphique des imprimantes utilisées et un seul d'entre eux sera visible. C'est le cas par exemple des points 36 et 52 dans le plan 1x2 (Tab. 3) (Fig. 17).

FIGURE 17

Visualisation selon le plan principal d'observation (plan 1 x 2) de la position de tous les individus de l'analyse dans l'espace réduit à 12 dimensions (les individus dont le numéro est précédé d'un S sont des individus supplémentaires placés dans l'espace réduit mais n'ayant pas participé à l'Analyse en Composantes Principales).

TABLEAU 3 : Etude des individus dans l'espace vectoriel à 12 dimensions (extrait du tableau total).

ETUDE DES INDIVIDUS

1E COLONNE : COORDONNEES DES INDIVIDUS SUR LES AXES PRINCIPAUX
2E COLONNE : COSINUS CARRES (QUALITE DE LA REPRESENTATION)

INDIVIDUS	AXE 1	AXE 2	AXE 3	AXE 4	AXE 5					
031 **	-0.2557	0.0031 *	-3.4343	0.5508 *	0.0929	0.0004 *	-1.6819	0.1321 *	0.6562	0.0201 *
032 **	-0.2730	0.0110 *	0.3159	0.0148 *	-1.4891	0.3279 *	-1.1187	0.1851 *	-0.4850	0.0348 *
033 **	-1.5978	0.4633 *	0.6638	0.0800 *	-0.3705	0.0249 *	-0.0190	0.0001 *	-0.3462	0.0218 *
034 **	1.3927	0.0450 *	4.4385	0.4571 *	0.6765	0.0106 *	-3.9840	0.3683 *	0.7044	0.0115 *
035 **	1.4582	0.2278 *	-1.5343	0.2522 *	0.2551	0.0070 *	-0.7343	0.0578 *	-0.4342	0.0202 *
036 **	-1.0658	0.2212 *	-0.0873	0.0015 *	-0.5835	0.0663 *	-0.1991	0.0077 *	1.6605	0.5368 *
037 **	-1.0330	0.0490 *	-3.8786	0.6913 *	-0.7830	0.0282 *	-1.6798	0.1297 *	-0.1817	0.0015 *
038 **	2.5800	0.5407 *	-0.9848	0.0738 *	-0.4889	0.0194 *	0.1419	0.0016 *	-0.7641	0.0474 *
039 **	-3.4073	0.8394 *	0.6172	0.0275 *	-0.3729	0.0101 *	-0.0474	0.0002 *	0.3723	0.0100 *
040 **	-1.2642	0.2064 *	-0.2056	0.0055 *	1.0447	0.1409 *	-1.7733	0.4061 *	0.4774	0.0294 *
041 **	-0.8546	0.1207 *	1.7943	0.5322 *	1.1194	0.2071 *	-0.0634	0.0007 *	0.1309	0.0028 *
042 **	1.4150	0.1887 *	-2.5268	0.6019 *	0.6273	0.0371 *	-0.1342	0.0017 *	-0.4603	0.0200 *
043 **	0.9512	0.0409 *	0.9327	0.0393 *	2.4957	0.2817 *	2.7457	0.3409 *	0.4806	0.0104 *
044 **	-1.5405	0.3587 *	0.2126	0.0068 *	-0.7655	0.0886 *	1.0540	0.1679 *	0.4599	0.0320 *
045 **	1.9186	0.5887 *	-0.4621	0.0342 *	0.0426	0.0003 *	1.0852	0.1883 *	-0.6092	0.0594 *
046 **	-1.5636	0.2144 *	0.1883	0.0031 *	1.7824	0.2786 *	0.6962	0.0425 *	0.7236	0.0459 *
047 **	1.0310	0.0434 *	0.4685	0.0090 *	0.2581	0.0027 *	2.7886	0.3174 *	3.1048	0.3935 *
048 **	4.7460	0.6585 *	-1.0494	0.0322 *	0.8433	0.0208 *	-0.3210	0.0030 *	1.6120	0.0760 *
049 **	1.4056	0.4229 *	-0.4953	0.0525 *	0.8659	0.1605 *	0.5540	0.0657 *	0.0602	0.0008 *
050 **	3.3451	0.5556 *	0.2389	0.0028 *	1.6583	0.1365 *	-0.2762	0.0038 *	-2.1841	0.2368 *
051 **	1.6873	0.4241 *	0.3552	0.0188 *	-1.0367	0.1601 *	0.3400	0.0172 *	-0.8162	0.0992 *
052 **	-0.9707	0.2483 *	0.0614	0.0010 *	0.7076	0.1319 *	1.1489	0.3478 *	-0.2322	0.0142 *
053 **	-1.7932	0.1087 *	-4.2222	0.6025 *	1.2837	0.0557 *	-1.9917	0.1341 *	1.3731	0.0637 *
054 **	-1.4574	0.4351 *	0.8327	0.1421 *	-0.0816	0.0014 *	-0.0886	0.0016 *	0.4895	0.0491 *
055 **	1.5795	0.3573 *	-0.2712	0.0105 *	-1.0671	0.1631 *	1.4946	0.3199 *	-0.2698	0.0104 *
056 **	1.7725	0.1876 *	1.9297	0.2224 *	2.7515	0.4521 *	-0.2801	0.0047 *	-1.4198	0.1204 *

Il faut remarquer toutefois que sur les 3 autres axes, les coordonnées de ces points peuvent être très différentes et donc ces points se trouver éloignés l'un de l'autre dans d'autres plans d'observations. C'est le cas de ces deux mêmes points 36 et 52 dans le plan 3x4 (Tab. 3).

$$\gamma_{36} = -0,5835 \quad \gamma_{52} = 0,7076$$

$$\delta_{36} = -0,1991 \quad \delta_{52} = 1,1489$$

FIGURE 18

Visualisation selon le plan d'observation 2 x 3 de la position de tous les individus de l'analyse dans l'espace réduit à 12 dimensions (les individus dont le numéro est précédé d'un S sont des individus supplémentaires placés dans l'espace réduit mais n'ayant pas participé à l'Analyse en Composantes Principales).

Il est de plus souvent admis que des individus sont bien représentés dans un plan quand la somme des carrés des cosinus des angles qu'ils font avec chacun des axes du plan est supérieure à 0,50 (PHILIPPEAU, 1986) et qu'ils sont assez bien représentés si cette somme est comprise entre 0,35 et 0,50. Seront donc sélectionnés pour chaque plan les individus pour lesquels cette somme est supérieure à 0,35 (sur les graphiques, ces individus retenus seront représentés par des points noirs).

Toute analyse commence par l'étude du plan 1x2 qui est porteur de la plus forte information. Le calcul en A.C.P. donne donc dans le plan 1x2, une répartition des individus représentée par la figure 17.

Nous obtenons la dispersion décrite par la figure 19a. Dans ce plan deux groupes de points se séparent nettement selon l'axe 1 (Fig. 19b) :

- en se référant à la figure 15a, un 1^{er} groupe très compact à gauche du plan, correspondant à de faibles valeurs des variables SN et SUR.

- un 2^e groupe plus étendu et plus diffus à droite du plan dont les caractéristiques correspondent principalement à de fortes valeurs de ces 2 mêmes variables SN et SUR.

- un 3^e groupe plus éclaté à faible effectif est partiellement individualisé des autres groupes selon l'axe 2 (Fig. 19b).

La même démarche est ensuite suivie dans le plan 2x3 (Fig. 18). Il faut noter, avant d'interpréter les répartitions des individus dans le plan 2x3, que tous les individus bien représentés dans ce plan 2x3 (à l'exception de 3 individus), appartenaient au groupe d'individus situé dans la partie droite du plan 1x2.

Donc, dans le plan 2x3, deux groupes de points se séparent selon l'axe 3 (Fig. 19c), c'est-à-dire, si on se reporte à la figure 15b, surtout selon les valeurs des variables DP1 et AN1.

Un 3^e groupe de points peut être isolé des deux précédents selon l'axe 2, ce groupe correspondant parfaitement au 3^e groupe de points éclaté observé sur le plan 1x2. Cette partition est à mettre en relation avec les valeurs des variables AN1 et DP1 (Fig. 19d).

FIGURE 19

- Indication (points) des individus valablement représentés dans les 2 plans principaux (c'est-à-dire les individus dont la somme des carrés des cosinus des angles qu'ils font avec les axes est supérieure à 0,35).

a) plan 1 x 2

c) plan 2 x 3

- Constitution des groupes cellulaires dans les plans correspondants:

b) plan 1 x 2

d) plan 2 x 3

————— : groupe I

----- : groupe II-III

••••• : groupe IV

En résumé, nous pouvons donc dire que les cellules de la région du NMD (correspondant aux points I_n) peuvent être classées en 3 grands groupes bien distincts et en un 4^e dont les caractéristiques sont moins précises.

Effectifs des groupes : - groupe I : 69 cellules
 - groupe II : 44 cellules
 - groupe III : 37 cellules
 - groupe IV : 13 cellules

Remarque : Le nombre total des cellules affectées à ces 4 groupes (163 cellules) diffère du nombre initial de cellules étudiées (196 cellules). Cette différence correspond à des cellules dont la position était isolée et excentrée par rapport aux nuages de dispersion correspondant à chacun des groupes dans l'espace euclidien représentatif à 12 dimensions. La classification automatique de tous ces points réalisée dans ces 12 dimensions a confirmé cette observation et nous a conduit donc à éliminer ces cellules des analyses ultérieures.

3) Analyse Factorielle Discriminante (A.F.D.)

Au contraire de l'A.C.P. qui est une méthode exploratoire, l'A.F.D. est une méthode confirmatoire qui permet de comparer à l'aide de plusieurs variables des groupes pouvant contenir un nombre différent d'individus. Avec une seule variable, cette méthode se confond avec l'analyse de variance à un facteur.

L'A.F.D. s'effectue sur l'ensemble des individus en prenant en compte leur appartenance à chacun des groupes, ceci dans un double but :

- de discrimination : c'est-à-dire de séparation des groupes ;
- de classement : c'est-à-dire d'affectation des individus à l'un des groupes.

Cette affectation se fait au groupe dont l'individu est le plus proche. Il sera donc possible de construire un tableau d'appartenance des N individus de l'analyse et de s'assurer ainsi du bien fondé de l'existence des groupes déduits de l'A.C.P.. De même que pour l'A.C.P., l'A.F.D. consiste à rechercher des variables synthétiques qui sont des combinaisons linéaires des variables initiales. Chaque variable

synthétique est caractérisée par :

- une valeur propre qui mesure son importance ;
- des coefficients qui définissent entièrement la combinaison linéaire des variables de départ.

Les variables, comme les individus, sont représentées dans un espace vectoriel dont les axes correspondent aux variables synthétiques.

L'A.F.D. permet ensuite de définir les variables qui participent le plus à la constitution des différents groupes. Pour chaque variable, notre programme calcule le quotient F de la distribution de FISHER, quotient qui tient compte à la fois du nombre d'individus et du nombre de groupes (Tab. 4). Ce quotient F calculé à partir de chaque variable est ensuite comparé au F de la distribution théorique de FISHER dont les valeurs sont (pour les degrés de liberté de cette analyse):

- au risque de 5%, $F = 8,54$
- au risque de 1%, $F = 26,1$.

Si la valeur du F calculé est supérieure à la valeur du F théorique correspondant, nous pouvons rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle les moyennes des 4 groupes sont égales. Dans ce cas donc, la variable considérée intervient de manière significative dans l'élaboration des groupes.

TABLEAU 4 : Etude par variable des variances et écarts-types résiduels et du quotient de la distribution de FISHER.

ETUDE PAR VARIABLE

VARIABLES	VARIANCES RESIDUELLES	ECARTS-TYPES RESIDUELS	F (3/ 159)	PROBA
LOH **	32.412	5.693	5.327	0.0%
LAR **	4.200	2.049	6.501	0.0%
SH **	9.084	3.014	39.927	0.0%
DPI **	0.310	0.557	20.410	0.0%
DIA **	0.668	0.817	19.465	0.0%
ANI **	509.025	22.562	62.038	0.0%
SE2 **	1.235	1.111	53.274	0.0%
ANT **	1400.625	37.425	49.175	0.0%
AY2 **	687.894	26.228	25.525	0.0%
XIX **	5606.352	74.876	57.166	0.0%
SUR **	49108580.000	7007.752	60.334	0.0%
LTD **	16177.309	127.190	38.875	0.0%

Les conclusions de cette analyse sont :

- les variables SN, AN1, SE2, ANT, XXX, SUR et LTD participent significativement à la constitution des groupes au risque de 1% ;
- les variables DPI, DIA et AN2 participent aussi à cette séparation des groupes mais au seuil de signification de 5% ;
- les variables LON et LAR ne participent pas significativement, au seuil de 5%, à la séparation de notre population initiale en 4 groupes distincts.

4) Distance Généralisée de MAHALANOBIS (D^2 de MAHALANOBIS)

Le D^2 DE MAHALANOBIS est une distance intergroupe. Son calcul tient compte d'une part de la distance entre les centres de gravité des différents groupes et d'autre part de la distance entre les individus et le centre de gravité de leurs groupes respectifs. Chaque valeur du tableau des D^2 de MAHALANOBIS (Tab. 5) correspond à la distance entre les groupes deux à deux.

TABLEAU 5 : Etude de la distance généralisée de MAHALANOBIS inter-groupe.

DISTANCES (D) de MAHALANOBIS ENTRE LES GROUPES

GROUPE					
No	1	2	3	4	
1	0.0000				
2	1.9384	0.0000			
3	2.0587	2.3504	0.0000		
4	2.9200	3.0685	3.0557	0.0000	

Pour pouvoir estimer le seuil de signification de ces valeurs, la transformée D' du D^2 de MAHALANOBIS doit être calculée et comparée à la distribution de FISHER :

$$D'_{pq} = D^2_{pq} \times \frac{N_p N_q (N_p + N_q - n - 1)}{(N_p + N_q) (N_p + N_q - 2) n}$$

Nous obtenons ainsi le tableau des D' intergroupes correspondant à des F calculés de la distribution de FISHER (Tab. 6).

TABLEAU 6 : Etude du D' à partir du D^2 de MAHALANOBIS
et seuils de signification du D' aux risques de 1 et 5%.

	gr1(69)			gr2(44)			gr3(37)			gr4(13)		
	D_{pq}^2	D_{pq}	F 1% 5%	D_{pq}^2	D_{pq}	F 1% 5%	D_{pq}^2	D_{pq}	F 1% 5%	D_{pq}^2	D_{pq}	F 1% 5%
gr1	0	0										
gr2	1,9384	6,0994	2,69 2,03	0	0							
gr3	2,0587	5,7808	2,69 2,03	2,3504	5,3818	2,78 2,07	0	0				
gr4	2,9200	3,6434	2,78 2,07	3,0885	3,3592	2,91 2,14	3,0557	3,1386	3,05 2,21	0	0	

Nous constatons grâce à ces valeurs que la constitution des groupes cellulaires 1, 2 et 3 peut s'effectuer en ne prenant qu'un risque de 1%. Par contre, la constitution du groupe 4 entraîne une prise de risque de 5%, ce qui confirme l'observation réalisée grâce à l'A.C.P..

Enfin, l'étude finale des individus de notre population indique une cohérence de 91,5% entre la partition résultant de l'A.C.P. et celle résultant de l'A.F.D. (les individus mal classés sont alors réaffectés aux groupes déterminés par l'A.F.D.).

5) Caractérisation statistique des groupes de cellules

Un calcul de paramètres statistiques classiques (moyenne, variance, écart-type) est réalisé pour chacune des variables, à l'intérieur des 4 groupes de cellules isolés plus haut.

Les figures 20 (a à f) et 21 (a à e) présentent les moyennes arithmétiques de chaque variable à l'intérieur de chaque groupe de cellules, ainsi que les intervalles de confiance aux risques de 5% et 1% (sauf pour DIA).

La figure 21f présente les valeurs de DIA, à savoir les rapports des moyennes des variables XXX et YYY ainsi que l'intervalle de confiance des moyennes (calculé suivant SCHERRER (1984)) de chacun des groupes aux risques de 1%, 5% et 10% par rapport à la valeur 1.

FIGURE 20

Diagrammes des moyennes arithmétiques de chaque groupe cellulaire et intervalles de confiance au risque de 5% et 1% pour les variables :

- a) LON
- b) LAR
- c) SN
- d) DP1
- e) AN1
- f) SE2

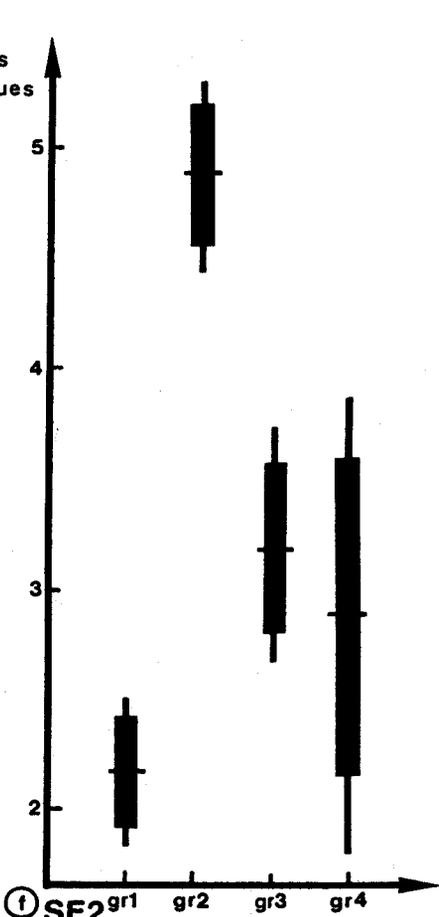
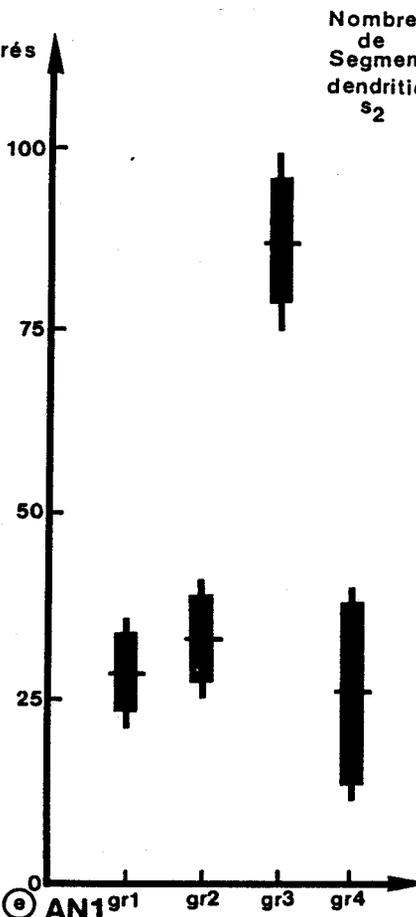
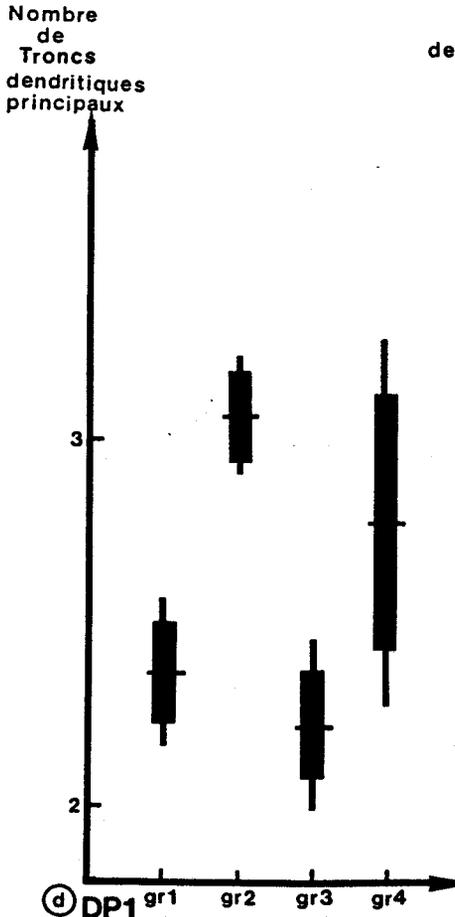
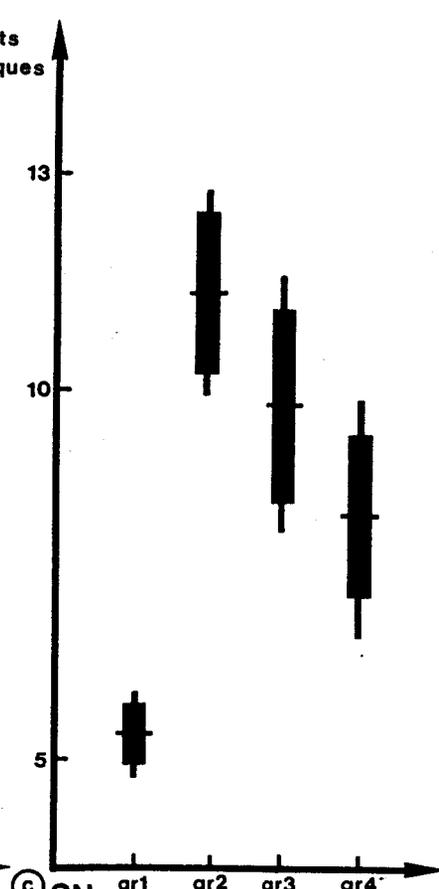
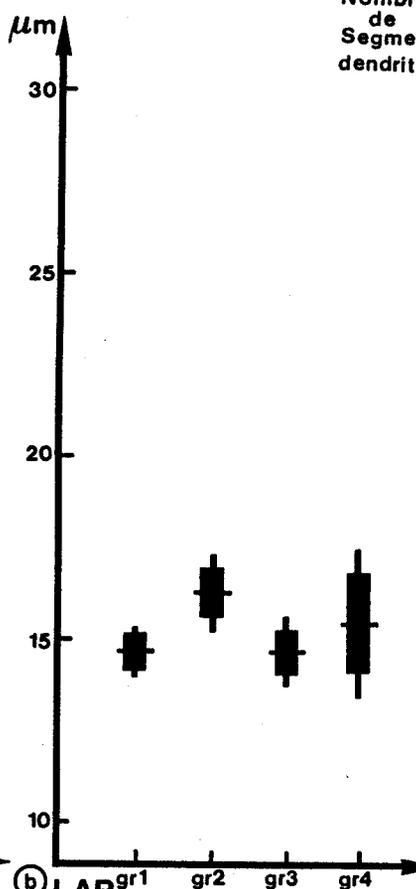
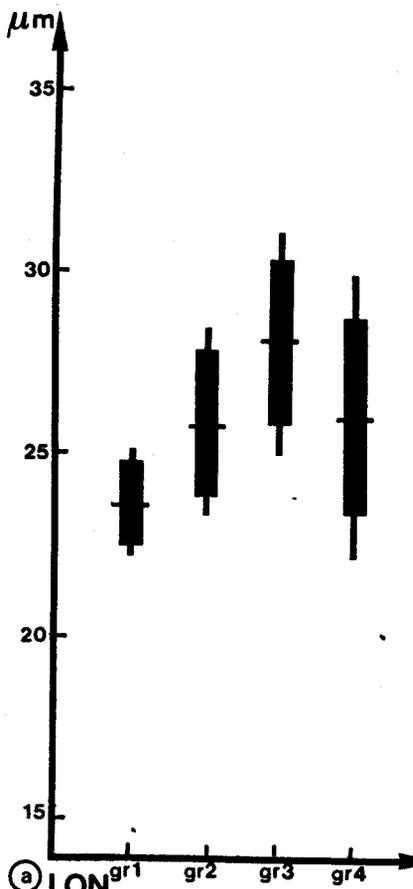


FIGURE 21

Diagrammes des moyennes arithmétiques de chaque groupe cellulaire et intervalles de confiance au risque de 5% et 1% pour les variables :

a) ANT

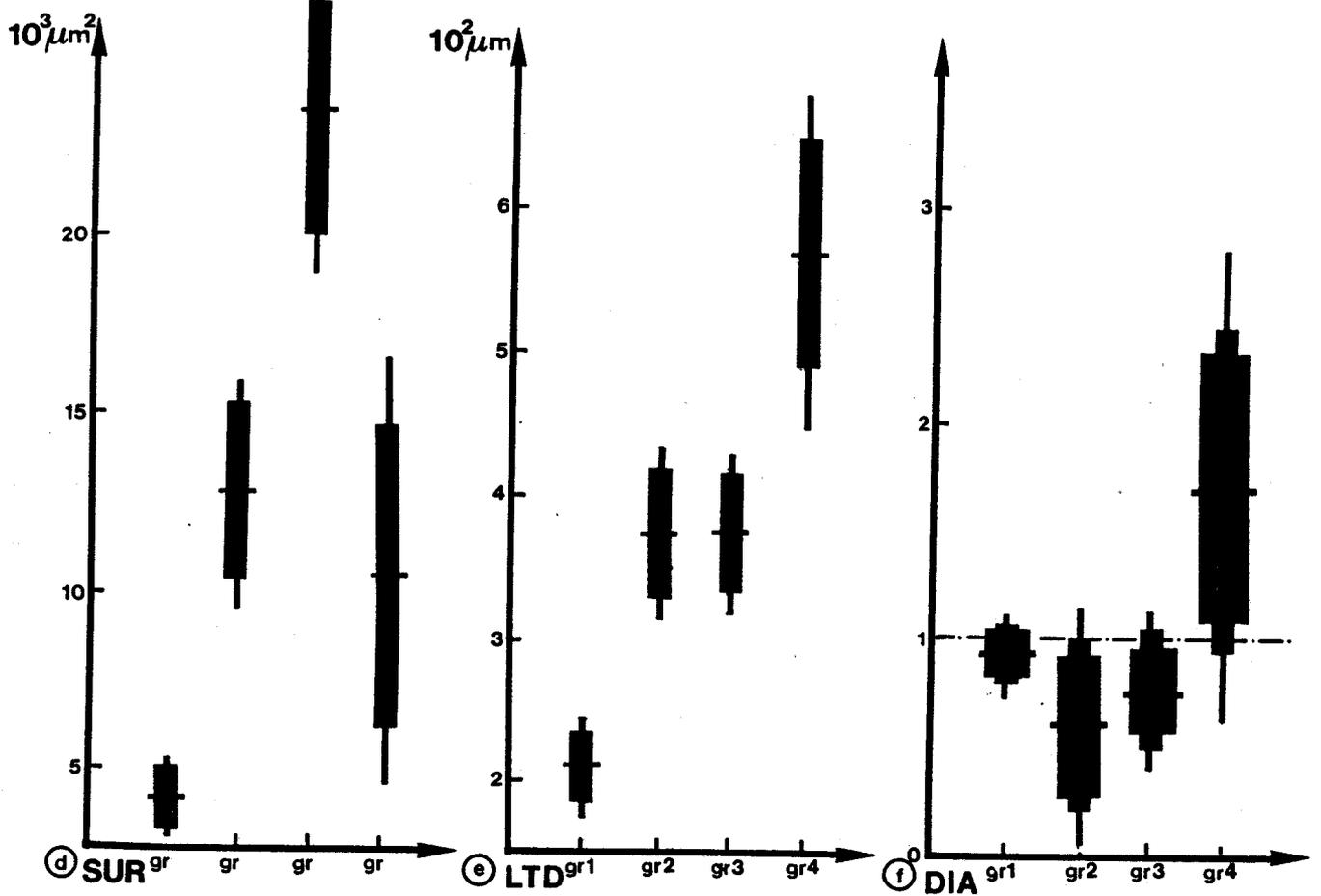
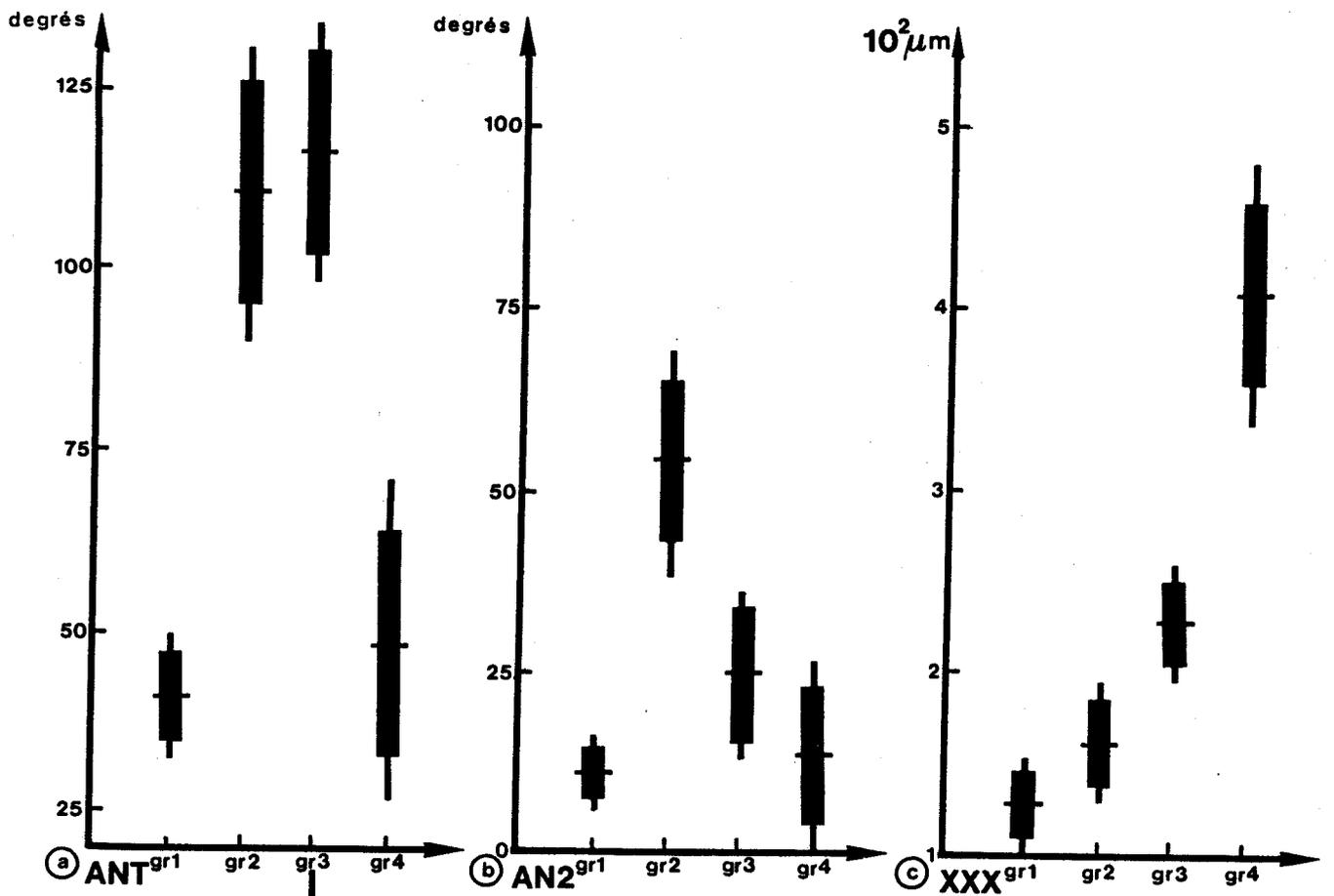
b) AN2

c) XXX

d) SUR

e) LTD

f) rapport des moyennes $\frac{XXX}{YYY}$ (correspondant à la variable DIA= $\frac{XXX}{YYY}$) et intervalles de confiance des moyennes au risque de 10%, 5% et 1%.



En conclusion, nous pouvons dire que dans la région du NMD se différencient statistiquement 4 groupes de cellules définis comme suit :

- Groupe I : Ce 1^{er} groupe de cellules isolé dans le plan factoriel 1x2 diffère significativement des autres groupes de cellules pour les variables SN et LTD au seuil de 1% et pour la variable SUR au seuil de 5%.

$$\overline{SN} = 5,33 \text{ sg}^t; \sigma = 0,53 \text{ sg}^t$$

$$\overline{LTD} = 210,54 \text{ } \mu\text{m}; \sigma = 34,96 \text{ } \mu\text{m}$$

$$\overline{SUR} = 4241 \text{ } \mu\text{m}^2; \sigma = 867,4 \text{ } \mu\text{m}^2$$

Il faut remarquer que pour ce groupe de cellules, quel que soit le risque pris (1%, 5%, 10%), jamais le rapport XXX/YYY n'est significativement différent de l'unité.

- Groupe II : Ce 2^e groupe de cellules diffère significativement des autres groupes au seuil de 1% pour les variables SE2 et AN2 :

$$\overline{SE2} = 4,89 \text{ sg}^t; \sigma = 0,45 \text{ sg}^t$$

$$\overline{AN2} = 53,65 \text{ } ^\circ; \sigma = 15,07 \text{ } ^\circ$$

Pour ce groupe cellulaire, il faut remarquer que le rapport XXX/YYY est significativement différent de l'unité au seuil de 10%.

- Groupe III : Ce 3^e groupe cellulaire diffère significativement des autres groupes au seuil de 1% pour les variables AN1, SUR et XXX :

$$\overline{AN1} = 87,38 \text{ } ^\circ; \sigma = 11,92 \text{ } ^\circ$$

$$\overline{SUR} = 23.312 \text{ } \mu\text{m}^2; \sigma = 3322 \text{ } \mu\text{m}^2$$

$$\overline{\text{XXX}} = 228,8 \text{ } \mu\text{m}; \quad \sigma = 316 \text{ } \mu\text{m}$$

De même que pour le groupe précédent, la valeur du rapport XXX/YYY est significativement différente de l'unité au seuil de 10%.

- Groupe IV : Ce dernier groupe, de faible effectif, diffère significativement des autres groupes au seuil de 1% pour les variables XXX et LTD :

$$\overline{\text{XXX}} = 407,3 \text{ } \mu\text{m}; \quad \sigma = 78,7 \text{ } \mu\text{m}$$

$$\overline{\text{LTD}} = 568,8 \text{ } \mu\text{m}; \quad \sigma = 113,1 \text{ } \mu\text{m}$$

Dans ce cas, la valeur du rapport XXX/YYY est significativement différente de l'unité au seuil de 10%, mais contrairement aux autres groupes où cette valeur était inférieure à 1, ici elle lui est supérieure.

6) Caractérisation morphologique des groupes de cellules

Les résultats des analyses statistiques (A.C.P., A.F.D., classification automatique et D^2 de MAHALANOBIS) ont permis de mettre en évidence 4 groupes de cellules significativement différents dans la région du NMD.

Les dessins réalisés à la chambre claire des cellules ayant servi à l'étude statistique ont été classés selon ces 4 groupes.

A l'intérieur de chacun de ces groupes, la combinaison de l'observation microscopique et des données morphométriques (obtenues grâce à l'étude statistique) a permis d'aboutir à la caractérisation de 4 types cellulaires constituant chacun de ces groupes.

a - Groupe I (cellules de type I) (69 sur 163)

Comme l'indique l'étude statistique, les cellules de ce groupe sont caractérisées par un faible nombre total de segments dendritiques (SN), ainsi que par une faible longueur cumulée des dendrites principales (LTD). En outre, mais à un degré moindre, ces cellules sont

caractérisées par une faible surface totale du champ dendritique (SUR).

Globalement, ces cellules présentent donc un champ dendritique constitué de peu de dendrites principales (2, plus rarement 3), imprégnées sur une faible longueur et surtout peu ramifiées.

Bien que non caractéristique par sa forme ou ses dimensions, le péricaryon peut être décrit comme assez globuleux et de petite taille :

LON = 23,5 μm ; σ = 0,45 μm ; LAR = 14,6 μm ; σ = 0,19 μm ; n = 69.

Il faut remarquer de plus que ces neurones ne présentent pas, tant pour le corps cellulaire que pour le champ dendritique, d'orientation préférentielle (Fig. 22).

b - Groupe II (cellules de type II) (44 sur 163)

Ces cellules présentent trois dendrites principales (DP1) ce qui les différencie des cellules des groupes I et III. Le plus souvent, la dendrite principale imprégnée sur la plus grande longueur présente une ramification dendritique abondante mais peu étendue en largeur alors que les deux autres dendrites principales plus courtes (SE2, AN2), présentent une ramification plus large.

Ces cellules présentent un péricaryon d'aspect souvent triangulaire (ou globuleux suivant l'angle d'observation) et de taille plus importante que celui des cellules du groupe précédent:

LON = 25,9 μm ; σ = 0,64 μm ; LAR = 16,3 μm ; σ = 0,22 μm ; n = 44.

Enfin, on peut dire que le champ dendritique de ces neurones est très étendu, ramifié et présente une orientation préférentielle perpendiculaire au 3^e ventricule (Fig. 22).

c - Groupe III (cellules de type III) (37 sur 163)

La principale caractéristique de ces neurones est de présenter un péricaryon allongé :

LON = 28,0 μm ; σ = 0,66 μm ; LAR = 14,6 μm ; σ = 0,18 μm ; n = 37.

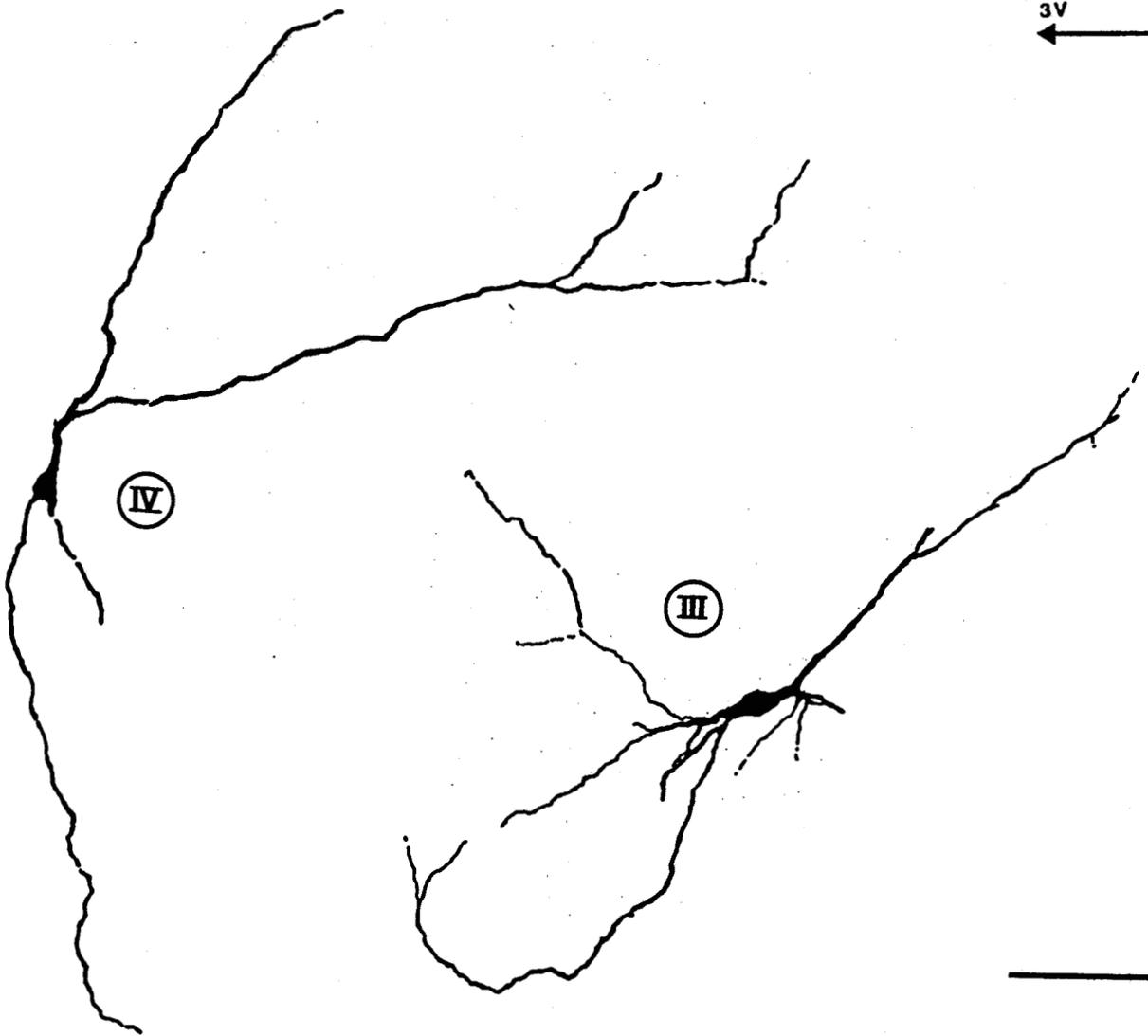
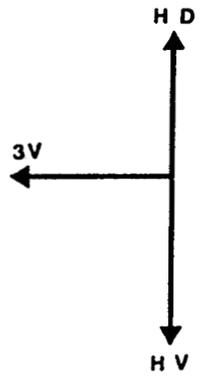
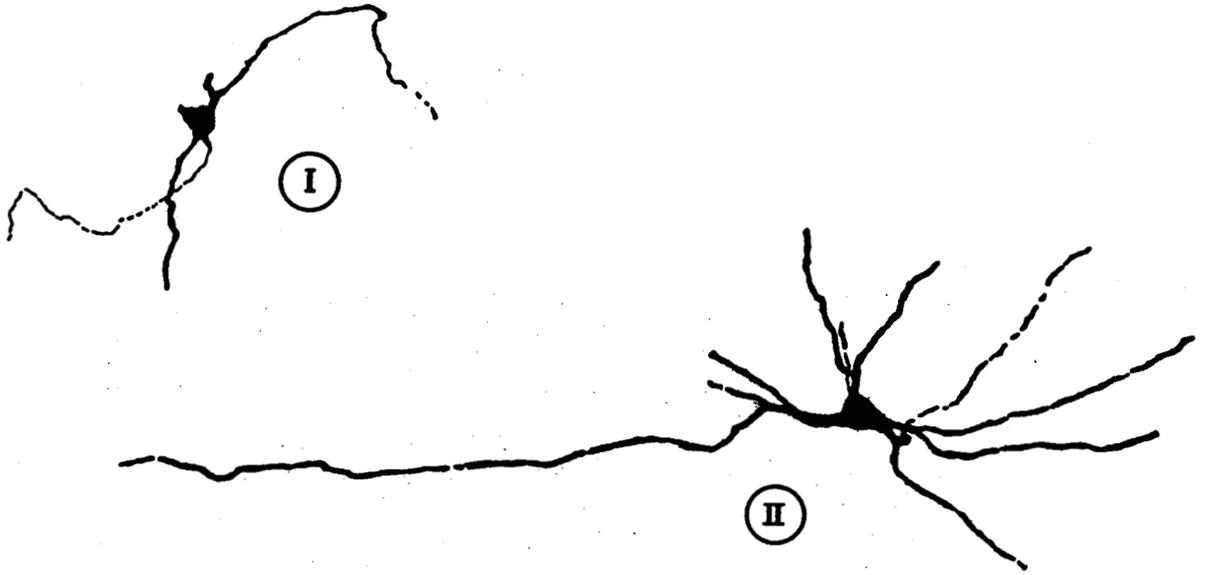
Ce péricaryon est pourvu de deux dendrites principales. Chacune de ces deux dendrites présente une ramification abondante et large (SUR), imprégnée sur une longue distance. Pour ce type de cellule, c'est toujours la dendrite principale la plus longuement imprégnée qui présente la ramification la plus large (AN1).

Ces cellules présentent, comme les cellules de type II,

FIGURE 22

Dessins réalisés à la chambre claire de 4 cellules imprégnées par la méthode de GOLGI modifiée. Ces cellules sont typiques des 4 groupes de cellules caractérisés par l'analyse statistique.

Barre de calibration : 100 μ m



une orientation perpendiculaire au 3^e ventricule, tant pour le champ dendritique que pour le corps cellulaire (Fig. 22).

d - Groupe IV (cellules de type IV) (13 sur 163)

Contrairement aux autres groupes de cellules ces neurones présentent des dendrites principales en nombre variable (2 à 3) mais imprégnées sur une grande longueur (LTD). Ces dendrites sont moyennement ramifiées mais toujours de manière étroite. Les péricaryons sont de taille moyenne et assez globuleux : _____

LON = 26,0 μm ; σ = 0,43 μm ; LAR = 15,5 μm ; σ = 0,21 μm ; n = 13 .

Enfin, ces cellules présentent une orientation nettement parallèle au 3^e ventricule (DIA) (Fig. 22).

7) Répartition topographique des groupes cellulaires

Bien que les cellules imprégnées par la méthode de GOLGI dans la région du NMD puissent être classées en 4 groupes significativement différents, la répartition topographique de ces 4 groupes ne présente pas d'organisation bien visible. Dans toute cette région, les corps cellulaires appartenant à ces 4 populations sont intimement mêlés (Fig. 23).

B - Morphologie et direction des axones

L'axone, lorsqu'il est imprégné, est bien reconnaissable. Il présente toujours un cône d'émergence court, effilé, situé sur le péricaryon ou sur un tronc dendritique. Le diamètre de l'axone reste fin et constant tout le long de son trajet et présente une succession de vésicules globuleuses, lui donnant un aspect caractéristique de corde à noeuds.

Les axones des neurones imprégnés ont toujours le même aspect, quel que soit le groupe cellulaire auquel appartient la cellule. Par contre ils présentent des différences dans les directions qu'ils prennent au départ du péricaryon.

FIGURE 23

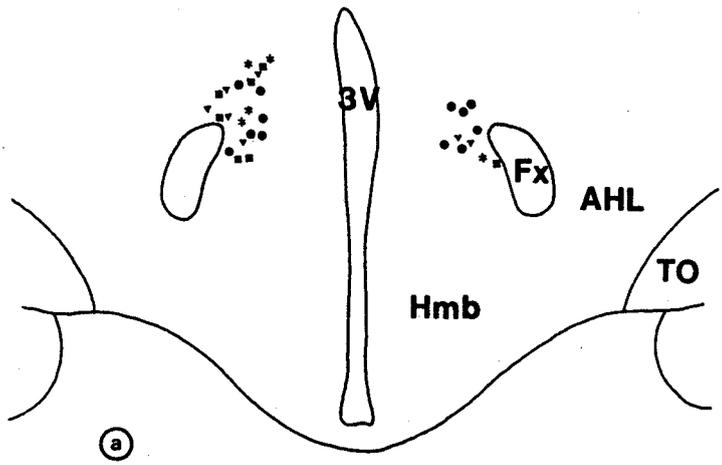
Répartition topographique des 4 groupes cellulaires sur les 5 coupes
sériées a) à e) contenant la population cellulaire étudiée par l'analyse
statistique:

Groupe I : ●

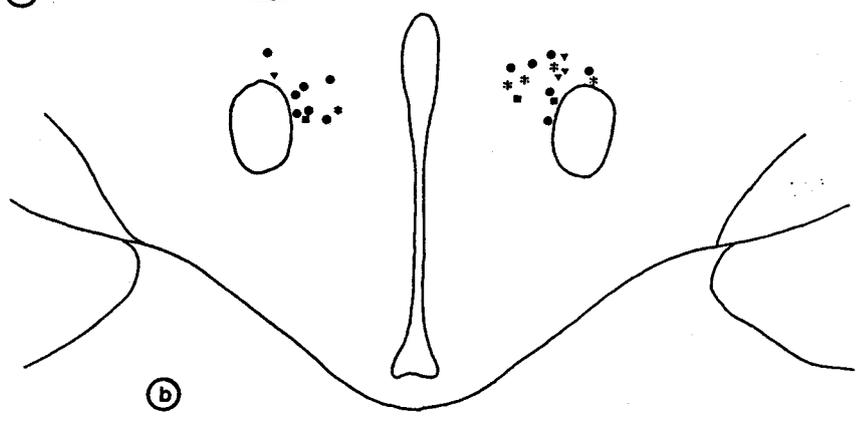
Groupe II : *

Groupe III : ▼

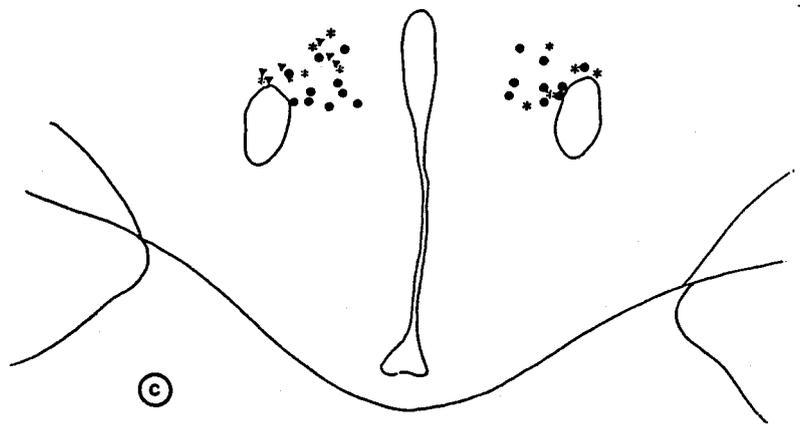
Groupe IV : ■



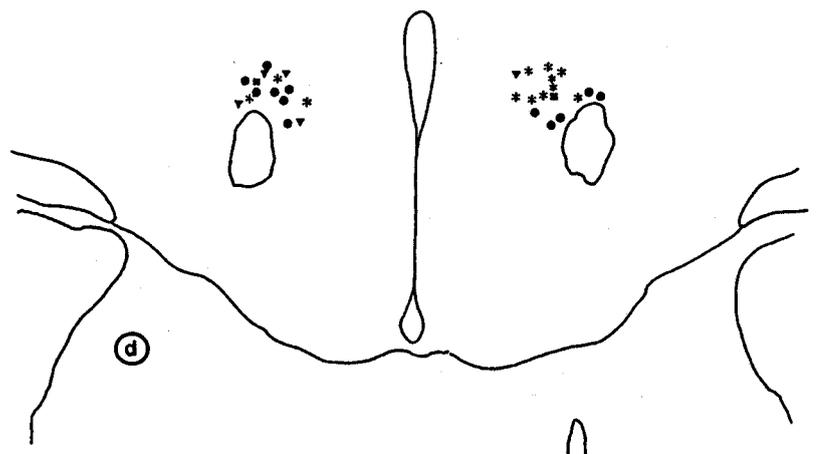
(a)



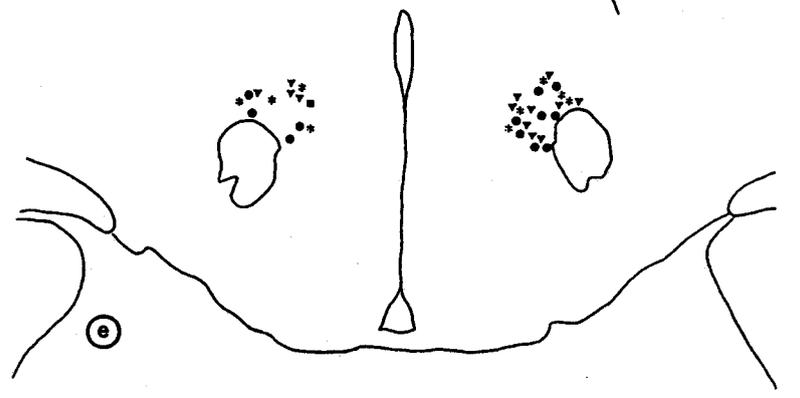
(b)



(c)



(d)



(e)

1) Groupe I

Dans ce groupe cellulaire, 41% des neurones possèdent un axone identifiable. Parmi ces neurones, 39% présentent un axone dont le cône d'émergence est localisé sur le péricaryon; pour 36% il l'est sur un tronc dendritique principal à moins de 10 μm du péricaryon et pour 25% sur une branche dendritique à une distance supérieure à 10 μm du péricaryon.

Ces axones présentent de plus trois directions efférentes préférentielles (Fig. 24a) :

- vers l'aire hypothalamique médio-dorsale (quadrant dorso-interne sur la figure)
- vers l'aire périventriculo-fornicale (quadrant ventro-interne sur la figure)
- vers l'aire périfornicale, en longeant la face externe du fornix (quadrant ventro-latéral sur la figure).

2) Groupe II

L'une des caractéristiques de ce groupe cellulaire est de présenter une assez bonne imprégnation des axones puisque 64% des neurones présentent des axones bien identifiables. Le cône d'émergence de l'axone se trouve sur le péricaryon pour 37% de ces cellules, sur un tronc dendritique à moins de 10 μm du péricaryon pour 26% et sur une branche dendritique à plus de 10 μm du péricaryon pour 37%.

En fonction de la direction empruntée par ces axones au départ de la région du NMD, le contingent des fibres efférentes appartenant à ce type cellulaire peut être divisé en deux groupes (Fig. 24b) :

- un petit nombre d'axones se dirigeant vers l'aire périfornicale par la face externe du fornix ;
- un grand nombre de fibres se répartissant en direction d'une large zone correspondant à la zona incerta, à l'aire hypothalamique médio-dorsale et au noyau paraventriculaire (NPV) (quadrants dorso-externe, dorso-interne, dorso-médian et ventro-médian sur la figure).

3) Groupe III

Dans ce groupe de cellules, seulement 36% des neurones présentent un axone identifiable. Pour 31% d'entre eux, le cône d'émergence est situé sur le péricaryon, pour 31% il est situé sur un tronc dendritique à moins de 10 μm du corps cellulaire et pour 38% à une

FIGURE 24

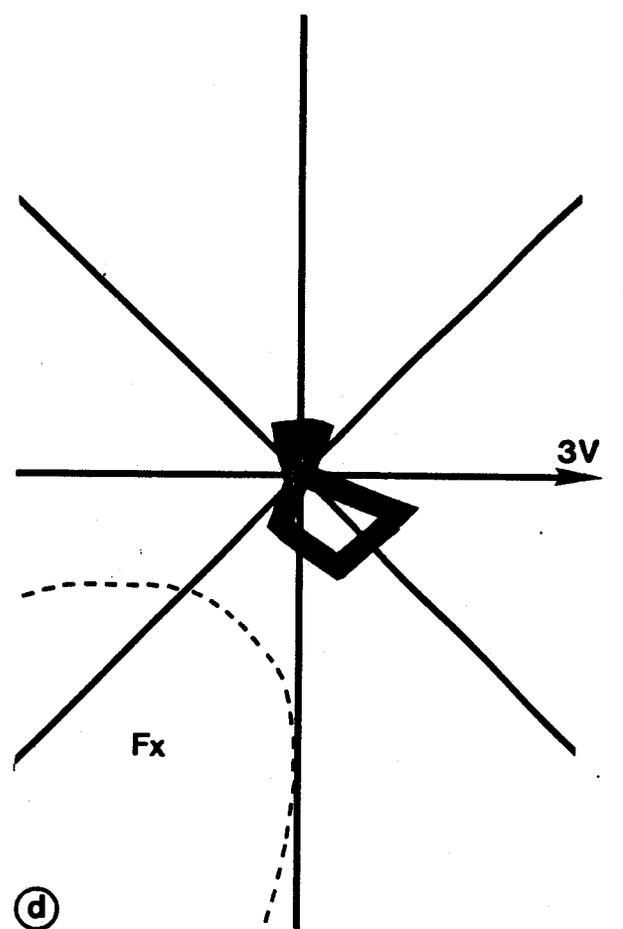
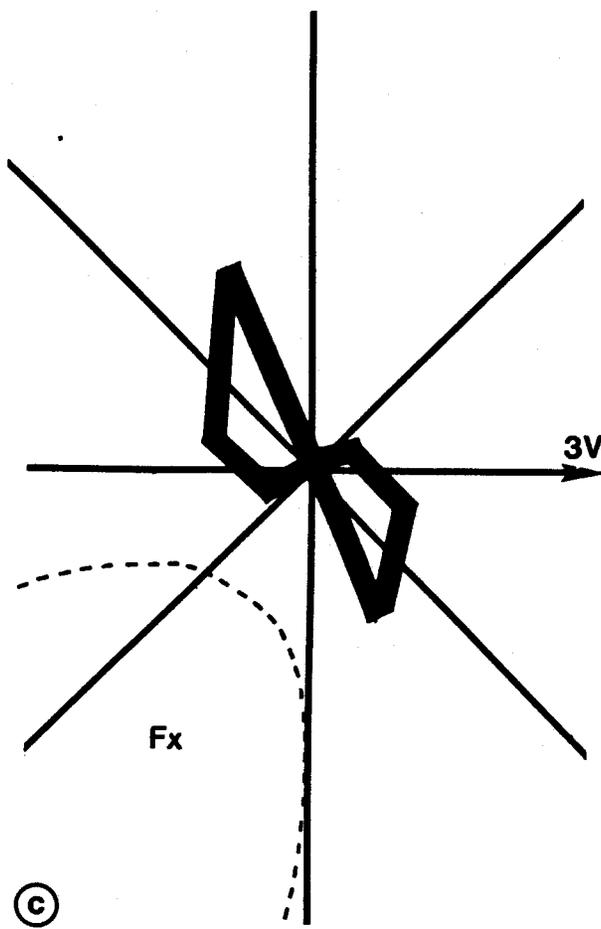
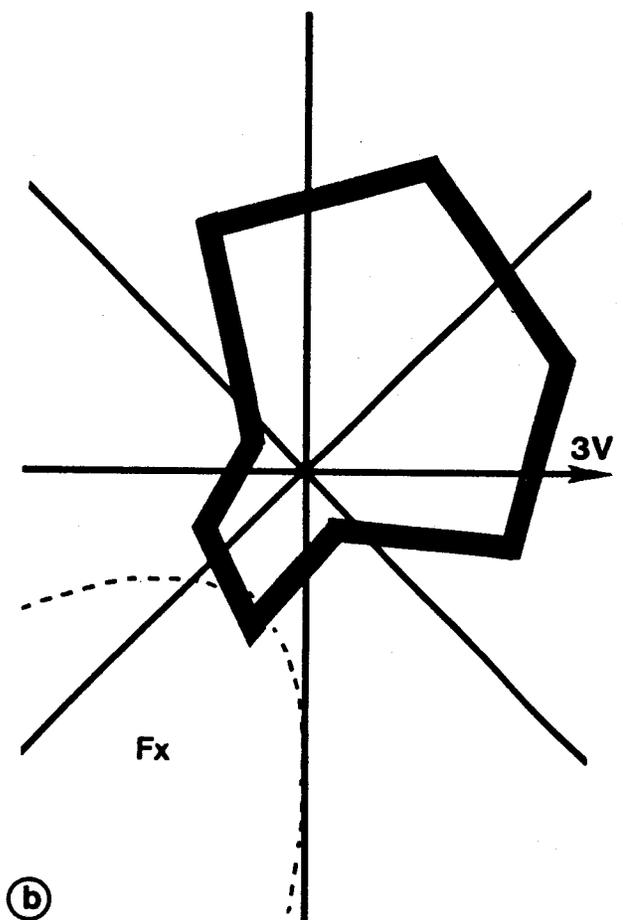
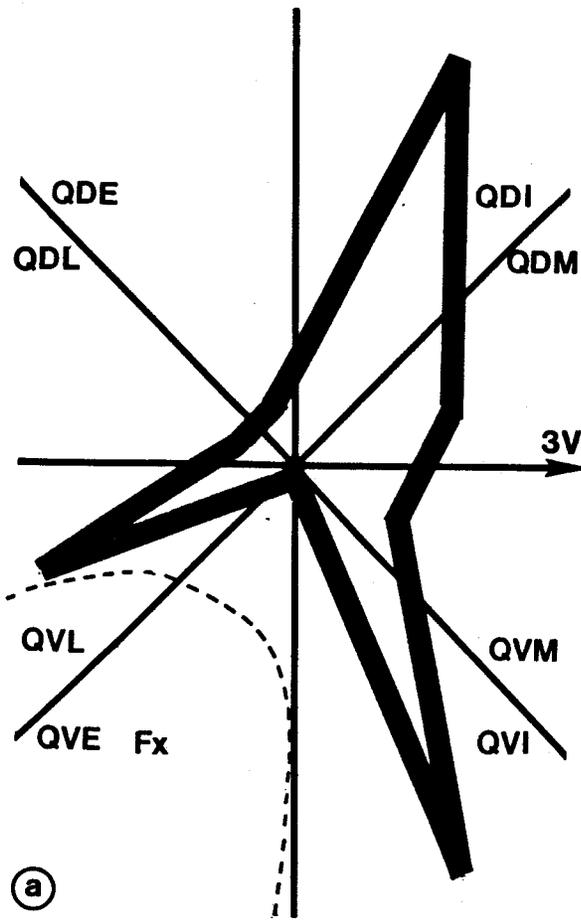
Répartition de l'orientation des axones pour chacun des groupes cellulaires caractérisés par l'analyse statistique. Toutes les cellules ont été rapportées au même côté et orientées par rapport au fornix et au 3^e ventricule :

- a) Groupe I
- b) Groupe II
- c) Groupe III
- d) Groupe IV

Représentation sous forme de polygones de fréquence ; la distance entre un sommet du polygone et le point d'intersection des axes est proportionnelle au nombre d'observations d'axones effectué dans le quadrant correspondant (1 cm pour 1 observation).

Abréviations utilisées :

- QDE : quadrant dorso-externe
- QDL : quadrant dorso-latéral
- QVL : quadrant ventro-latéral
- QVE : quadrant ventro-externe
- QVI : quadrant ventro-interne
- QVM : quadrant ventro-médian
- QDM : quadrant dorso-médian
- QDI : quadrant dorso-interne



distance supérieure à 10 μm .

D'autre part, ces axones présentent deux directions efférentes préférentielles bien distinctes et diamétralement opposées (Fig. 24c):

- l'une vers la zona incerta (quadrant dorso-externe sur la figure) ;
- l'autre vers l'aire périfornicale (quadrant ventro-médian sur la figure).

4) Groupe IV

Le faible effectif de ce groupe cellulaire ne permet pas d'obtenir de résultats analysables quant à la direction que prennent les axones imprégnés. Il faut toutefois remarquer que près de la moitié de ces neurones présentent un cône d'émergence de l'axone situé à une distance de plus de 10 μm du péricaryon, ce qui paraît important par rapport aux pourcentages obtenus pour les autres groupes cellulaires. De plus, il semble que ces axones aient tendance à se diriger dans deux directions, l'une dorsale vers le thalamus, et l'autre ventrale vers l'aire périventriculo-fornicale (Fig. 24d).

II - MORPHOLOGIE DES NEURONES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL MIS EN EVIDENCE PAR INJECTION INTRACELLULAIRE DE LUCIFER YELLOW "IN VITRO"

La technique d'injection intracellulaire d'un composé fluorescent a été utilisée pour tenter de confirmer les résultats obtenus grâce à l'imprégnation argentique de GOLGI. De même que cela peut être fait pour un neurone imprégné, l'observation d'un neurone injecté permet d'en définir les caractéristiques morphologiques : forme du péricaryon ainsi qu'aspect du champ dendritique et de l'axone.

Les injections intracellulaires de LY ont été réalisées dans des tranches d'hypothalamus maintenues "in vitro", ce qui présente l'avantage de permettre la localisation du NMD par simple observation à la loupe binoculaire.

La complexité de mise en oeuvre de la technique ne nous a toutefois pas permis d'injecter un grand nombre de neurones et notre étude n'est donc basée que sur 21 neurones. Il nous a été de ce fait impossible de réaliser une étude statistique aussi complète que celle effectuée après les imprégnations argentiques de GOLGI.

Cependant, comparativement à la méthode de GOLGI, la méthode d'injection intracellulaire a permis une meilleure visualisation de l'axone sur de plus longues distances et donc la définition dans certains cas de son trajet.

A - Morphologie des péricaryons et des prolongements dendritiques

Dans tous les cas, au cours de l'observation des tranches au microscope de fluorescence, les cellules injectées ont présenté une forte concentration de LY dans le péricaryon ainsi que dans les arborisations dendritiques (Fig. 25). Parmi les 21 cellules injectées, 14 ont donné des

FIGURE 25

Microphotographies de cellules marquées après injection intracellulaire de Lucifer Yellow dans le noyau magnocellulaire dorsal.

- a) Cellule 23
- b) Trois cellules (24, 25, 26) marquées après une injection intracellulaire de LY. Le marquage de ces trois cellules pourraient être le résultat d'un "dye coupling".
- c) Cellules 24, 25, 26.
- d) Cellule 35. La pointe de flèche indique l'axone.
- e) Détail d'une dendrite de la cellule 35.
- f) Cellule 29.
- g) Cellule 38.

Barre de calibration : 59 μm pour a,b,c,d,f
40 μm pour e,g

résultats exploitables dans le cadre d'une étude morphologique complète. Trois types différents de neurones ont ainsi été distingués :

- dans 5 cas (cellules 23, 26, 27, 35 et 41 ; Fig. 26 a, c, f, h), les péricaryons injectés ont une forme globuleuse et une taille assez réduite ($23 \mu\text{m} \times 22 \mu\text{m}$). Les troncs dendritiques issus du péricaryon sont toujours très fins et en nombre très variable (2 à 7). Assez droites sur leur partie proximale, ces dendrites sont plus sinueuses sur leur partie distale. Les ramifications de ces dendrites, peu nombreuses, se font d'une manière régulière tout au long de leur cheminement dans l'hypothalamus.

- dans 6 cas (cellules 25, 28, 31, 33, 34 et 38 ; Fig. 26 b, d, e, f, g), les corps cellulaires sont à peine plus longs que larges ($26 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$), toutefois la disposition des 3 troncs dendritiques principaux autour du péricaryon lui confère une forme nettement triangulaire. Ces troncs dendritiques présentent, outre un diamètre qui décroît rapidement, des ramifications dichotomiques situées très près du corps cellulaire. Le diamètre de ces dendrites devient ensuite fin et constant et les ramifications plus rares à mesure que l'on s'éloigne du corps cellulaire.

- dans 3 cas (cellules 24, 29 et 39 ; Fig. 26 b, d, h), les péricaryons ont une forme allongée, oblongue et des dimensions moyennes de $35 \mu\text{m} \times 18 \mu\text{m}$. Ces corps cellulaires présentent 2 troncs dendritiques épais, diamétralement opposés et orientés dans le même sens que le grand axe du péricaryon. L'un d'eux se ramifie très tôt en dendrites plus fines qui se ramifient à leur tour très rapidement. Le second tronc dendritique, sitôt sorti du péricaryon, se divise en branches dendritiques épaisses et courtes qui se ramifient rapidement en dendrites fines. Globalement, ces neurones présentent donc un champ dendritique caractéristique dont les ramifications se réalisent à proximité du péricaryon et dont les dendrites issues de ces divisions cheminent de manière rectiligne en ne subissant plus que peu de ramifications.

Dans le cas des 3 cellules 23, 27 et 33 (Fig. 26 a, c, e), il est également possible d'observer 1 ou 2 fines dendrites au départ du péricaryon.

Trois neurones fluorescents (cellules 24, 25 et 26 ; Fig. 26 b, c) ont été observés après l'injection intracellulaire d'un seul neurone. Ce phénomène peut être interprété comme étant le résultat d'un couplage

FIGURE 26

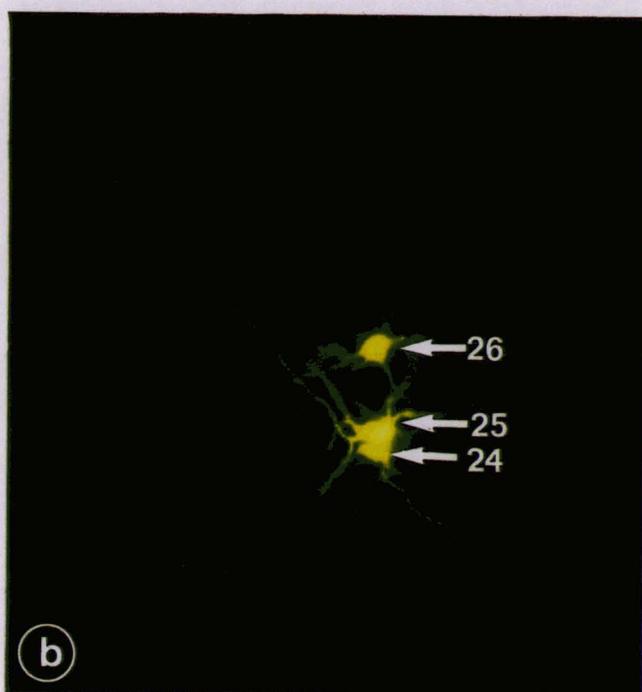
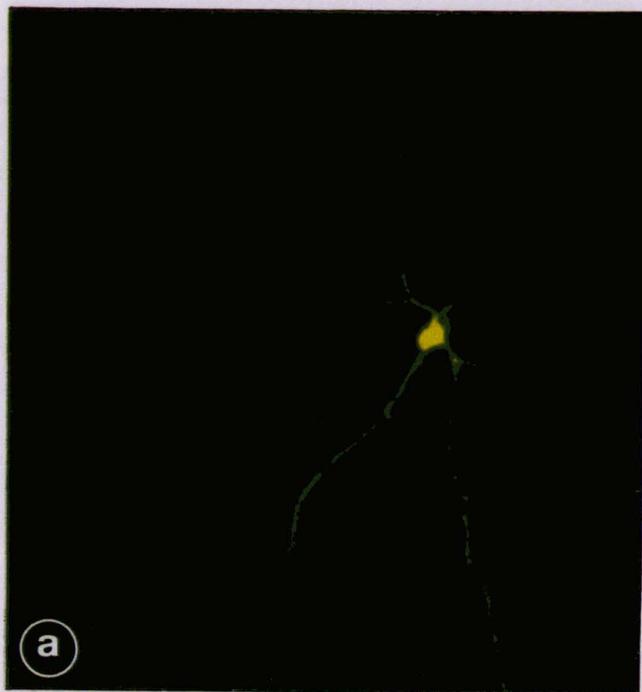
Dessin des cellules injectées par le Lucifer Yellow et localisation de chaque cellule dans l'hypothalamus :

Les pointes de flèches indiquent les axones.

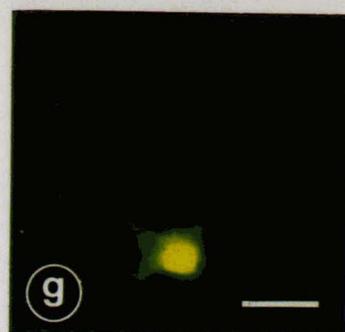
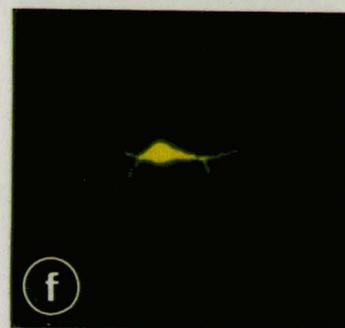
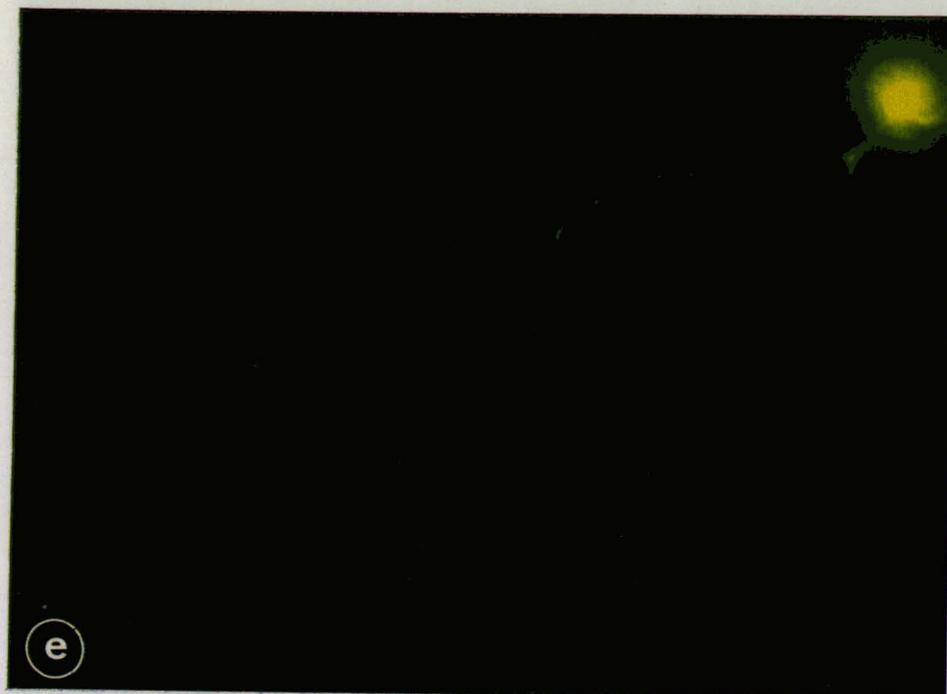
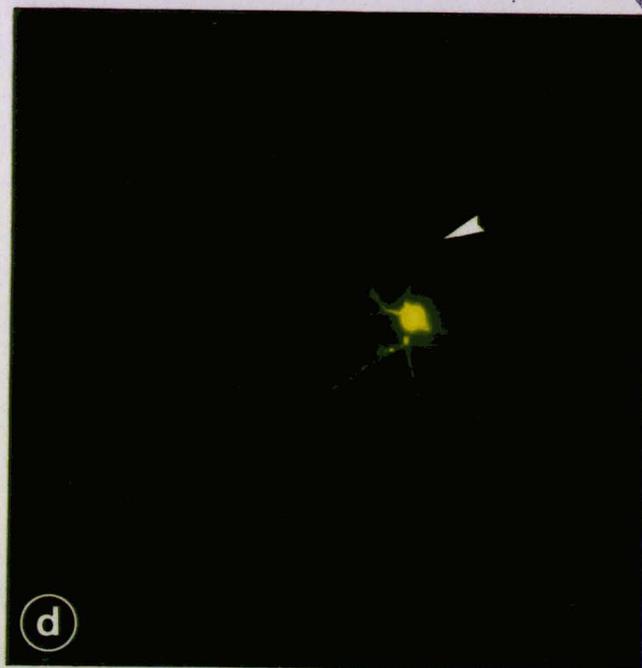
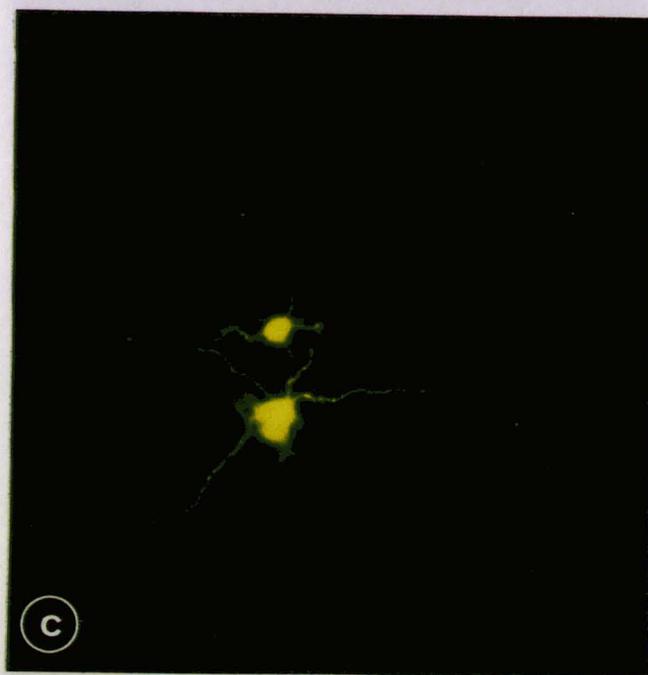
Les doubles pointes de flèches indiquent les bifurcations d'axone.

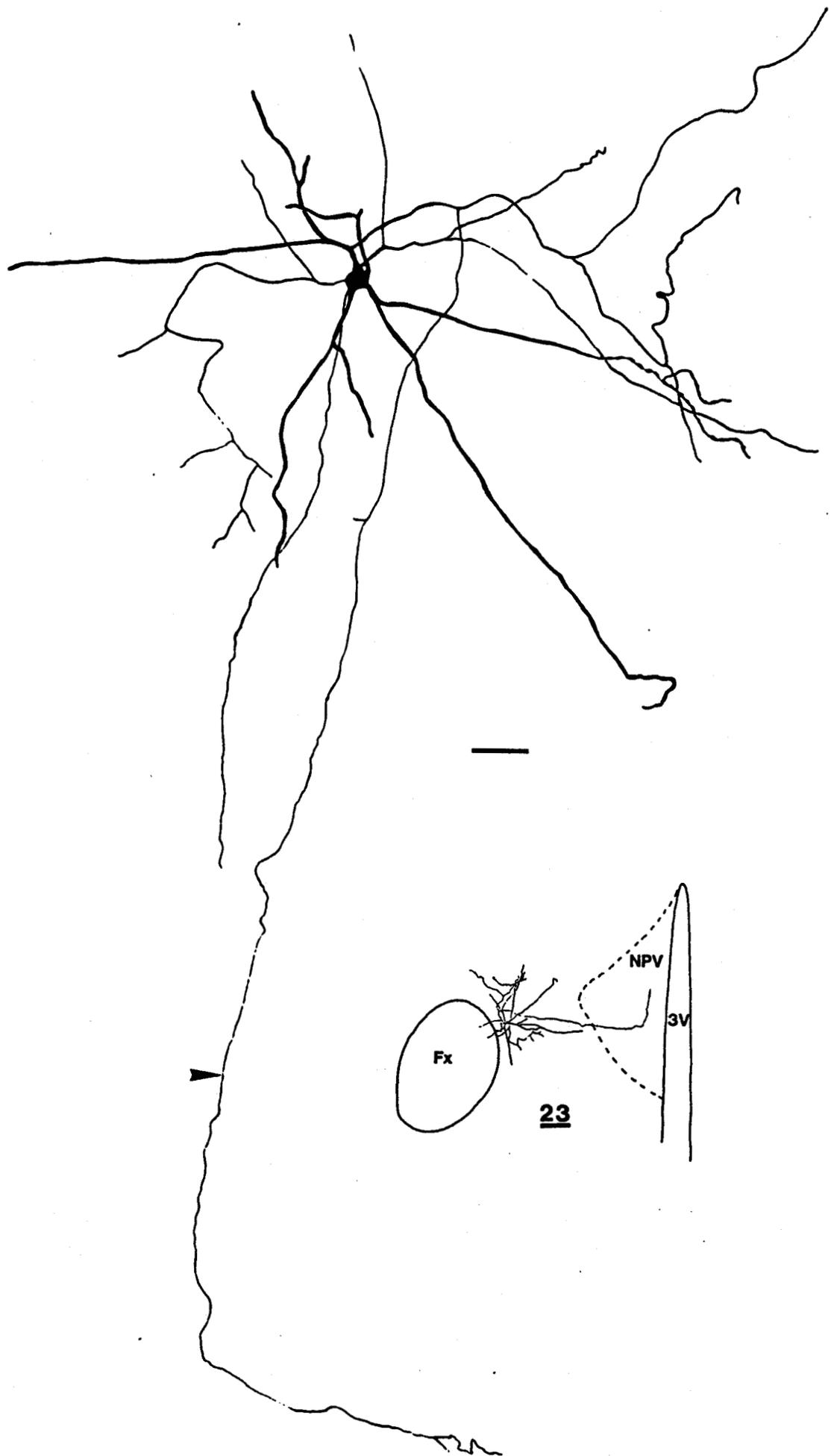
Barre de calibration : 50 μm .

a) cellule 23

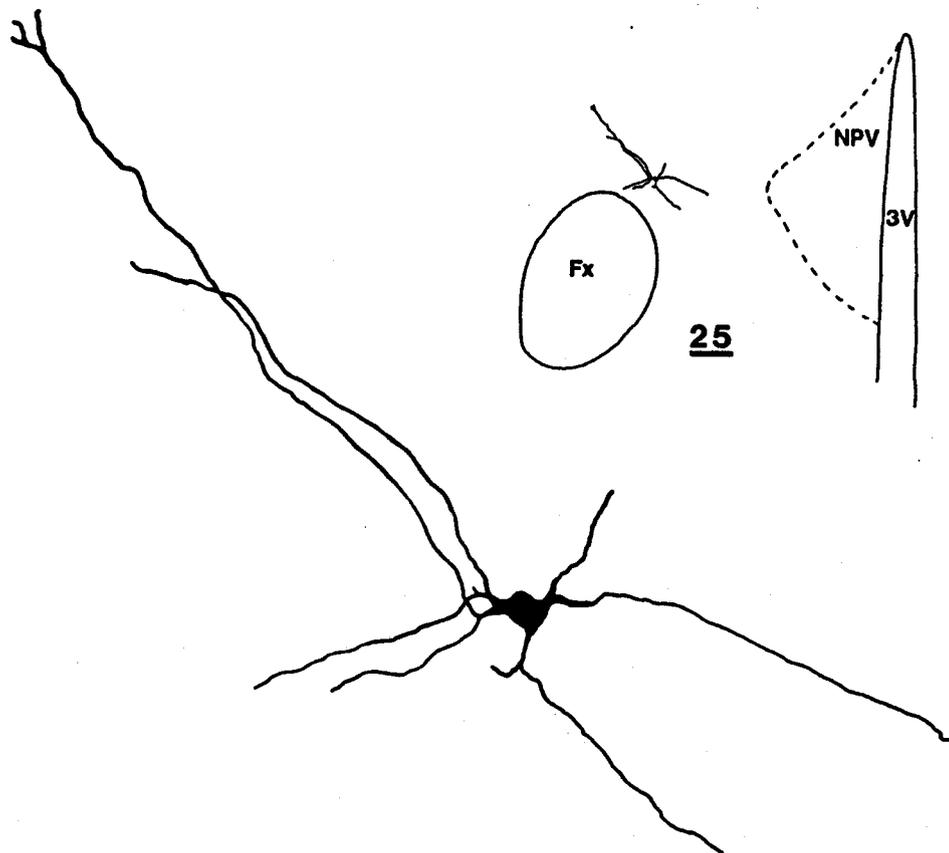
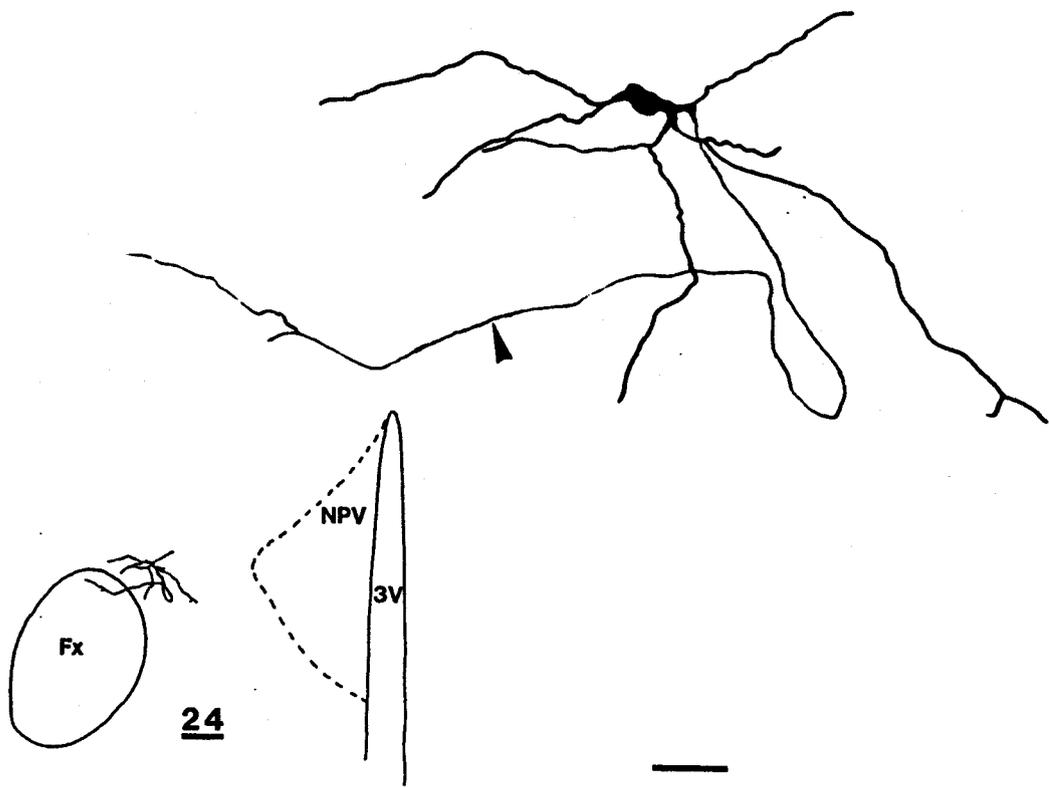


BU
11

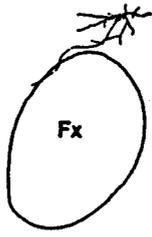




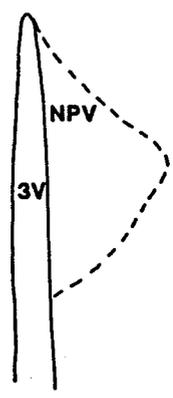
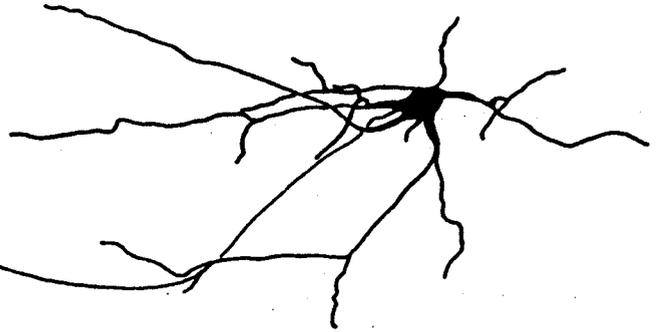
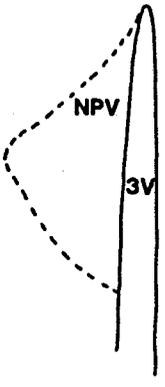
b) cellules 24 et 25



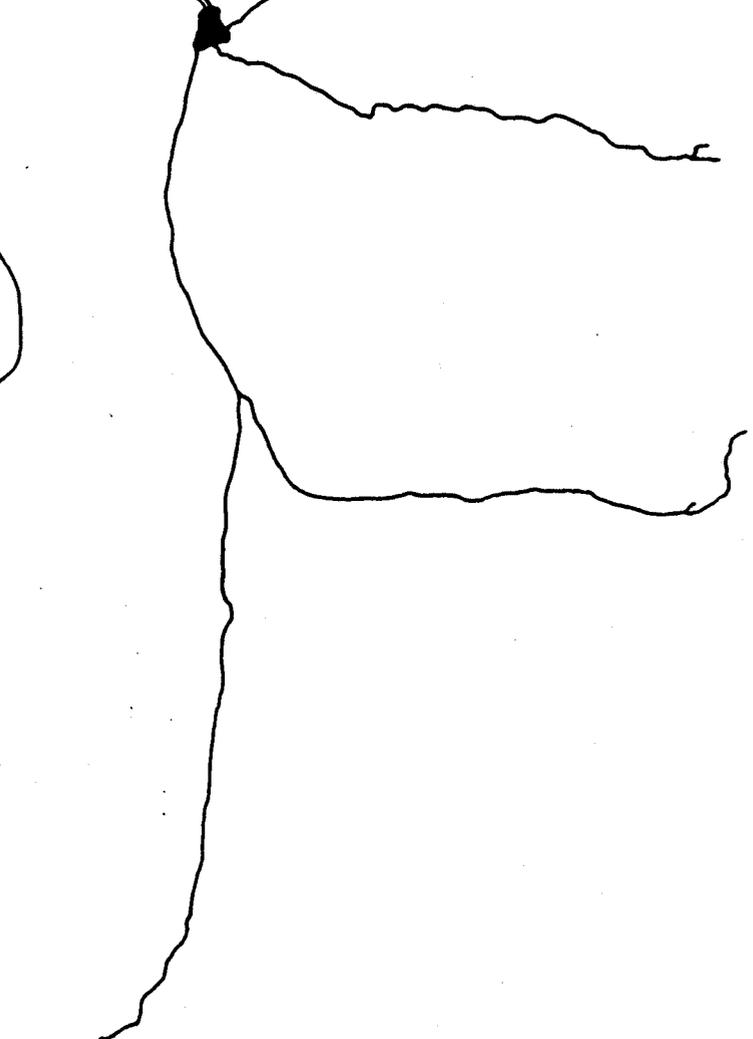
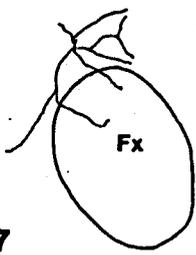
c) cellules 26 et 27



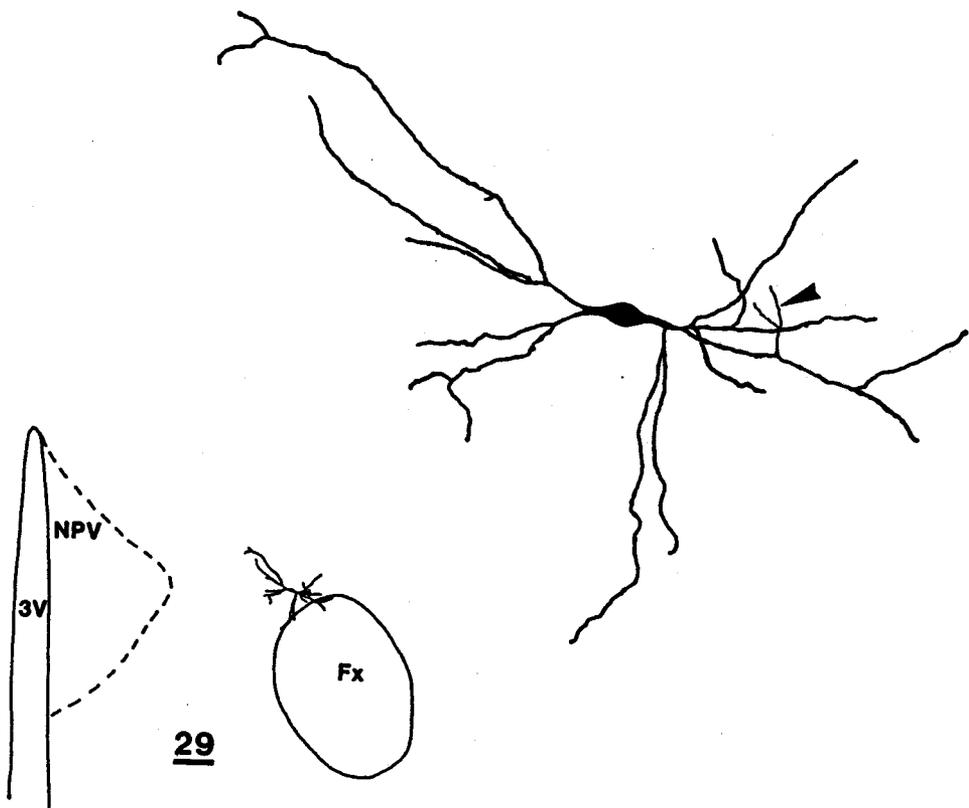
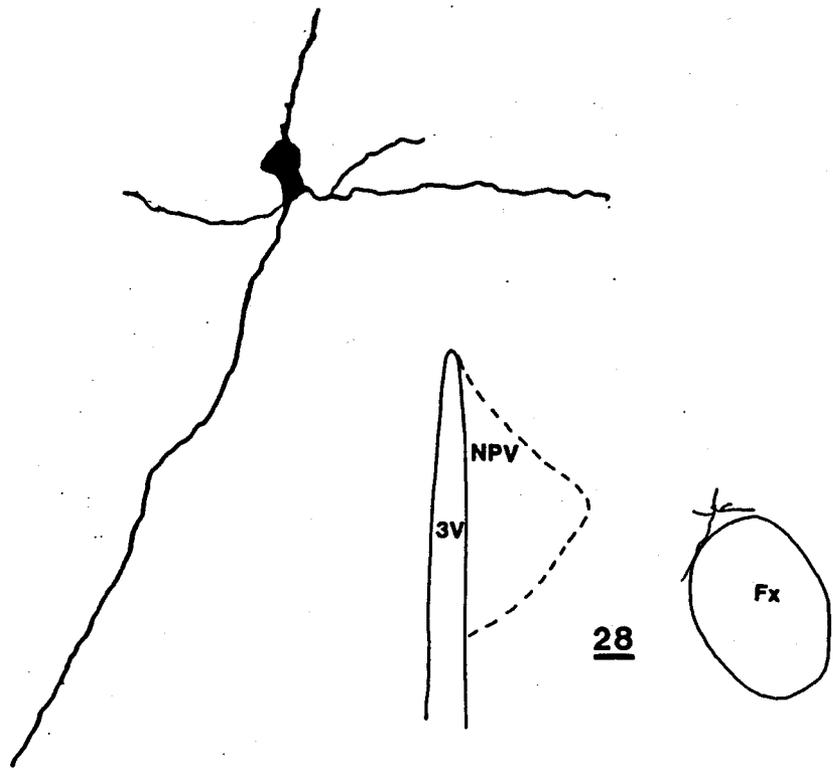
26



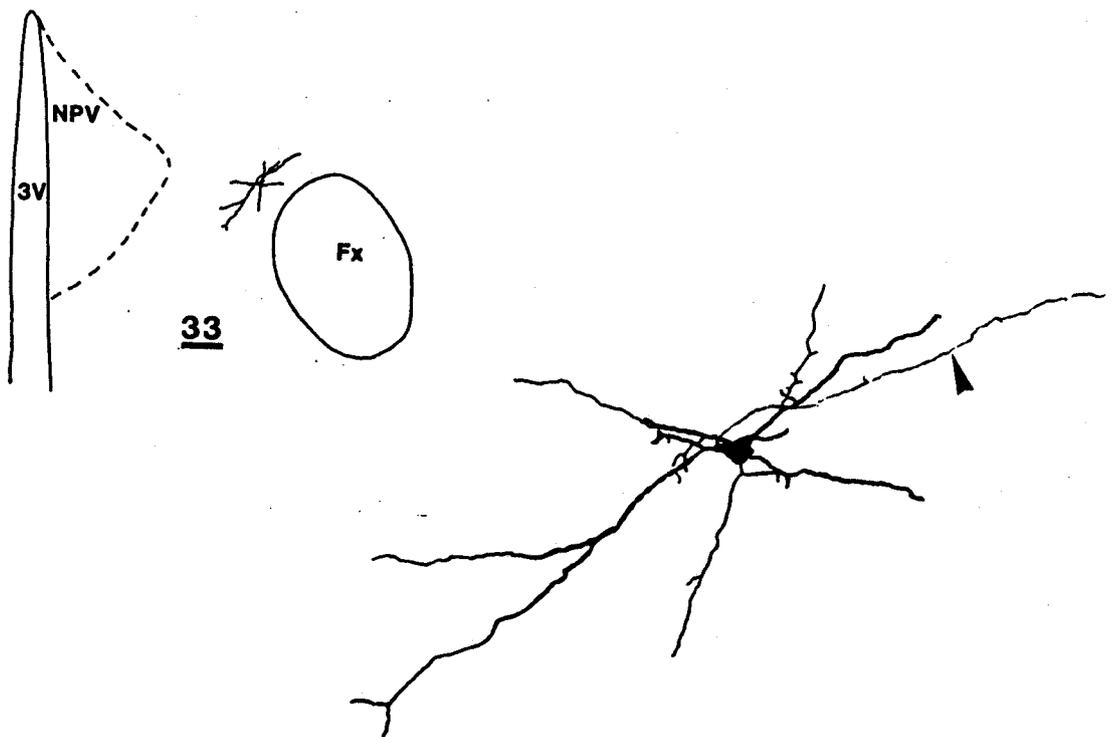
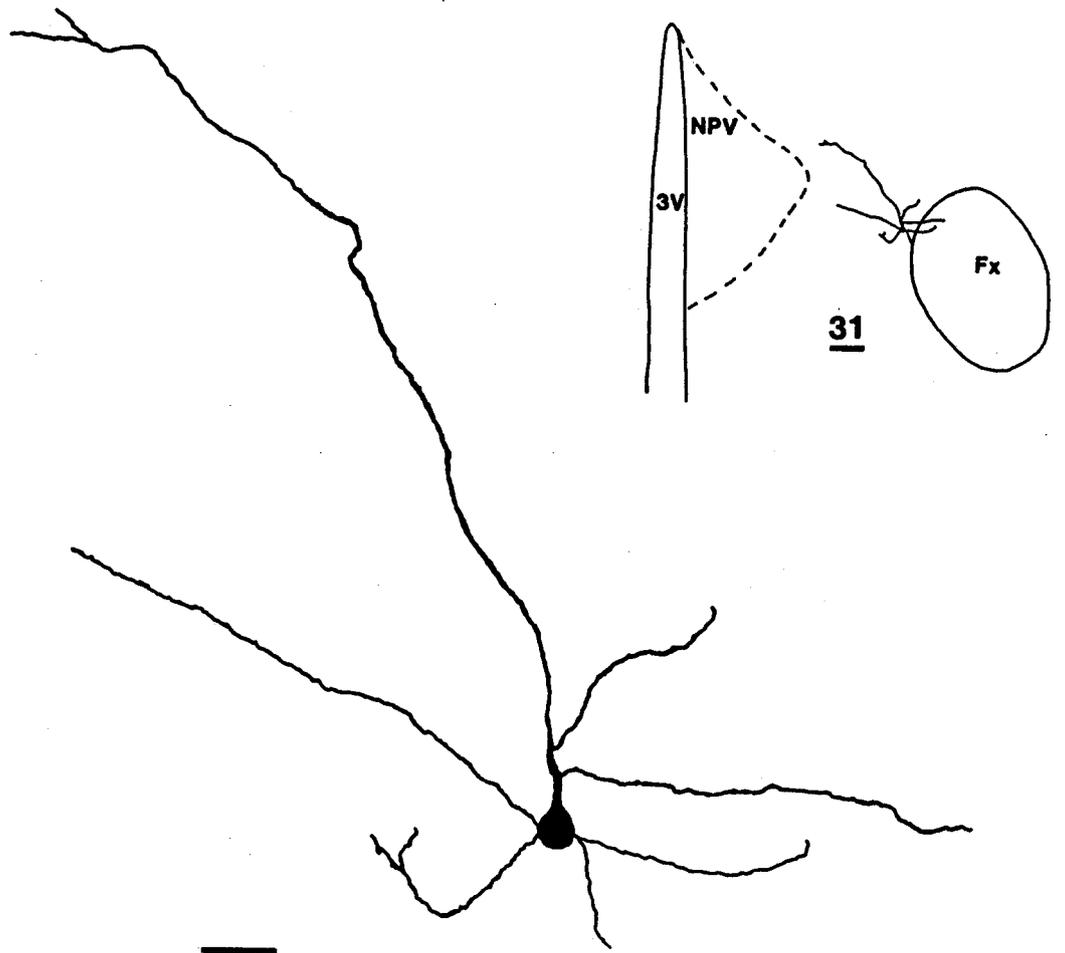
27



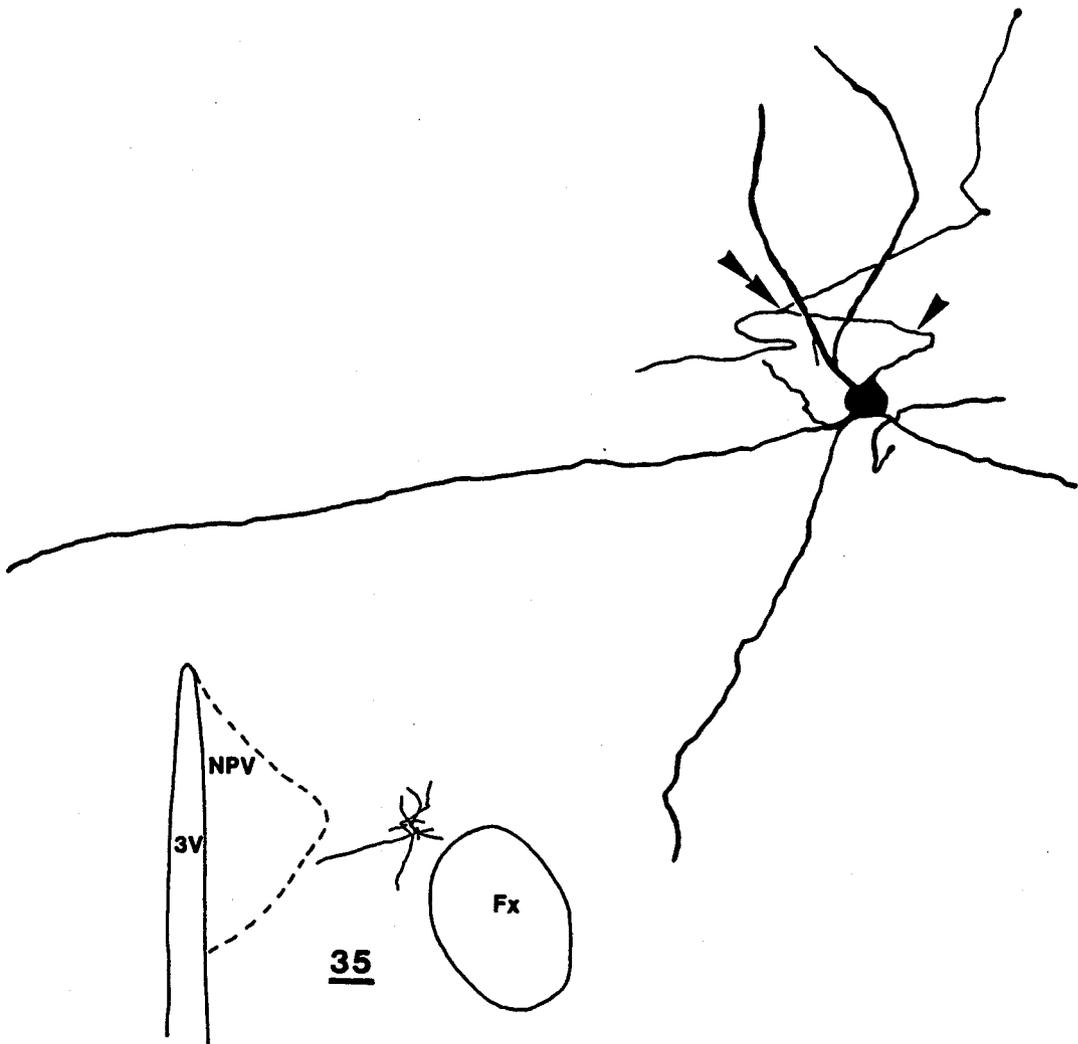
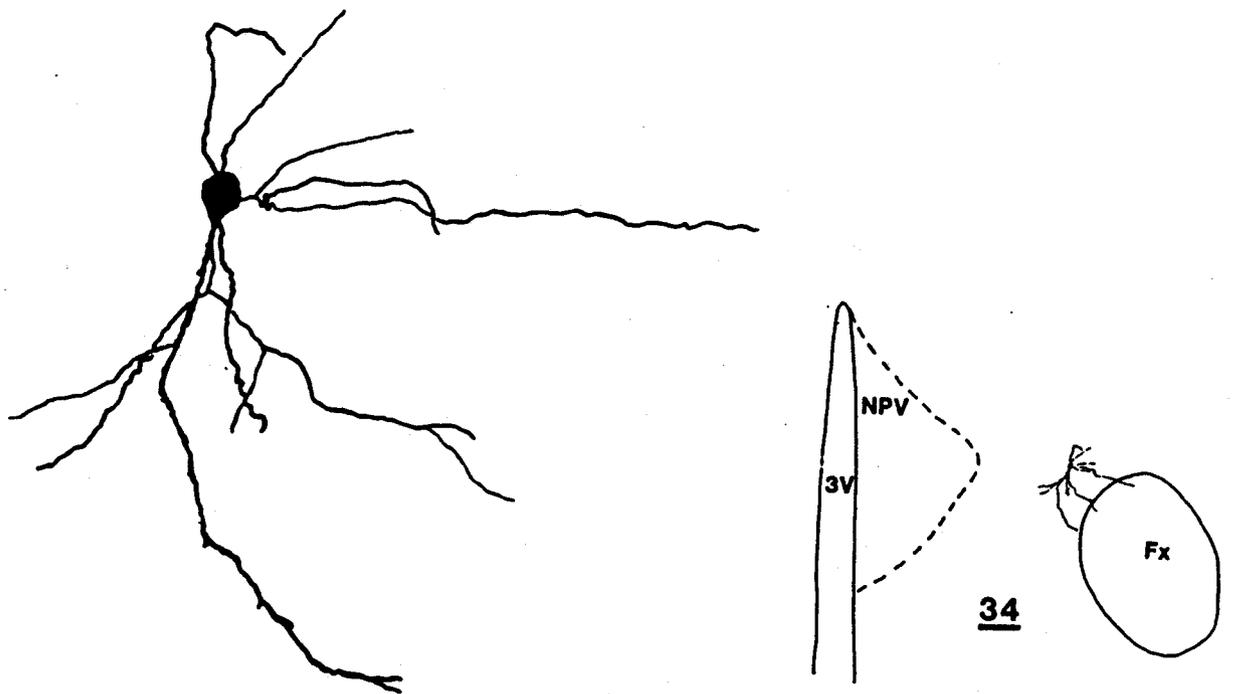
d) cellules 28 et 29



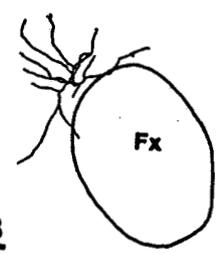
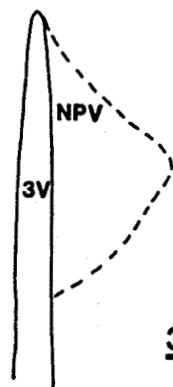
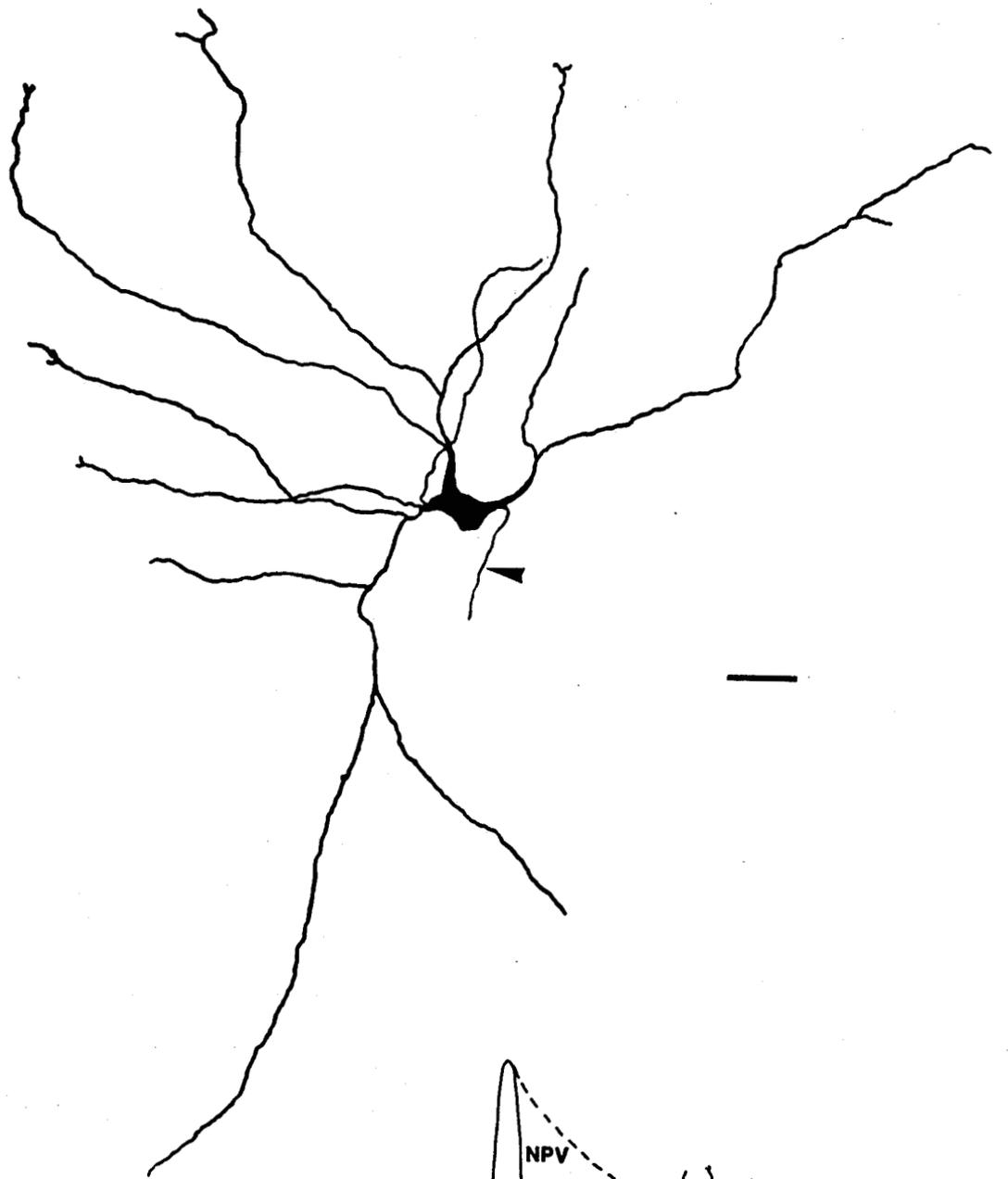
e) cellules 31 et 33



f) cellules 34 et 35

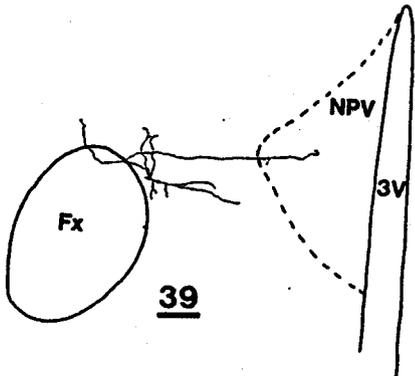


g) cellule 38

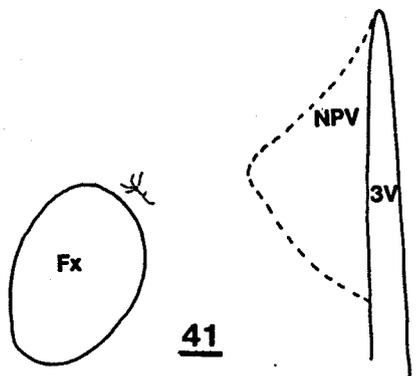
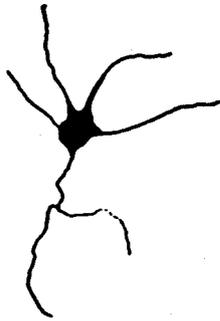
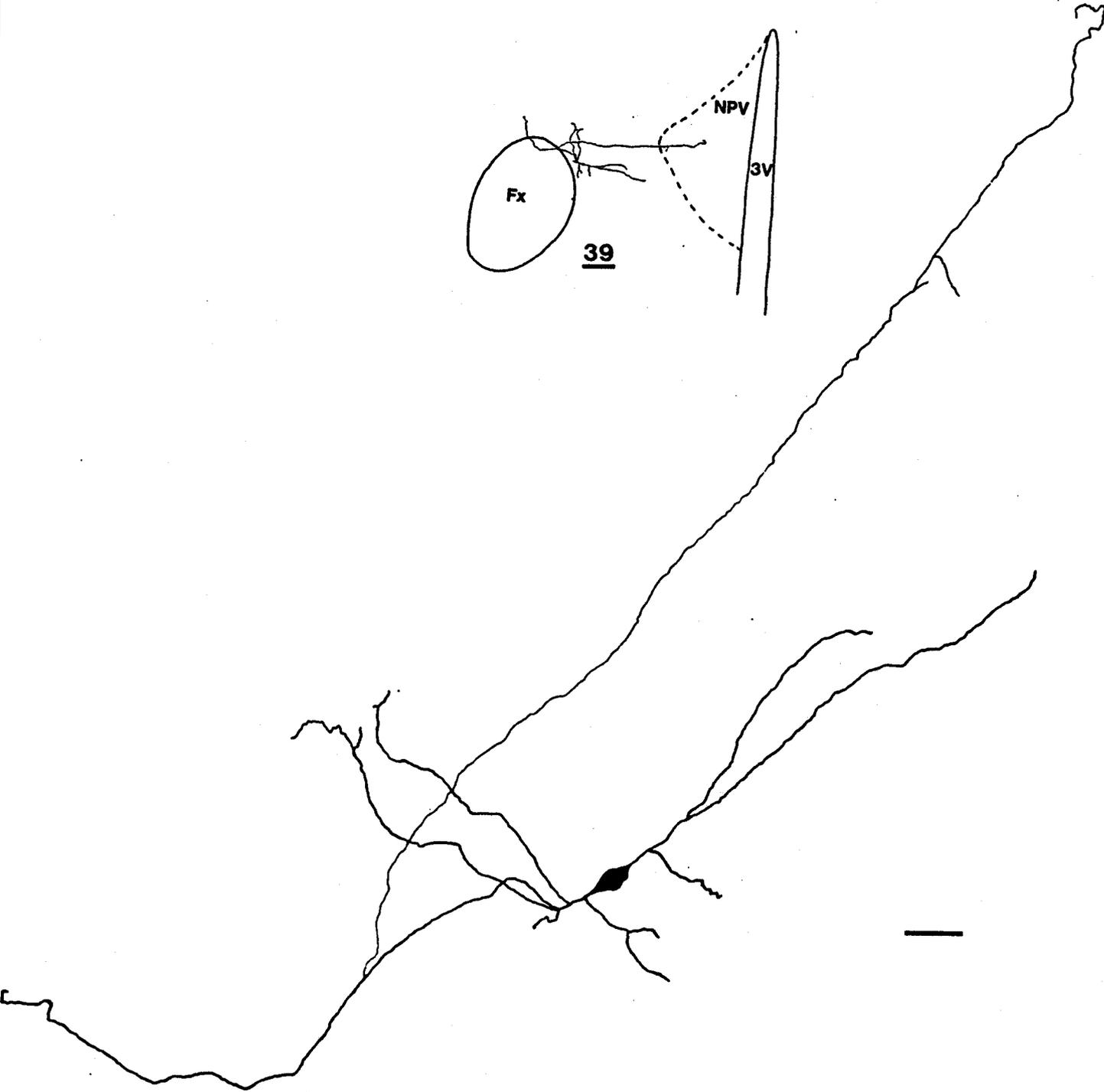


38

h) cellules 39 et 41



39



41

entre les corps cellulaires et/ou les dendrites de neurones proches, permettant ainsi le passage inter-neuronal du produit fluorescent ("dye coupling") (STEWART, 1978). Que l'obtention de ce marquage multiple d'éléments voisins soit plus fréquent dans le cas de l'utilisation de tranches, la section de dendrites lors de la confection des tranches pouvant faciliter les échanges inter-neuronaux, reste controversé (GUTNICK et al., 1985 ; YANG et HATTON, 1987).

B - Direction des axones

Bien qu'étant plus facilement observable par cette technique que par la technique de GOLGI, le cône d'émergence de l'axone et son trajet n'ont pu être identifiés avec certitude que pour 7 neurones injectés (Fig. 27).

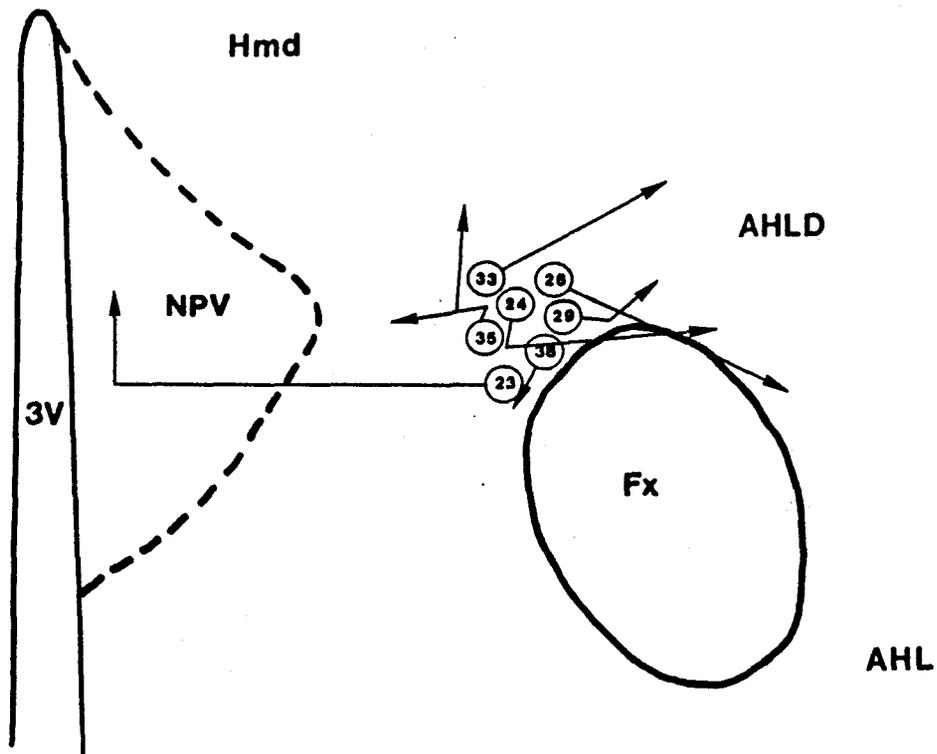


FIGURE 27 : Représentation schématisée des directions empruntées par les axones observés sur les cellules ayant reçu une injection intracellulaire de Lucifer Yellow.

Dans 2 cas (cellules 29 et 33), les cellules injectées présentent un axone dont la direction est oblique à partir du NMD et dont le cheminement se fait au travers de l'aire hypothalamique latéro-dorsale (vers la zona incerta).

Dans un autre cas (cellule 23), l'axone présente un trajet pratiquement rectiligne, horizontal au travers du NPV, en direction du 3^e ventricule. Puis, à proximité du bord du ventricule, il effectue un angle droit pour longer le bord de ce même ventricule en direction de l'hypothalamus médio-dorsal.

Dans le cas de la cellule 24, après un changement brutal de direction à proximité du péricaryon, l'axone présente un cheminement horizontal à partir du NMD, en direction de l'aire hypothalamique latéro-dorsale.

L'axone de la cellule 26 longe le bord supérieur du fornix pour descendre ensuite en direction de l'aire hypothalamique latérale.

La cellule 35 présente une bifurcation axonique nette se produisant à 120 um du péricaryon. L'une des branches axoniques chemine verticalement en direction de l'hypothalamus médio-dorsal, alors que l'autre se dirige vers le NPV homolatéral.

L'axone de la cellule 38 longe le bord interne du fornix, à l'intérieur de l'aire périfornicale.

SECONDE PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE DES
EFFERENCES DES NEURONES DU
NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL

La seconde partie de cette thèse est consacrée à l'étude expérimentale des efférences du NMD. Pour déterminer les projections des neurones du NMD, nous avons fait appel à différentes techniques neuroanatomiques. Certaines sont fondées sur la lésion électrolytique unilatérale ou bilatérale du noyau, d'autres utilisent les propriétés de transport intra-axonal de traceurs appliqués dans des conditions "in vivo" et "in vitro". Afin d'identifier certaines des projections ainsi mises en évidence, les techniques neuroanatomiques ont été dans certains cas couplées à une étude immunocytochimique.

En ce qui concerne le transport intra-axonal des traceurs, il sera rappelé dans un 1^{er} chapitre leurs propriétés d'incorporation et de migration dans l'axone. L'accent sera mis sur les propriétés des traceurs utilisés dans notre étude.

La présence de terminaisons nerveuses enképhalinergiques dans l'éminence médiane (EM) et dans le septum latéral (SL) du Cobaye nous a tout d'abord amenés à rechercher l'existence d'une relation directe entre le NMD et l'une et/ou l'autre de ces structures. Les résultats de ces travaux seront présentés dans les 2^e et 3^e chapitres de cette partie.

Enfin en faisant plus particulièrement appel à une technique neuroanatomique de transport intra-axonal réalisée "in vitro" sur tranches d'hypothalamus, certaines projections efférentes du NMD vers d'autres régions du cerveau ont pu être définies et seront détaillées dans le 4^e chapitre.

I - CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

A - Généralités sur le transport intra-axonale de la peroxydase et des fluorochromes

Depuis les travaux initiaux de KRISTENSSON et OLSSON (1971), KRISTENSSON et al. (1971) et LA VAIL et LA VAIL (1972), la peroxydase du Raifort, enzyme de poids moléculaire 40.000, est largement utilisée comme marqueur en neuroanatomie, en raison de ses propriétés de migration intra-axonale.

Les avantages de cette substance ont d'abord été exploités pour le marquage des corps cellulaires après migration intra-axonale somatopétale, ou rétrograde, à partir des terminaisons axoniques du neurone (KRISTENSSON et OLSSON, 1971).

Comme cela avait déjà été suggéré (TURNER et HARRIS, 1974 ; REPERANT, 1975 ; COLMAN et al., 1976 ; MESULAM, 1978) et définitivement démontré par MESULAM et MUFSON (1980), la peroxydase est également transportée dans l'axone dans le sens somatofugal, ou antérograde, à partir du corps cellulaire vers l'axone, qui peut ainsi être marqué jusqu'à ses extrémités.

La mise en évidence du produit de réaction lié au transport antérograde de la peroxydase nécessite toutefois une technique de révélation histochimique plus sensible que celle couramment utilisée (DAB: GRAHAM et KARNOVSKY (1966)) pour la démonstration du transport rétrograde. En ce sens, l'introduction de la TMB (HARDY et HEIMER, 1977 ; MESULAM et ROSENE, 1977 ; MESULAM, 1978 ; DE OLMOS et al., 1978 ; MESULAM et BRUSHART, 1979) en tant qu'agent chromogène, beaucoup plus efficace (MESULAM, 1978 ; MESULAM et ROSENE, 1979) que la DAB utilisée par les premiers auteurs, a marqué un progrès décisif dans cette méthode. Elle peut être en effet utilisée à la fois pour visualiser les afférences à une

région donnée (par transport rétrograde à partir des terminaisons axonales présentes dans cette région) et les efférences d'une population neuronale (par transport antérograde à partir des corps cellulaires). Les principaux avantages de la méthode tiennent au fait que l'activité enzymatique de la péroxydase est bien préservée tout au long de la procédure expérimentale, que la technique de mise en évidence histochimique est simple, et surtout que le produit de réaction offre une bonne stabilité dans le temps (revue dans NASSEL, 1983).

D'autres produits ont été proposés pour étudier les connexions inter-neuronales. La plupart d'entre eux sont des colorants fluorescents, ou fluorochromes, qui possèdent également des propriétés de migration intra-axonale. Le premier utilisé a été l'EVANS BLUE (STEWART et SCOVILLE, 1976), suivi rapidement par de nombreuses autres substances fluorescentes (KUYPERS et al., 1977, 1979, 1980 ; VAN DER KOOY et al., 1978 ; BENTIVOGLIO et al., 1979a,b, 1980a,b). Dans notre étude, en plus de la péroxydase, deux composés fluorescents ont été utilisés : le DAPI (KUYPERS et al., 1977 ; YEZIERSKY et BOWKER, 1981) et le PI (KUYPERS et al., 1979). Les raisons ayant dicté le choix de ces fluorochromes seront exposées plus loin. Nous mettons à part le LY, composé qui, bien que présentant aussi des propriétés de transport rétrograde (STEWART, 1981), n'a été utilisé dans ce travail qu'au cours des injections intracellulaires.

Les propriétés de la péroxydase, exception faite des mécanismes de l'endocytose qui restent beaucoup moins connus (KEY et GIORGI, 1987), ont fait l'objet de très nombreuses études quant à l'internalisation du produit et à son transport intra-axonal, aux compartiments sub-cellulaires impliqués dans le stockage et la dégradation de l'enzyme et aux différentes conditions permettant d'optimiser cette technique de marquage. Une synthèse de ces données apparaît dans MESULAM (1982). Beaucoup moins documentées sont les propriétés des fluorochromes qui, comme dans notre étude, sont principalement utilisés comme traceurs rétrogrades, bien que la plupart présentent également la faculté de migrer de manière antérograde (KUYPERS et al., 1979 ; ARBUTHNOTT et al., 1982).

Sans revenir en détail sur les considérations liées aux propriétés des traceurs utilisés ici, il faut souligner certains points qui se révèlent importants pour l'interprétation des résultats :

- mécanismes de capture des traceurs.
- transport intra-axonal bi-directionnel des traceurs.
- site efficace de capture des traceurs à l'emplacement de l'injection.
- compatibilité des traceurs entre eux et combinaison avec la technique immunocytochimique.
- marquage d'éléments névrogliques.
- utilisation des traceurs "in vitro".

B - Mécanismes de capture des traceurs

Les cellules nerveuses ont la propriété d'internaliser par endocytose certaines molécules exogènes, de les stocker dans des organites et de les transporter le long de leurs axones.

1) Péroxydase

a - Incorporation dans le neurone

L'efficacité de la peroxydase, comme cela a été montré récemment (KEY et GIORGI, 1987), tient surtout au fait que les solutions utilisées contiennent principalement des iso-enzymes chargées positivement qui se fixent sur la membrane grâce à des interactions électrostatiques, sans spécificité vis-à-vis du type cellulaire. Comme l'indique la figure 28, l'incorporation de l'enzyme peut s'effectuer à différents niveaux du neurone : terminaison axonique (a), corps cellulaire (b) et/ou dendrites (c), axone sectionné (d). Seuls les axones intacts traversant le site d'injection (e) ne pourraient faire l'objet d'une incorporation de la substance.

b - Marquage de type "solide"

La possibilité d'une migration intra-axonale aussi bien dans le sens rétrograde qu'antérograde après introduction du traceur dans un axone de passage se trouvant sectionné au cours de l'application (Fig. 28d), représentera la principale difficulté dans l'interprétation des résultats.

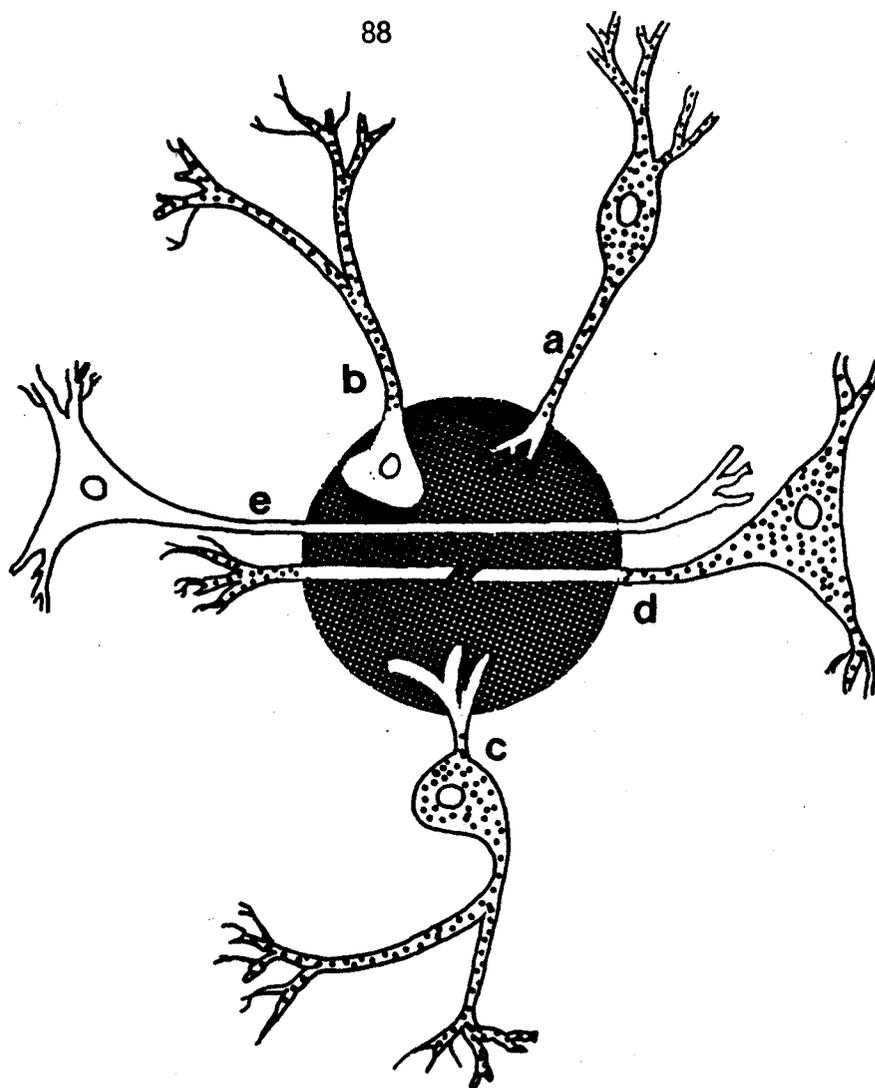


FIGURE 28 : Types d'incorporation et de transport de la peroxydase dans les cellules nerveuses (d'après MESULAM, 1982). La zone sombre représente le site d'injection et ses limites.

a) Incorporation de la peroxydase par une terminaison axonique intacte. Il s'en suit un transport rétrograde de l'enzyme à l'intérieur de l'axone jusque dans le péricaryon et les dendrites. Le même marquage pourrait être obtenu si l'incorporation était réalisée au niveau d'une collatérale axonique.

b) Incorporation de la peroxydase par un corps cellulaire intact suivie d'un transport antérograde en direction de la terminaison nerveuse.

c) Incorporation de la peroxydase par des dendrites intactes, donnant lieu à un marquage du péricaryon et des branches axoniques.

d) Incorporation de la peroxydase par un axone sectionné. La pénétration de l'enzyme dans la partie proximale de l'axone entraîne un transport de type rétrograde vers le péricaryon. Le marquage de la partie distale de l'axone se réalise principalement par diffusion intra-cytoplasmique.

e) L'incorporation de la peroxydase par un axone intact traversant le site d'injection ne se produit pas.

En plus du marquage de type granulaire le plus souvent observé lors d'un transport rétrograde de peroxydase, un autre type de marquage, dit "solide" (KEEFER, 1978), pourrait caractériser l'incorporation de l'enzyme par une fibre sectionnée. Ce type de marquage plus intense est en effet observé lorsque la peroxydase est introduite dans des fibres sectionnées (ADAMS et WARR, 1976 ; KEEFER, 1978 ; KEEFER et al., 1980 ; MORRELL et al., 1981). Il a cependant été également observé lorsque des modifications de la technique permettent soit le transport d'une plus grande quantité de peroxydase (KEEFER, 1978 ; WEST et BLACK, 1979 ; KEEFER et al., 1980) soit l'activation du transport rétrograde (MORRELL et al., 1981). En conséquence, la présence d'un marquage de type "solide" n'est pas l'indice sûr d'une pénétration du traceur dans une fibre sectionnée. De plus, lors d'injections de peroxydase au contact de fibres sectionnées, les deux types de marquage (granulaire et "solide") peuvent très bien coexister (ADAMS, 1977) où alors le marquage granulaire être le seul présent (KRISTENSSON et OLSSON, 1976 ; ANDERSON et al., 1979 ; MALMGREN et OLSSON, 1979 ; MESULAM, 1982). Il apparaît enfin (MESULAM, 1982) que la distinction entre marquage granulaire (correspondant à un axone intact) et marquage "solide" (correspondant à un axone sectionné) ne puisse être valable lorsque la TMB est utilisée comme agent chromogène, et que dans ce cas, un transport rétrograde à partir des terminaisons intactes puisse donner lieu aussi à un marquage de type "solide".

Il sera noté dans notre travail que des neurones appartenant à deux populations distinctes se projetant vers une région commune ayant reçu une application de peroxydase révèlent respectivement un marquage de type granulaire et un marquage de type "solide". Cela indique de toute évidence que les neurones ont des propriétés différentes de pompage, de transport et de stockage de l'enzyme. Ces propriétés peuvent entraîner une accumulation plus ou moins importante de peroxydase dans le corps cellulaire, ce qui se traduit par un aspect différent des péricaryons marqués. A ce sujet, il a été montré (POULAIN, 1983) que les populations marquées de manière "solide" dans notre étude présentaient un aspect typiquement granulaire lorsque la concentration d' H_2O_2 était réduite (0,5 ml au lieu de 2 ml) au cours de la réaction histochimique. Il faut souligner également que le niveau d'activité électrique du neurone est directement en rapport avec les propriétés d'endocytose au niveau des

terminaisons et de transport intra-axonal (LITCHY, 1973 ; COOKE et al., 1975 ; ROGERS et al., 1980).

2) Fluorochromes

Peu de données sont relatives à l'incorporation des composés fluorescents dans la cellule nerveuse. On peut supposer (SCHMUED et FALLON, 1986) que certaines propriétés physiques du colorant (charge, solubilité, taille...) l'empêchent de traverser passivement la membrane. Il faut alors admettre que, comme la péroxydase, le fluorochrome puisse se fixer sur la membrane par interaction électrostatique et soit internalisé par endocytose. En fait, les arguments recueillis dans la littérature (PAYNE, 1987) tendent plutôt à démontrer que les fluorochromes sont incorporés uniquement par des axones sectionnés, alors que les données concernant la possibilité d'incorporation de ces produits par des membranes intactes sont contradictoires. Il semble cependant évident que les fluorochromes sont incorporés par endocytose au niveau des terminaisons axoniques (intactes) étant donné que des injections par voie intraveineuse de plusieurs de ces composés (VAN DER KRANS et HOOGLAND, 1983) conduisent à un marquage rétrograde des neurones du système nerveux central se projetant vers les régions dénuées de barrière hémato-encéphalique.

En ce qui concerne plus précisément les fluorochromes utilisés dans cette étude, il a été démontré que le DAPI et le PI étaient incorporés efficacement par des axones sectionnés (ILLERT et al., 1982), mais on peut supposer qu'ils sont également internalisés par endocytose au niveau des terminaisons nerveuses.

C - Transport intra-axonal bi-directionnel des traceurs

1) Transport rétrograde

La péroxydase, lors de son transport rétrograde, est véhiculée dans des vésicules qui, du fait de leur petite taille, sont invisibles au microscope optique (LA VAIL et LA VAIL, 1974 ; TURNER et HARRIS, 1974). Ceci explique l'absence de marquage des axones soumis à ce type de

transport. Au niveau du corps cellulaire, les vésicules se concentrent près du complexe de Golgi et fusionnent avec les lysosomes, d'où leur dégradation assez rapide (LA VAIL et LA VAIL, 1974 ; TURNER et HARRIS, 1974 ; BROADWELL et BRIGHTMAN, 1979). Ce processus donnera lieu à l'apparition de granules visibles au microscope optique qui conféreront au cytoplasme du péricaryon son aspect caractéristique (marquage de type granulaire). La vitesse du transport rétrograde de la peroxydase est évaluée de 84 à 113 mm/jour (MESULAM, 1982).

Les mécanismes de transport rétrograde des fluorochromes semblent, dans l'hypothèse d'une incorporation par endocytose, découler de propriétés semblables. Après des périodes de survie plus longues que celles nécessaires pour la peroxydase, la concentration du traceur diminue dans l'axone, tandis qu'elle augmente dans le péricaryon (SCHMUED et FALLON, 1986).

2) Transport antérograde

D'après MESULAM et MUFSON (1980), le transport antérograde de la peroxydase s'effectue de manière active et rapide à partir d'un corps cellulaire intact ou lésé. Sa vitesse est évaluée à 288 à 432 mm/jour. Le délai nécessaire à l'internalisation de la substance est plus élevé que dans le cas d'une incorporation par la terminaison nerveuse (60 s au lieu de 15 s). Ce transport actif rapide est assuré par les microtubules (SOTELO et RICHE, 1974 ; ALONSO et ASSENMACHER, 1978). Bien qu'invisibles au microscope optique, les vésicules unitaires ont tendance à se regrouper, ce qui permet, en utilisant la TMB, de mettre en évidence un produit de réaction granulaire dans les axones, lequel révèle le détail de leur morphologie et caractérise le transport antérograde de la peroxydase (MESULAM et BRUSHART, 1979). Les axones présentent alors un aspect ponctué en "corde à noeuds" ou en "pointillés", selon qu'ils apparaissent longitudinalement ou transversalement, en fonction du plan de section de la région marquée.

Il faut signaler qu'à proximité du site d'injection de la peroxydase (PUGH et STERN, 1984), comme c'est toujours le cas lors d'expériences réalisées sur tranches "in vitro", le transport antérograde de l'enzyme se caractérise plutôt par un marquage dense et homogène des axones (MASON et al., 1984). Ce marquage peut signaler une simple

diffusion intra-cytoplasmique du traceur (ne mettant pas en jeu de transport antérograde actif) qui intervient à partir de portions d'axones sectionnés et peut se manifester sur 25 mm (MESULAM et BRUSHART, 1979). Dans la pratique, il n'existe malheureusement aucun moyen de déterminer si le marquage observé provient d'une incorporation de la peroxydase par un corps cellulaire intact ou par un axone lésé. La technique d'application de la peroxydase dans notre étude (électrode de faible diamètre, courants d'éjection iontophorétique minimales) ne doit cependant produire qu'une lésion peu importante du tissu nerveux.

Le transport de certains fluorochromes est également possible dans le sens antérograde (KUYPERS et al., 1979 ; ARBUTHNOTT et al., 1982). Toutefois ni le DAPI (ASCHOFF et HOLLANDER, 1982) ni le PI (KUYPERS et al., 1979) ne semblent être transportés efficacement de manière antérograde.

D - Site efficace de capture des traceurs à l'emplacement de l'injection

En règle générale, ainsi que de nombreuses études l'ont montré (revue dans WARR et al., 1981), c'est au centre de l'injection, là où se trouve réalisée la plus forte concentration de peroxydase, que les mécanismes d'incorporation de l'enzyme par les terminaisons nerveuses sont les plus efficaces. Il est toutefois probable que le transport rétrograde puisse naître de régions plus éloignées du centre de l'injection, où la concentration de l'enzyme va en décroissant (AHLSEN, 1981).

Dans une description très précise du site d'injection des fluorochromes, CONDE (1987) parvient aux mêmes conclusions. Le transport rétrograde des traceurs s'effectuerait à partir de la zone centrale du site d'injection, tandis que les zones concentriques successives, bien que fluorescentes, ne donneraient pas lieu à une capture suffisante du composé pour qu'il puisse être impliqué dans les mécanismes aboutissant au marquage des corps cellulaires. C'est en se basant sur ce principe que nous avons décidé d'appliquer sous forme cristalline les traceurs choisis pour cette étude .

1) Implantation de cristaux de peroxydase

L'application de peroxydase sous forme cristalline, tout comme par iontophorèse, garantit une forte concentration de traceur au site choisi. Ce n'est pas le cas lors de micro-injections de la substance diluée qui diffuse alors largement dans le tissu nerveux. L'implantation de peroxydase sous forme cristalline présente un avantage supplémentaire lié au fait que la substance se solubilise lentement, ce qui conduit à un marquage des corps cellulaires plus important au point de vue quantitatif et qualitatif (GRIFFIN et al., 1979). Le procédé d'implantation utilisé dans cette étude est basé sur la technique décrite par WELLER et SMITH (1981). Il faut noter qu'au moment de l'implantation, l'expulsion du bouchon de cire dentaire provoque une dissociation du tissu favorable à une incorporation du traceur par les axones de passage qui se trouvent ainsi sectionnés.

2) Implantation de cristaux de composés fluorescents

En ce qui concerne les fluorochromes, des expériences préalables de micro-injection des substances (faiblement solubles) mises en suspension par sonification ont montré que les produits diffusaient largement dans le tissu nerveux, tout comme la peroxydase appliquée de la même manière. Des essais consistant à éjecter les fluorochromes par iontophorèse ont donné des résultats très inconstants, comme cela avait déjà été signalé par ALHEID et CARLSEN (1982). Nous avons donc étendu la technique d'implantation de peroxydase sous forme cristalline à l'application des fluorochromes. Cette technique a également été utilisée par HUMBERTSON et KIRK (1983) et LIND (1986).

E - Compatibilité des traceurs entre eux et combinaison avec la technique immunocytochimique

L'utilisation de 2 produits (ou plus) présentant des propriétés de transport rétrograde a ouvert la perspective de pouvoir démontrer la collatéralisation d'axones qui engagent leurs ramifications dans des projections différentes. Cette méthode requiert la faculté de pouvoir

observer alternativement ou simultanément dans le péricaryon les produits qui, injectés dans des parties distinctes du système nerveux, ont migré de manière rétrograde jusqu'au corps cellulaire d'origine.

La mise en évidence simultanée de la péroxydase et d'un autre traceur est possible: par exemple travaux de CESARO et al. (1979), KATAN et al. (1982) et CAVADA et al. (1984), mais difficile techniquement si l'on considère les inconvénients que présente la révélation histochimique par rapport aux avantages qu'offrent les fluorochromes, mis en évidence directement sous illumination adéquate. L'association de plusieurs fluorochromes peut ainsi donner lieu à un double (KUYPERS et al., 1977 ; VAN DER KOOT, 1978 ; BENTIVOGLIO et al., 1979a,b) ou même un triple marquage (STAINES et al., 1988) de neurones individuels.

1) Application de plusieurs traceurs fluorescents : choix des traceurs

Dans notre étude, le choix de deux fluorochromes permettant de mettre en évidence une projection double de neurones individuels a été dictée par la nécessité de différencier les fluorochromes présents dans les péricaryons en réalisant des excitations successives de longueurs d'onde différentes. On peut ainsi observer l'émission de fluorescence correspondant à chaque fluorochrome et distinguer ceux-ci à l'intérieur de cellules distinctes, aussi bien qu'à l'intérieur d'une même cellule.

Notre choix s'est porté sur le DAPI et le PI à cause de leurs valeurs spectrales bien distinctes (Fig. 29). L'excitation maximale agissant sur le DAPI se situe vers 350 nm et l'émission de fluorescence a une longueur d'onde moyenne de 500 nm, dans le domaine du bleu-vert. Pour le PI, l'excitation est réalisée vers 340 et 500 nm et l'émission de fluorescence a une longueur d'onde dans le domaine du rouge vers 600 nm. Pour ces deux composés, les spectres d'excitation comme les spectres d'émission ont donc des valeurs bien tranchées. Le bloc de filtres le plus indiqué pour le DAPI est le bloc A (filtre d'excitation = BP 340-380 nm, longueurs d'onde mesurées au milieu du pic), le fluorochrome donnant alors une teinte bleu brillant aux neurones qui le contiennent. Nous avons remarqué cependant que l'utilisation du bloc de filtres D (filtre d'excitation = BP 355-425 nm) à bande plus large, donnait une image plus

claire, bien que moins contrastée et facilitait l'observation à faible grossissement. Les neurones marqués apparaissent alors verts.

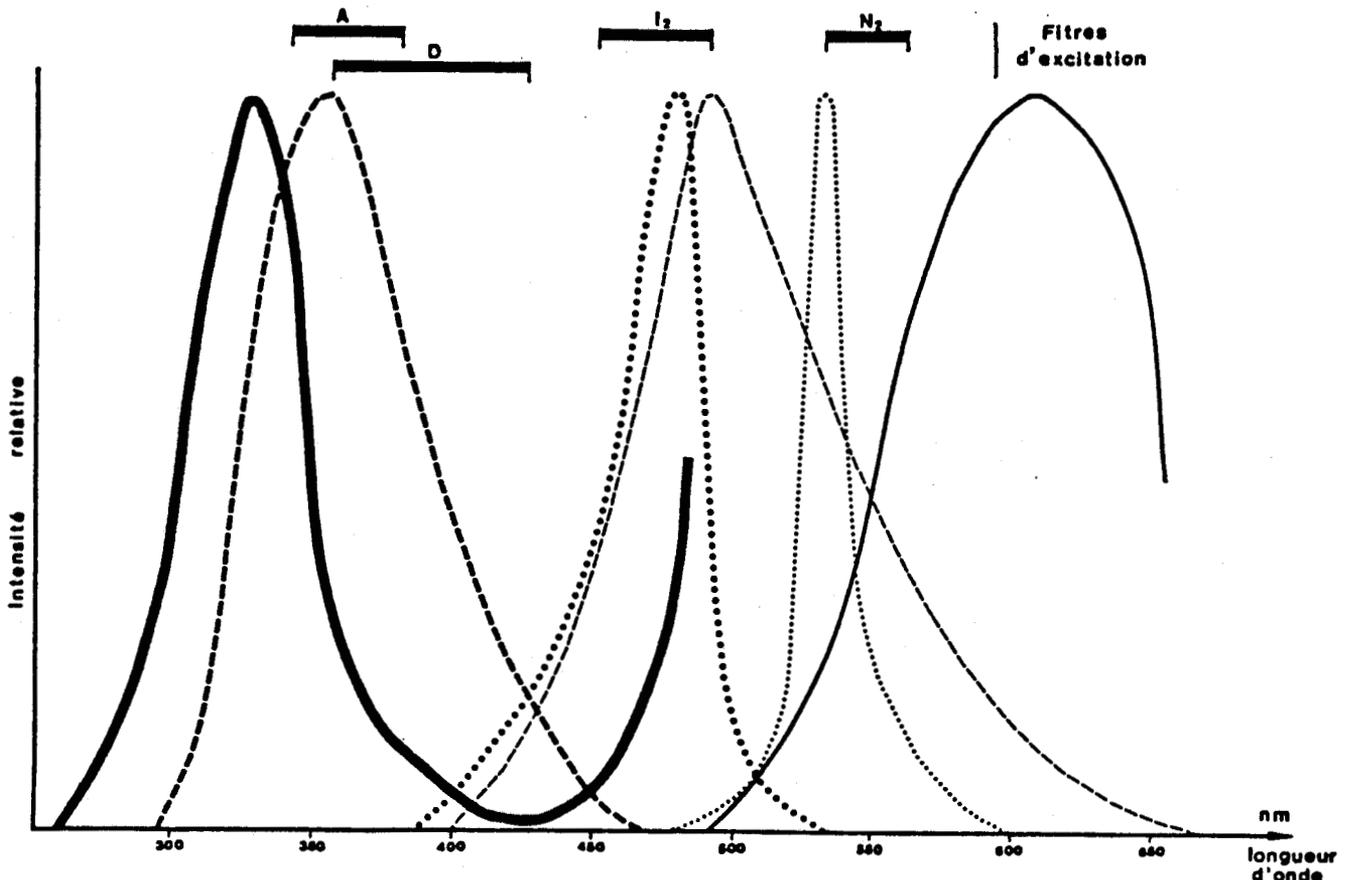


FIGURE 29 : Spectres d'excitation et d'émission des trois marqueurs fluorescents utilisés pour cette étude comme traceurs rétrogrades ou marqueurs immunocytochimiques :

	spectre d'excitation	spectre d'émission
PI	—————	—————
DAPI	- - - - -	- - - - -
FITC

Pour le spectre d'excitation, la courbe indique l'efficacité de l'excitation pour la longueur d'onde correspondante.

Pour le spectre d'émission, la courbe indique l'intensité de la lumière émise lorsque le fluorochrome est excité par la longueur d'onde d'excitation maximale.

Les gammes de longueurs d'ondes efficaces des filtres utilisés pour cette étude sont représentés au dessus des courbes.

(d'après HOKFELT et al. 83b et BECKER "La microscopie en fluorescence", LEITZ, 85)

Les neurones marqués par le PI ont toujours été observés avec le bloc de filtres N₂ (filtre d'excitation = BP 530-560 nm).

2) Combinaison de la technique des traceurs fluorescents avec la technique immunocytochimique

L'utilisation de traceurs fluorescents dans des expériences de transport rétrograde est tout à fait compatible avec la détection immunocytochimique du produit élaboré par les neurones mis en évidence au cours de ces expériences (revues dans HOKFELT et al., 1983b ; CONDE, 1987). C'est, par rapport à la peroxydase, l'un des principaux avantages de l'utilisation des produits fluorescents pour lesquels, en outre, la fixation du tissu ne soulève pas de problèmes majeurs. La fixation du tissu peut donc être adaptée au protocole de la détection immunocytochimique. L'absence d'un traitement préalable pour révéler le produit accumulé dans le corps cellulaire après transport intra-axonique permet une compatibilité totale avec la mise en évidence immunocytochimique.

Le fluorochrome utilisé pour marquer l'anticorps dans la technique immunocytochimique est le FITC. Ce composé fluorescent dont l'excitation maximale se situe vers 490 nm et l'émission de fluorescence entre 500 et 550 nm apparaît vert. Le bloc de filtre I₂ (filtre d'excitation = BP 450-490 nm) est optimal pour ce composé. Bien que les courbes d'émission du DAPI et du FITC se chevauchent partiellement (Fig. 29), ces deux composés ont quand même été associés dans nos expériences visant à réaliser un double marquage par transport rétrograde et par immunocytochimie. En effet, dans ces expériences de double marquage, la fluorescence du fluorochrome présent dans le péricaryon après transport rétrograde est fortement atténuée par la procédure de révélation immunocytochimique. Il fallait donc choisir un composé donnant la fluorescence la plus vive et la plus persistante après transport rétrograde. Ces conditions sont réalisées avec le DAPI qui, de plus, est un des fluorochromes qui donne des résultats quantitativement comparables à ceux obtenus avec la peroxydase (ASCHOFF et HOLLANDER, 1982). Les excitations maximales agissant sur le DAPI et le FITC sont suffisamment tranchées (respectivement 350 nm et 490 nm) pour que leur différenciation soit nette en passant du bloc de filtres A (ou D) au bloc de filtres I₂.

F - Marquage d'éléments névrogliques

Lors de l'utilisation de certains fluorochromes dans des expériences de marquage par voie rétrograde, en particulier du DAPI (ASCHOFF et HOLLANDER, 1982), il a été constaté, comme dans la présente étude, une accumulation de cellules gliales autour des péricaryons marqués. Les cellules gliales apparaissent comme des petits noyaux ronds fluorescents, ce qui les distingue tout à fait des corps cellulaires neuronaux reconnus comme ayant accumulé le produit transporté par voie axonale de manière rétrograde. Il faut supposer que la présence de ces cellules gliales soit l'indice d'une extrusion du fluorochrome consécutive à son accumulation dans le péricaryon (BENTIVOGLIO et al., 1980b). Cette diffusion du produit hors du neurone marqué par transport rétrograde ne pose aucun problème d'interprétation des résultats si elle n'aboutit qu'à une coloration des cellules gliales, facilement identifiables. Que cette diffusion puisse donner lieu à un marquage de cellules nerveuses voisines conduirait au contraire à des erreurs importantes dans l'évaluation des populations marquées par transport rétrograde. Malheureusement, comme le souligne CONDE (1987), le problème reste posé.

La présence de cellules gliales fluorescentes est d'autre part associée à un transport antérograde du traceur qui s'accompagnerait d'une diffusion de ce dernier tout au long de son parcours intra-axonal (ARBUTHNOTT et al., 1982). Comme cela a déjà été signalé, le DAPI ne donne pas lieu à un transport antérograde. On pourra donc considérer que le marquage des cellules gliales est restreint aux seules zones comportant des péricaryons marqués après transport rétrograde.

G - Utilisation des traceurs "in vitro"

Avec l'apparition des modèles "in vitro" de tranches de cerveau maintenues en survie, il était tentant de transposer à ces préparations les techniques de marquage neuronique utilisant les traceurs intra-axonaux. Leur principal avantage consiste évidemment à pouvoir localiser sous loupe binoculaire la structure devant recevoir l'injection du traceur. MASON et al. (1984) ont été les premiers à utiliser ce modèle

pour réaliser des injections de peroxydase dans les noyaux supraoptiques du rat. Cette opération a permis le marquage des corps cellulaires et le transport antérograde de l'enzyme à distance dans les prolongements axoniques reconnaissables à leur aspect fin et "pointillé" et caractérisés par de nombreuses images de collatéralisation.

Depuis, peu d'études ont utilisé cette approche (SRETAVAN et SHATZ, 1984 ; EKSTROM, 1985 ; BERNARDO et al., 1986; BERNARDO et WOOLSEY, 1987). BERNARDO et al. (1986) notent que l'application de peroxydase "in vitro" ne perturbe pas les propriétés de l'enzyme quant à sa pénétration dans les éléments nerveux et à sa mobilité intra-axonale. Comme cet auteur, nous avons vérifié que l'aspect des neurones marqués "in vitro", ne différait pas de ce qui est observé "in vivo", aussi bien pour les corps cellulaires observés après transport rétrograde que pour les prolongements ayant donné lieu à un transport antérograde.

Trois points seront cependant évoqués, qui pourraient avoir des conséquences sur l'aspect du marquage observé "in vitro" :

- premièrement, il faut considérer le temps limité de maintien en survie de la tranche (5 heures environ) par rapport au temps de survie de l'animal après l'injection de peroxydase (24 heures). Dans nos préparations, ce temps de survie plus limité a semblé favoriser le transport antérograde au détriment du transport rétrograde. Le marquage des prolongements nerveux par transport antérograde était toujours intense alors que les neurones identifiés après transport rétrograde présentaient un produit de réaction à peine suffisant pour permettre une bonne observation. Cette particularité peut probablement s'expliquer par la différence existant entre les vitesses de transport dans les deux directions de l'axone, la vitesse étant beaucoup moins importante pour le transport rétrograde .

- deuxièmement, l'utilisation de la tranche qui peut modifier l'activité électrique des neurones à laquelle les processus d'endocytose et de transport de la peroxydase sont étroitement liés (LITCHY, 1973 ; COOKE et al., 1975). Les éléments nerveux en particulier ne sont pas soumis à l'action des anesthésiques dont le rôle dans la modification du transport actif de l'enzyme a été souligné (ROGERS et al., 1980). De plus, certaines catégories de neurones sont privées de leurs afférences inhibitrices ou excitatrices, ce qui peut modifier leur rythme de décharge et donc leurs possibilités de transport intra-axonal.

- un dernier point enfin est inhérent à l'utilisation même d'un "fragment" de tissu sectionné comprenant de ce fait un grand nombre de prolongements nerveux coupés au niveau des plans de section de la tranche. Alors qu'une exocytose de peroxydase par les terminaisons axoniques intactes après transport antérograde est un phénomène rare, voire inexistant (MESULAM, 1982), il est probable que l'enzyme, après transport depuis le corps cellulaire, puisse être libérée par un axone sectionné. Nous avons observé sur nos préparations que des zones superficielles correspondant à une projection compacte de prolongements emplis de peroxydase se caractérisaient par un produit de réaction très intense formant une "tache". Bien que cela ne puisse être prouvé, il faut tenir compte de la possibilité que ces "taches" correspondent à une sortie de la peroxydase des axones sectionnés. Il faut supposer cependant que, même si cela était le cas, les quantités de peroxydase libérées seraient insuffisantes pour initier un nouveau processus d'endocytose pouvant mener à un transport intra-axonal de l'enzyme.

II - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS L'EMINENCE MEDIANE

De nombreuses études immunocytochimiques ont démontré la présence d'enképhalines dans l'EM du Rat et du Cobaye (HOKFELT et al., 1977 ; SAR et al., 1978 ; TRAMU et LEONARDELLI, 1979 ; BEAUVILLAIN et al., 1980 ; MICEVYCH et ELDE, 1980 ; WAMSLEY et al., 1980 ; FINLEY et al., 1981 ; TRAMU et al., 1981 ; BEAUVILLAIN et al., 1984). Chez le Cobaye, faisant suite à des observations à l'échelle optique (TRAMU et LEONARDELLI, 1979 ; TRAMU et al., 1981), une analyse ultrastructurale a démontré que les enképhalines étaient présentes sous forme de granules immunoréactifs dans les terminaisons nerveuses de la zone palissadique de l'EM (BEAUVILLAIN et al., 1980), ce qui indique que le peptide peut être libéré dans les capillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire.

L'origine de la projection enképhalinergique vers la zone externe de l'EM n'a pas fait l'objet d'études systématiques. D'après les observations réalisées chez le Rat, elle pourrait être recherchée dans l'hypothalamus médio-basal (ROMAGNANO et al., 1982) ou dans la partie parvicellulaire du NPV, là où une petite population de neurones contient à la fois les enképhalines et le CRF (HOKFELT et al., 1983a ; DAIKOKU et al., 1985). Il était intéressant de rechercher si le NMD pouvait contribuer à l'innervation enképhalinergique de l'EM.

A - Lésions électrolytiques du noyau magnocellulaire dorsal

Afin de déceler une éventuelle relation directe entre le NMD et l'infundibulum, des destructions du noyau unilatérales (6 animaux) (Fig. 30 a, b) et bilatérales (5 animaux) (Fig. 33g) ont été réalisées. Par une technique immunocytochimique, les terminaisons enképhalinergiques ont

FIGURE 30

- Destruction du noyau magnocellulaire dorsal (coupes frontales, coloration à la thionine).

a) Localisation du noyau magnocellulaire dorsal

Barre de calibration : 200 μ m

b) Aspect, après 6 jours de survie, d'une lésion électrolytique ayant détruit le noyau magnocellulaire dorsal.

Barre de calibration : 200 μ m

- Marquage immunocytochimique anti-enképhaline dans l'éminence médiane après lésions bilatérales du noyau magnocellulaire dorsal (coupes frontales).

c) Rostralement, une immunoréactivité anti-enképhaline est détectée dans le noyau arqué, le bord externe et le bord interne (autour du recessus infundibulaire) de l'éminence médiane.

Barre de calibration : 200 μ m

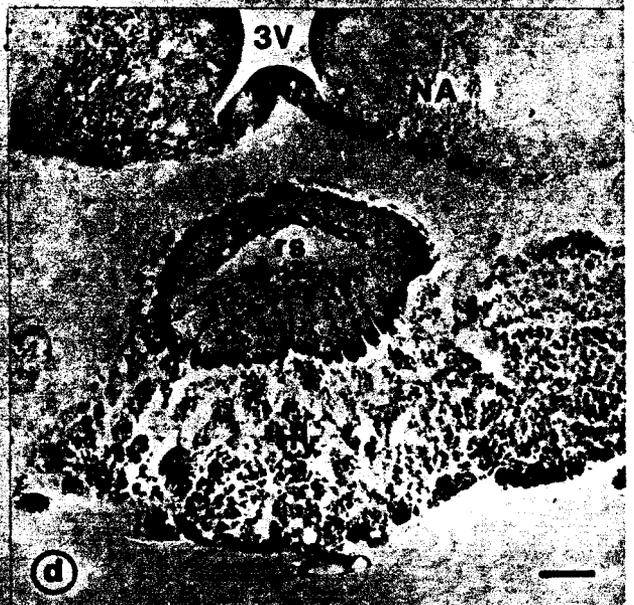
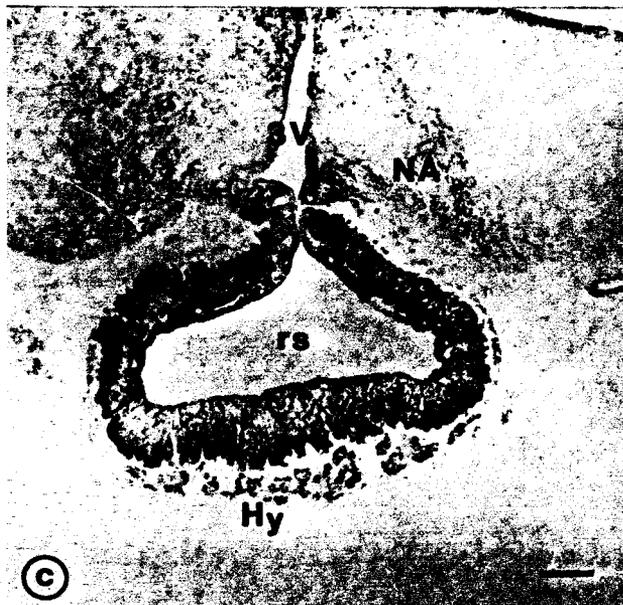
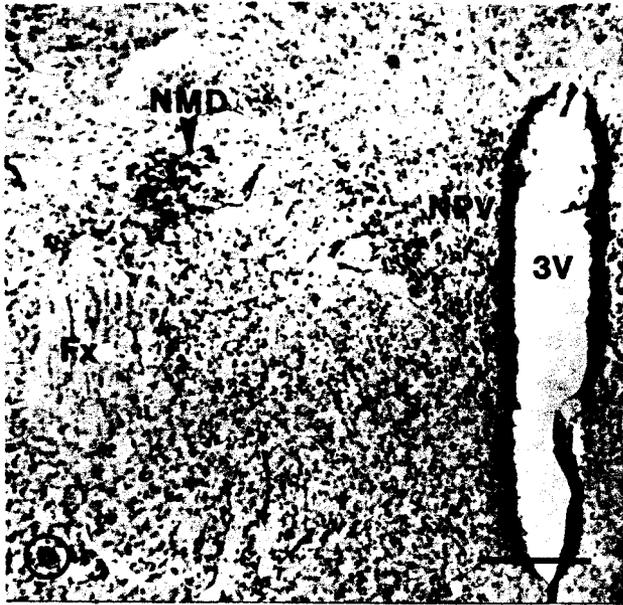
d) Caudalement, le marquage sur le bord externe de l'éminence médiane, ainsi qu'autour des anses capillaires du système porte est particulièrement intense. De plus, il faut noter le marquage de corps cellulaires dans le lobe antérieur de l'hypophyse.

Barre de calibration : 200 μ m

- Marquage immunocytochimique anti-enképhaline de l'éminence médiane d'un animal témoin, n'ayant subi aucune lésion, dans des plans de coupe frontaux équivalents.

e,f) On ne note pas de différence significative dans le marquage de cet animal témoin avec les animaux ayant subi une lésion.

Barre de calibration : 200 μ m



ensuite été révélées et observées dans l'EM.

Après comparaison entre les animaux lésés (temps de survie de 9 à 27 jours) (Fig. 30 c, d) et les animaux témoins (Fig. 30 e, f), c'est à dire n'ayant pas subi de lésion du NMD mais dont les coupes de l'EM ont été traitées de manière conjointe, il n'a jamais été remarqué de différence dans l'intensité et l'abondance du marquage observé dans l'EM.

Dans tous les cas, après lésions unilatérales ou bilatérales, de très nombreuses terminaisons nerveuses enképhalinerigiques sont observées, comme chez les animaux témoins, autour des vaisseaux du plexus porte dans la couche superficielle de l'EM, ainsi qu'autour des boucles capillaires longues et courtes. Un autre contingent de fibres nerveuses immunoréactives est également observé dans la couche interne de l'EM ainsi que dans la zone de jonction entre le noyau arqué et la lèvre dorsale de l'EM (Fig. 30c).

B - Injections intraveineuses de peroxydase

Les résultats obtenus après destruction électrolytique unilatérale ou bilatérale du NMD suivie de l'identification des terminaisons enképhalinerigiques immunoréactives dans l'EM laissent supposer que les neurones enképhalinerigiques du NMD ne se projettent pas vers l'EM. Ce point a été précisé par une autre méthode permettant de déterminer l'origine des neurones à destinée infundibulaire chez le Cobaye, afin de prouver définitivement qu'il n'existait pas de relation directe entre le NMD et l'EM.

La méthode consistant à injecter un traceur doué de propriétés de transport rétrograde directement dans l'EM est particulièrement délicate à appliquer chez le Cobaye. L'injection de peroxydase dans l'EM par iontophorèse après une approche stéréotaxique par voie dorsale a été réalisée par LECHAN et al. (1980) chez le Rat et par POULAIN (1979) chez le Cobaye. Toutefois cette approche, compliquée chez le Cobaye par l'imprécision stéréotaxique, rend très aléatoire la possibilité de restreindre l'injection du traceur à la seule EM et les résultats sont très difficiles à interpréter.

Une autre approche consistant à exposer l'EM par dissection de la région parapharyngée et à appliquer directement le traceur sous

contrôle visuel a été pratiquée chez le Rat (WIEGAND et PRICE, 1980 ; LECHAN et al., 1982 ; SILVERMAN et al., 1987) mais est irréalisable chez le Cobaye étant donné la morphologie différente de la sphère buccale chez cet animal.

Le problème de l'origine des neurones à destinée infundibulaire a donc été appréhendé dans notre travail par injection intraveineuse de peroxydase. Il est en effet prouvé que plusieurs régions du cerveau qui possèdent des capillaires fenêtrés, donc perméables, permettent un échange bi-directionnel de protéines entre le sang et le tissu nerveux (BALIN et al., 1986). Ces régions, dénuées de barrière hémato-encéphalique, comprennent l'EM, mais aussi l'organe vasculaire de la lame terminale, l'organe subfornical, l'area postrema et l'organe sous-commissural (organes circumventriculaires) ainsi que l'hypophyse (lobes postérieur et antérieur) et l'épiphyse. Les neurones ayant accès à ces régions et dont les terminaisons se situent dans les espaces périvasculaires des capillaires perméables auront la possibilité de capter la peroxydase introduite dans la circulation sanguine. Il est bien démontré (revue dans JENNES et STUMPF, 1986) que la peroxydase transportée dans le sang va, au niveau des capillaires perméables, être incorporée dans les terminaisons axoniques par endocytose puis transportée de manière rétrograde le long de l'axone et enfin s'accumuler dans le péricaryon, permettant ainsi la détection du corps cellulaire d'origine. La méthode est particulièrement appropriée à l'identification des cellules neuroendocrines dont les terminaisons nerveuses aboutissent au contact des capillaires fenêtrés de l'EM et du lobe postérieur de l'hypophyse (BROADWELL et BRIGHTMAN, 1983). Dans la description originale de la méthode appliquée à la Souris (BROADWELL et BRIGHTMAN, 1976), il avait déjà été montré que la plus forte concentration de neurones marqués après injection intraveineuse de peroxydase était observée dans l'hypothalamus. La méthode a ensuite été mise à profit chez différents mammifères pour étudier la localisation et la morphologie des neurones hypothalamiques magnocellulaires aboutissant au lobe postérieur de l'hypophyse (THEODOSIS et al., 1976 ; ARMSTRONG et HATTON, 1980 ; THEODOSIS, 1982) ainsi que celle des neurones parvicellulaires se terminant dans l'EM (VAN DEN POL et CASSIDY, 1982 ; JENNES et STUMPF, 1986 ; YOUNGSTROM et NUMEZ, 1987 ; SILVERMAN et al., 1987).

Il faut bien remarquer que tous les tissus possédant des

capillaires perméables sont infiltrés simultanément au cours de l'injection intraveineuse de la peroxydase. Cela constitue le principal désavantage de la méthode qui ne permet pas de définir exactement parmi les organes dénués de barrière hémato-encéphalique celui (ou ceux) qui reçoivent les projections nerveuses.

1) Incorporation de la peroxydase au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse

A la suite des injections par voie intrajugulaire de 50 à 100 µg de peroxydase chez 6 animaux, une zone intensément marquée, indiquant donc une forte concentration du marqueur, est visible dans la neurohypophyse, l'EM et le noyau arqué. L'imprégnation du noyau arqué par la peroxydase transportée dans le sang est un phénomène déjà signalé par LEONHARDT et EBERHARDT (1972), BROADWELL et BRIGHTMAN (1976) et VAN DEN POL et CASSIDY (1982). Ces auteurs notent que quelques minutes après l'injection de peroxydase, il se produit une forte extrusion de l'enzyme dans l'EM, l'enzyme diffusant ensuite dorsalement dans le noyau arqué, sans toutefois atteindre les noyaux ventromédians proches. Dans notre matériel, avec l'utilisation du TMB comme chromogène, toute la région tubérale (EM et noyau arqué) est obscurcie par un fort produit de réaction (Fig. 31b) qui masque les neurones tubéro-infundibulaires et les vaisseaux qui, par ailleurs, dans tout l'hypothalamus, sont bien apparents car fortement réactifs.

2) Topographie des neurones hypothalamiques marqués

Dans l'hypothalamus, des cellules réactives présentent, au niveau du soma et des branches dendritiques proximales, une réaction granulaire tout à fait caractéristique d'un transport rétrograde de peroxydase à partir de leurs terminaisons nerveuses (Fig. 31e).

Des groupes de neurones magnocellulaires sont observés dans le noyau supra-optique, dont on distingue très bien la partie rétrochiasmatisque qui s'étend à la manière d'un fer à cheval ouvert vers l'infundibulum, tout à la base du cerveau (Fig. 31a). Les parties latérales et périventriculaires du NPV (Fig. 31 a, c) sont abondamment pourvues en éléments magnocellulaires marqués. Entre ces deux régions, la

FIGURE 31

Microphotographie des cellules marquées dans l'hypothalamus après injections intraveineuses de peroxydase (coupes frontales).

- a) Absence de marquage au niveau du noyau magnocellulaire dorsal (flèche). Les corps cellulaires marqués par la peroxydase sont présents dans le noyau paraventriculaire et la partie rétrochiasmatische du noyau supraoptique (pointes de flèches).

Barre de calibration : 206 μm

- b) Sur une coupe plus postérieure, des cellules marquées par la peroxydase apparaissent dans le quadrant dorso-latéral de l'aire périfornicale (noyau paraventriculaire accessoire, indiqué par une flèche). Il faut noter la diffusion du produit de révélation de la peroxydase au niveau de l'éminence médiane ainsi que dans la portion du noyau arqué qui lui est adjacente.

Barre de calibration : 220 μm

- c) Grossissement du noyau paraventriculaire montrant la répartition des neurones magnocellulaires dans la partie latérale du noyau paraventriculaire (NPVm) et le long du 3^e ventricule. Dans la partie médiane du noyau (NPVp), les cellules sont principalement de type parvicellulaire.

NPVm = Noyau paraventriculaire, pars magnocellularis

NPVp = Noyau paraventriculaire, pars parvicellularis

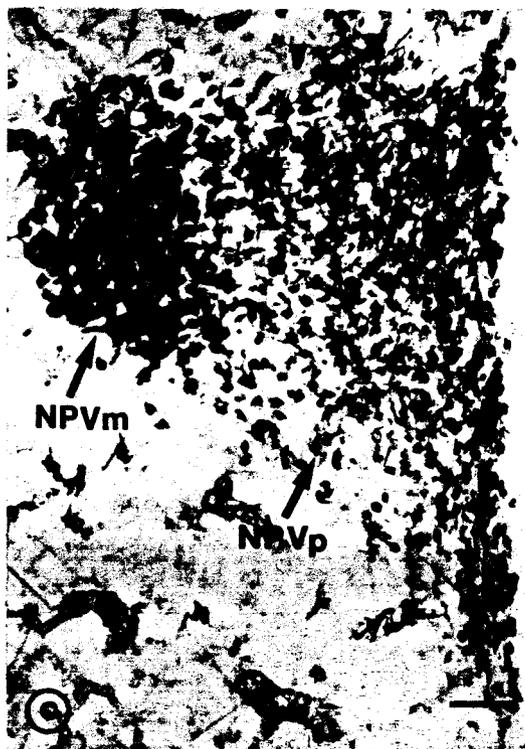
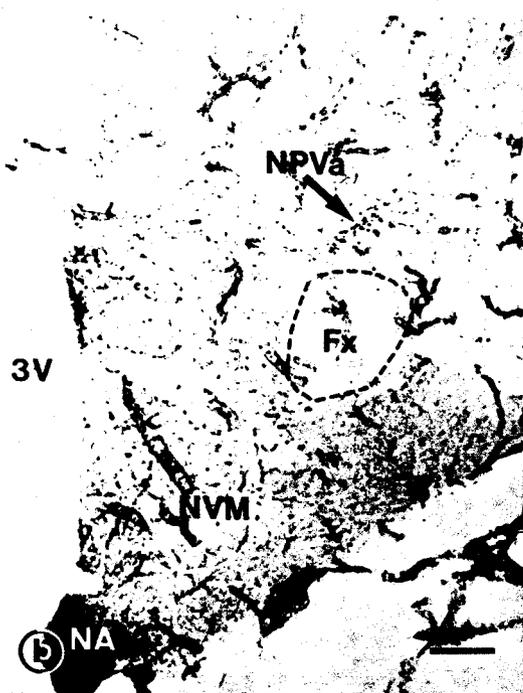
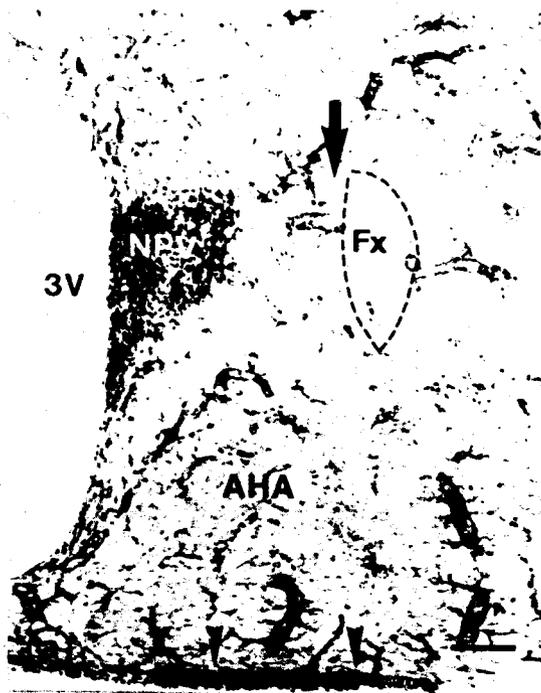
Barre de calibration : 59 μm

- d) Détail du noyau paraventriculaire accessoire observé plus caudalement.

Barre de calibration : 59 μm

- e) Détail des péricaryons du noyau paraventriculaire accessoire

Barre de calibration : 10 μm



masse du NPV est surtout constituée de neurones parvicellulaires marqués (Fig. 31c). Un groupe important de neurones magnocellulaires associé à un riche réseau de vaisseaux sanguins se situe dorsolatéralement aux colonnes du fornix (Fig. 31 b, d). La composante la plus dorsale de ce groupe de neurones (Fig. 31b), appelée noyau paraventriculaire accessoire dans l'atlas de POULAIN (1974), correspond au groupe des "cellules neurosécrétrices accessoires III₃" de la classification de PALKOVITS et al. (1974) chez le Rat. Plus extérieurement (Fig. 31d) la composante latérale de ce groupe de neurones peut-être assimilée "au noyau fornical antérieur" du Rat décrit par PETERSON (1966), correspondant au groupe "III₂" de la classification de PALKOVITS et al. (1974). Des groupes denses de neurones magnocellulaires ont également été observés dans l'aire rétrochiasmatique autour de la pointe ventrale du 3^e ventricule.

De nombreux éléments parvicellulaires sont dispersés dans les parties médianes et latérales de l'aire hypothalamique antérieure au voisinage du noyau suprachiasmatique, dans l'aire préoptique au niveau de la strie terminale et du noyau commissural antérieur (PETERSON, 1966), ainsi que dans le noyau triangulaire et tout au long de la région périventriculaire. Des cellules isolées, parfois de grande taille, sont observées dans l'hypothalamus latéral (HL).

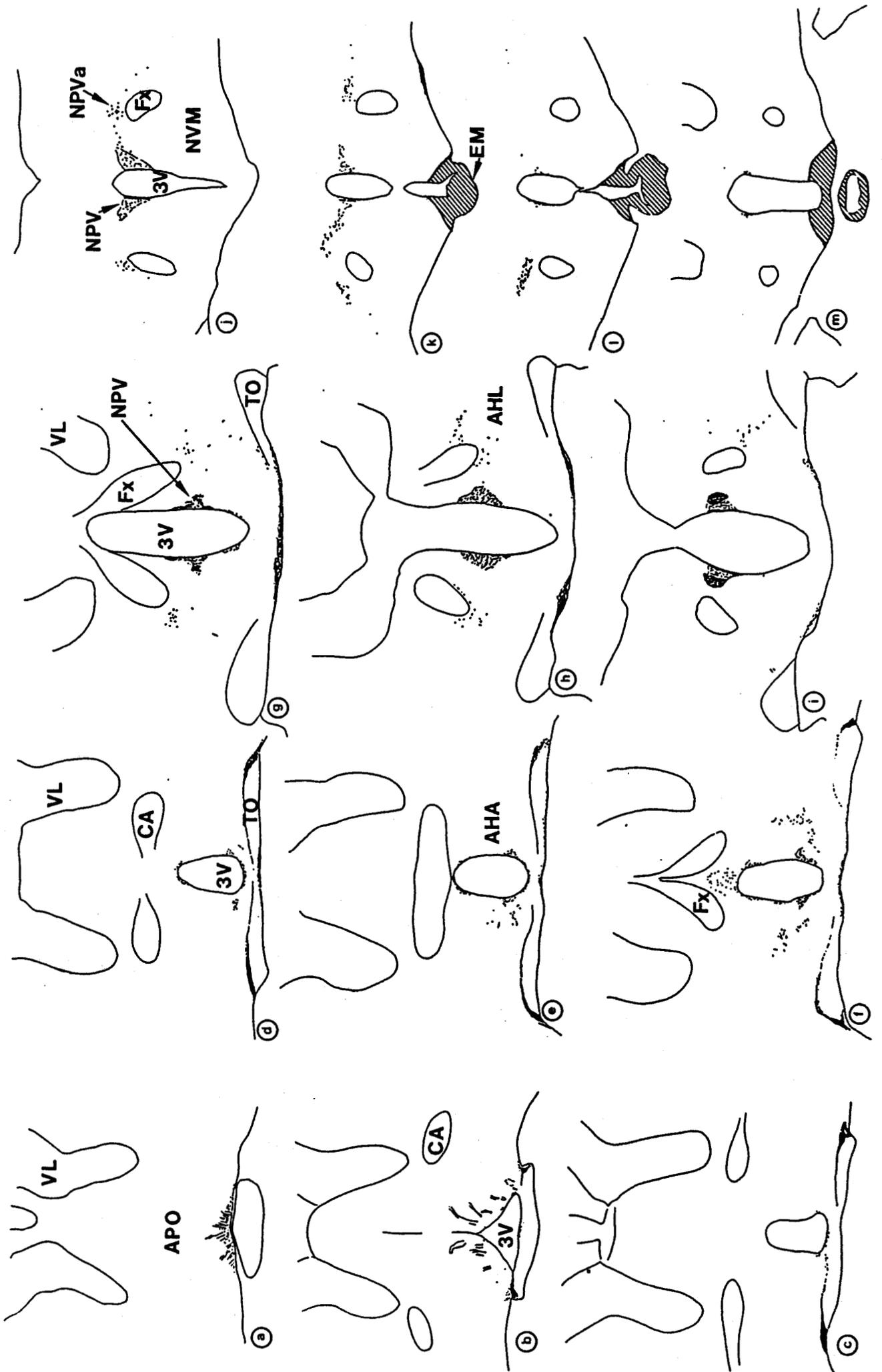
Ces injections réalisées chez différents animaux ont donné des résultats très semblables et les dessins de la figure 32 tracés à la chambre claire pour un animal, donnent un aperçu exact des observations réalisées dans leur ensemble.

En conclusion, les résultats obtenus après injection intra-veineuse de peroxydase indiquent de toute évidence que les neurones du NMD ne sont pas engagés dans une projection neuro-hémale quelle qu'elle soit. Aucune cellule marquée n'a en effet été observée dans les limites du NMD sur aucun des animaux. En conséquence, il est démontré que les cellules du NMD ne se projettent pas vers l'EM, ce qui vient corroborer les résultats obtenus à l'aide des lésions électrolytiques.

FIGURE 32

Dessins réalisés à la chambre claire de coupes frontales sériées d'hypothalamus indiquant la répartition topographique des péricaryons marqués après une injection intraveineuse de peroxydase.

Les figures sont orientées de la partie rostrale de l'hypothalamus (a) vers les régions caudales (m). Les zones hachurées correspondent aux régions de diffusion de la peroxydase dans l'éminence médiane et le noyau arqué adjacent (coupes de 100 μm).



III - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS LE SEPTUM LATERAL

L'innervation enképhalinergique du SL est particulièrement riche. La présence de nombreuses fibres et terminaisons enképhalinergiques, plus particulièrement abondantes dans la partie postérieure juxta-ventriculaire du noyau, a été notée par tous les auteurs ayant étudié la distribution des structures immunoréactives dans le septum à la fois chez le Rat (HOKFELT et al., 1977 ; SIMANTOV et al., 1977 ; WATSON et al., 1977 ; SAR et al., 1978 ; WAMSLEY et al., 1980 ; FINLEY et al., 1981 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; ONTENIENTE et al., 1982 ; GALL et MOORE, 1984 ; PETRUSZ et al., 1985 ; PALKOVITZ et BROWNSTEIN, 1985) et chez le Cobaye (TRAMU et al., 1981 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981, 1983 ; BEAUVILLAIN et al., 1983).

Des corps cellulaires enképhalinergiques, généralement mis en évidence après application de Colchicine, ont également été décrits dans le SL par certains de ces auteurs (HOKFELT et al., 1977 ; WAMSLEY et al., 1980 ; FINLEY et al., 1981 ; ONTENIENTE et al., 1982 ; GALL et MOORE, 1984 ; PETRUSZ et al., 1985 ; ONTENIENTE-KAH, 1987) chez le Rat et TRAMU et al. (1981) chez le Cobaye. Une confusion peut survenir quant à l'existence de tels corps cellulaires enképhalinergiques, tout au moins dans la partie juxta-ventriculaire du SL. Il a en effet été reconnu chez le Rat que, dans cette région, les images de corps cellulaires immunoréactifs correspondaient en fait à des corps cellulaires non immunoréactifs entourés d'une accumulation dense de terminaisons nerveuses enképhalinergiques, alors que les corps cellulaires enképhalinergiques proprement dits étaient localisés dans le septum antérieur et dans la partie plus médiane du SL (GALL et MOORE, 1984 ; PETRUSZ et al., 1985). Préalablement, l'existence d'arrangements péricellulaires de terminaisons nerveuses enképhalinergiques autour de neurones (non identifiés) de la

partie juxta-ventriculaire du SL avait été démontrée à l'échelle ultrastructurale par BEAUVILLAIN et al. (1983) et STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON (1983). Il faut conclure de l'ensemble de ces observations que la partie latérale du SL présente seulement une accumulation dense de fibres et terminaisons nerveuses enképhalinerigiques et que, tout au moins chez le Rat, des corps cellulaires enképhalinerigiques sont présents dans le SL mais localisés dans les parties plus médianes de cette même structure. En conséquence, l'innervation si riche du SL peut être amenée, au moins en partie, par les neurones enképhalinerigiques du septum lui-même (ceux-ci faisant office d'interneurones à projection courte (GALL et MOORE, 1984)) mais également par des fibres dont l'origine restait à découvrir. Un des objectifs de ce travail était de rechercher si le NMD pouvait participer à l'innervation enképhalinerigique du SL.

A - Lésions électrolytiques du noyau magnocellulaire dorsal

Les animaux ayant subi une destruction unilatérale (6 animaux) ou bilatérale (5 animaux) du NMD (cf p 100) ont été utilisés dans le but de déceler une éventuelle relation entre le NMD et le SL.

1) Lésions électrolytiques unilatérales

A la suite de lésions unilatérales ayant détruit entièrement le NMD (Fig. 33f), une forte déplétion du matériel immunoréactif vis-à-vis des enképhalines a été notée dans le SL des animaux lésés, en comparaison avec les animaux témoins (n'ayant pas reçu de lésion du NMD mais dont les coupes de l'EM ont été traitées de manière conjointe). Cette déplétion est plus particulièrement nette du côté de l'injection (Fig. 33 a, b, d). Cette diminution du matériel immunoréactif est aussi plus importante dans la partie postérieure du SL, où elle intéresse les subdivisions dorsale et ventrale (SLd et SLv).

Plus antérieurement, on observe des deux côtés du SL une certaine symétrie dans la répartition du matériel immunoréactif. Un examen attentif montre toutefois que la densité des terminaisons nerveuses marquées est moins importante du côté de l'injection.

Dans la partie antérieure du septum, les territoires marqués ne

FIGURE 33

Marquage immunocytochimique anti-enképhaline sur des coupes frontales du septum après destruction unilatérale et bilatérale du noyau magnocellulaire dorsal.

a, b) Marquage anti-enképhaline dans la partie caudale du septum latéral après lésion unilatérale du noyau magnocellulaire dorsal droit. Les 2 microphotographies ont été prises sur la même coupe. Noter la diminution du produit de révélation de la peroxydase du côté de la lésion (flèche) par rapport à l'autre côté.

Barre de calibration : 258 μm

c) Absence de marquage anti-enképhaline dans la partie caudale du septum latéral après lésion bilatérale du noyau magnocellulaire dorsal.

Barre de calibration : 258 μm

d) Détail du marquage anti-enképhaline de la région indiquée par les pointes de flèches sur la figure a). Les terminaisons nerveuses enképhalinergiques immunoréactives entourent les péricaryons du septum latéral et en révèlent l'aspect.

Barre de calibration : 22 μm

e) Détail du marquage anti-enképhaline dans la région indiquée par des pointes de flèches sur la figure c) présentant la diminution importante du marquage des fibres et terminaisons nerveuses. En comparaison avec ce qui est observé en d), on remarque que seul un petit nombre de fibres marquées est encore visible.

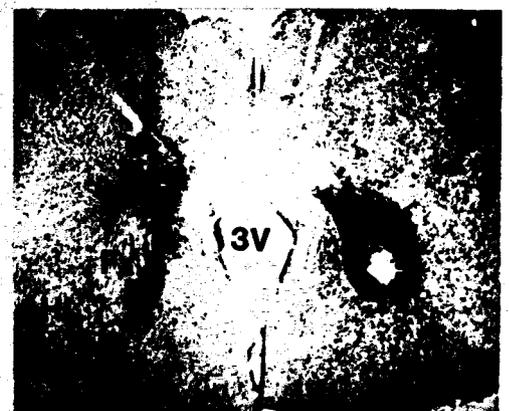
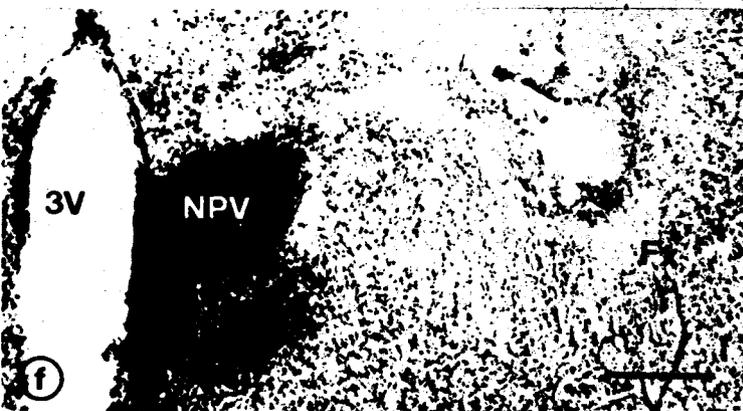
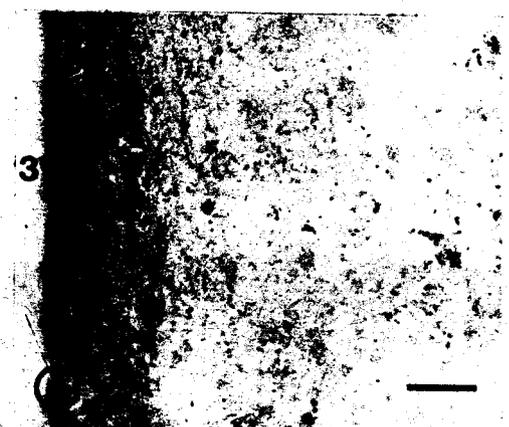
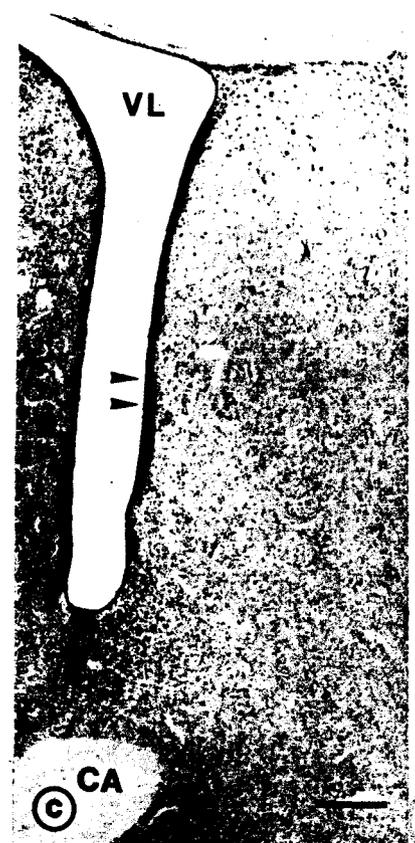
Barre de calibration : 22 μm

f) Lésion unilatérale du noyau magnocellulaire dorsal.

Barre de calibration : 200 μm

g) Lésion bilatérale du noyau magnocellulaire dorsal.

Barre de calibration : 1 mm



représentent que quelques îlots disséminés dans le septum latéral dorsal et le septum latéral intermédiaire (SLi). Dans cette région, ni la densité des terminaisons nerveuses marquées, ni la localisation de ces terminaisons ne présentent de différences entre les deux côtés du septum.

2) Lésions électrolytiques bilatérales

Des destructions bilatérales du NMD (Fig. 33g) ont été suivies d'une diminution très importante du nombre des fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives dans le SL chez tous les animaux ayant subi les lésions (Fig. 33c), comparativement aux animaux témoins. Seules de rares et courtes portions de fibres nerveuses immunoréactives sont alors encore observables (Fig. 33e). Le matériel immunoréactif persistant après les lésions bilatérales du NMD est négligeable aussi bien dans les régions caudales que rostrales du SL.

B - Implantations "in vivo" de traceurs dans le septum latéral

Les résultats des expériences de destructions électrolytiques du NMD, faisant état d'une forte déplétion du matériel immunoréactif dans le SL, laissent supposer l'existence d'une relation directe entre ces deux structures. Toutefois, les lésions électrolytiques touchant à la fois les corps cellulaires situés dans la région du NMD et des axones en transit provenant d'autres régions du cerveau, il peut subsister un doute quant à l'origine réelle de la projection enképhalinergique vers le SL.

Nous avons voulu, afin de préciser les résultats obtenus par destruction électrolytique du NMD :

- établir de façon définitive l'existence d'une relation directe hypothalamo-septale ayant pour origine, au moins en partie, le NMD.

- prouver la nature enképhalinergique d'un tractus issu du NMD et aboutissant au SL.

Pour mettre en évidence la relation directe entre les terminaisons nerveuses du SL et les péricaryons du NMD, nous avons utilisé la technique basée sur les propriétés de transport intra-axonal rétrograde

de la peroxydase et de composés fluorescents, après leur implantation dans le SL.

L'association du transport rétrograde d'un marqueur fluorescent avec la détection immunocytochimique des enképhalines a permis d'autre part de démontrer la nature enképhalinergique de la relation mise en évidence par transport intra-axonal rétrograde.

1) Description du site d'implantation du traceur

a - Situation du site d'implantation du traceur

Grâce à la technique employée, le centre du site d'implantation du traceur sous forme cristalline est facilement identifiable par la présence du fragment de cire dentaire qui bouchait l'orifice de la pipette.

Pour tous les animaux retenus dans cette étude, tant en ce qui concerne les implantations de cristaux de peroxydase que de produits fluorescents, les sites d'implantation sont centrés dans le SL, à mi-distance de la commissure blanche antérieure et des corps calleux, à proximité de la paroi du ventricule cérébral latéral (Fig. 34a). Seuls ont été utilisés les animaux pour lesquels les zones de diffusion du traceur étaient toujours limitées au côté de l'injection et ne franchissaient pas la ligne médiane pour atteindre le septum contro-latéral. Toutefois, comme la zone de diffusion du traceur atteignait toujours le ventricule cérébral latéral, ce qui aurait pu conduire à un marquage neuronal après dilution du traceur dans le liquide céphalo-rachidien (EISENMAN, 1985), le cerveau d'un animal dans lequel un cristal de traceur avait été introduit directement dans le ventricule a été examiné de manière à s'assurer qu'aucun marquage n'était obtenu dans les régions hypothalamiques concernées.

b - Aspect de la région ayant reçu une application de peroxydase

Sur les coupes frontales passant par le site d'implantation de la peroxydase dans le SL, la zone centrale caractérisée par la présence du bouchon de cire présente un produit de réaction très intense. Cette zone centrale est elle-même entourée d'une région plus

FIGURE 34

Microphotographies de cellules marquées dans le noyau magnocellulaire dorsal après implantation de cristaux de peroxydase dans le septum latéral (coupes frontales).

- a) Site d'implantation (étoile) des cristaux de peroxydase dans le septum latéral.

Barre de calibration : 1 mm

- b) Aspect du noyau magnocellulaire dorsal correspondant au cadre indiqué par une flèche sur la figure 35.

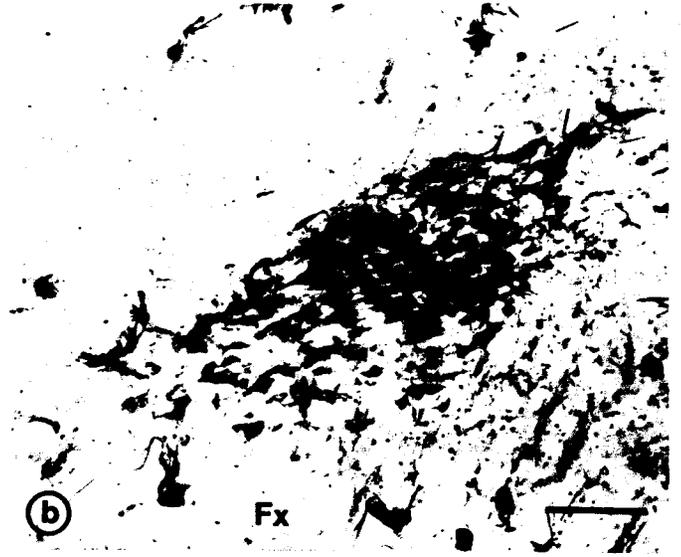
Barre de calibration : 100 μ m

- c) Neurone marqué. Noter que le noyau du neurone (n) ne présente pas de grains de peroxydase.

Barre de calibration : 10 μ m

- d) Neurones marqués. Noter le marquage granulaire du cytoplasme.

Barre de calibration : 10 μ m



claire correspondant à la zone de diffusion de l'enzyme. Le passage de la zone centrale à la zone périphérique se fait graduellement, sans démarcation réelle (Fig. 34a).

c - Aspect de la région ayant reçu une application de DAPI ou de PI

Avec les deux fluorochromes utilisés : le DAPI et le PI, la zone centrale de la région injectée contenant le bouchon de cire apparaît nécrosée. Tout autour, une zone fortement fluorescente indique une concentration très forte du traceur. Au delà de ces zones centrales, l'intensité de la fluorescence décroît progressivement. Cette région périphérique à fluorescence décroissante présente deux zones concentriques (Fig. 37a) :

- une première zone comportant de très nombreuses cellules gliales représentées par un noyau fluorescent (zone de diffusion du traceur)

- une seconde zone renfermant des neurones marqués bien identifiables se détachant sur un fond non fluorescent.

La délimitation de ces zones est beaucoup moins nette cependant pour le PI, pour lequel l'aire fluorescente s'estompe progressivement en s'éloignant du centre de l'implantation. De plus, la zone de diffusion de ce traceur s'étend de manière beaucoup plus importante que dans le cas de l'utilisation du DAPI.

2) Localisation des corps cellulaires marqués par transport rétrograde

Après les implantations de peroxydase (15 animaux) et de fluorochromes (DAPI : 5 animaux ; PI : 3 animaux) dans le SL, des corps cellulaires marqués après transport rétrograde apparaissent bilatéralement dans les limites du NMD (Fig. 34b, 35, 37b). D'autres régions, notamment diencephaliques et amygdaliennes sont également marquées. La description de ces régions dépasse le cadre de ce travail ; nous présenterons toutefois, parallèlement aux résultats obtenus dans le NMD, ceux qui correspondent à l'HL, région proche qui est apparue particulièrement riche en corps cellulaires marqués (Fig 35, 36 a, c, 37b).

FIGURE 35

Dessins réalisés à la chambre claire de coupes frontales sèriées de l'hypothalamus indiquant la répartition topographique des neurones marqués après implantation de cristaux de péroxydase dans le septum latéral.

Les figures sont ordonnées de la partie rostrale de l'hypothalamus (a) vers la partie caudale (h). Le cadre de la figure e correspond à la microphotographie de la figure 34b.

Les flèches indiquent le noyau magnocellulaire dorsal du côté homolatéral à l'injection.

Coupes de 100 μm .

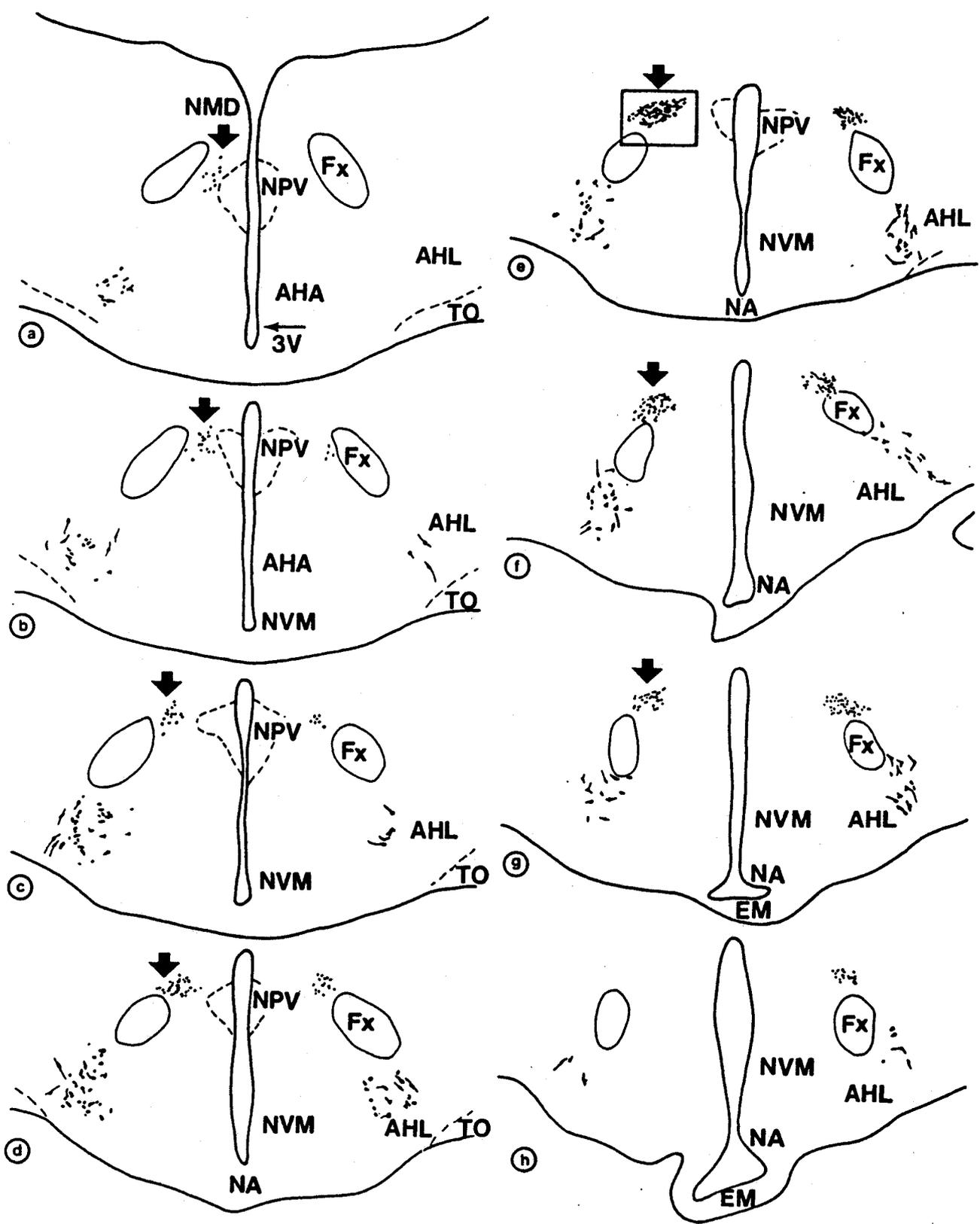


FIGURE 36

Marquage de type "solide" et de type "granulaire" de neurones de l'hypothalamus latéral après implantation de cristaux de peroxydase dans le septum latéral (coupes frontales).

a) Microphotographie d'une coupe de l'hypothalamus latéral présentant des corps cellulaires marqués du côté homolatéral à l'implantation de peroxydase. Les cellules présentent ici un aspect granulaire (révélation de la TMB par 0,5 ml de H_2O_2).

Barre de calibration : 132 μm

b) Dessin à la chambre claire d'un neurone présentant un marquage "solide". Ce neurone est caractéristique du type de neurones découverts dans l'hypothalamus latéral.

Barre de calibration : 50 μm

c) Microphotographie d'une coupe frontale de l'hypothalamus latéral présentant des corps cellulaires marqués du côté homolatéral à l'implantation de peroxydase. Les cellules présentent ici un aspect granulaire (révélation de la TMB par 0,5 ml de H_2O_2). Noter la position des neurones marqués dans l'hypothalamus latéral et dans l'aire périfornicale (contre-coloration au rouge neutre).

Barre de calibration : 132 μm

d) Exemple de neurones présentant un marquage de type "solide" dans l'hypothalamus latéral.

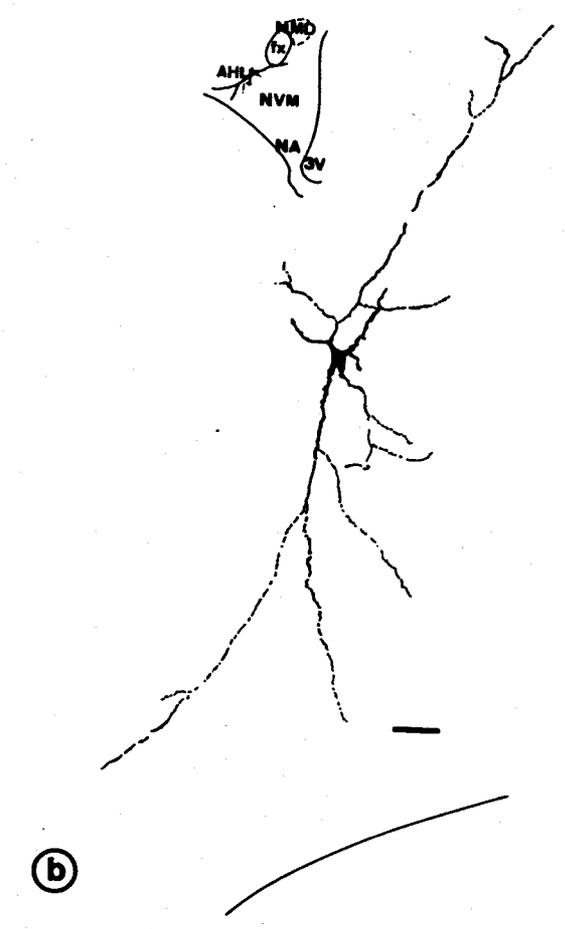
Barre de calibration : 36 μm



(a)



(c)



(b)



(d)

TO

a - Aspect des corps cellulaires marqués par transport rétrograde de péroxydase et de fluorochromes

a.1 - Transport rétrograde de péroxydase.

a.1.1 - Neurones marqués dans le noyau magnocellulaire dorsal

Les corps cellulaires marqués repérés dans la région du NMD sont ovoïdes ou piriformes (Fig. 34 c, d) et présentent une taille moyenne de $17,32 \mu\text{m}$ ($\sigma = 3,08 \mu\text{m}$) \times $7,70 \mu\text{m}$ ($\sigma = 1,76 \mu\text{m}$) ($n = 380$). Leur noyau possède un nucléole bien apparent. Les péricaryons pris individuellement sont le plus souvent orientés selon le même axe que le noyau lui-même et disposés à la manière d'écailles de poisson (Fig. 34b). Le cytoplasme présente les images caractéristiques d'un marquage de type granulaire. Les granulations bleu-noir de taille constante emplissent plus ou moins le cytoplasme qui reste clair (Fig. 34c). Les prolongements cellulaires sont parfois envahis par les granulations mais seulement sur une courte distance (Fig. 34 c, d). Le noyau n'est jamais obscurci par le produit de réaction.

L'observation des coupes frontales successives montre que l'ensemble des cellules du NMD s'étend d'avant en arrière sur près de $700 \mu\text{m}$ (Fig. 35). La partie antérieure du noyau consiste en quelques cellules éparpillées entre le fornix et la partie externe du NPV, correspondant au groupe des neurones magnocellulaires vasopressinergiques (Fig. 35 a,b). D'avant en arrière, sur $500 \mu\text{m}$ environ, le nombre de cellules augmente en même temps que l'ensemble du noyau paraît remonter le long de la bordure du fornix (Fig. 35 c à e), où dorsalement il atteint sa plus forte concentration (Fig. 35e). Postérieurement, le nombre de corps cellulaires décroît rapidement sur environ $200 \mu\text{m}$ (Fig. 35 f à h). Les limites du noyau sont toujours comprises dans un quadrant dorso-médian si l'on considère un système d'axes orthogonaux verticaux et horizontaux se croisant au sommet du fornix.

Les cellules marquées dans le NMD sont observées tant du côté de l'injection que du côté opposé, le nombre de cellules marquées du côté homolatéral étant cependant plus important (Fig. 35, 39). Cette particularité démontre l'existence d'une décussation des axones issus du NMD au cours de leur progression vers le SL. Cette décussation sera étudiée de manière quantitative un peu plus loin.

a.1.2 - Neurones marqués dans l'hypothalamus latéral

Ainsi que cela a déjà été signalé, des neurones marqués sont présents dans l'HL (Fig. 35 et 36). A l'inverse du marquage granulaire observé dans le NMD, le produit de réaction emplissant les péricaryons des neurones de l'HL est de type "solide" et pénètre largement dans les prolongements dendritiques, donnant ainsi aux cellules un aspect "Golgi-like" (Fig. 36 d, d). La majorité de ces corps cellulaires à marquage de type "solide" est localisée ventralement et latéralement par rapport au fornix, dans une zone pouvant être délimitée par le bord ventral du fornix, le tractus optique (ou la surface basale du cerveau) et la capsule interne (Fig. 36c).

Dans les plans frontaux antéro-postérieurs, la région renfermant les neurones marqués s'étend de l'avant depuis un plan renfermant la partie rostrale du NPV jusqu'à l'EM (Fig. 35). D'autres cellules du même type se trouvent également distribuées dans l'aire périfornicale, soulignant le bord ventral du fornix. Quelques corps cellulaires à marquage "solide" ont de plus pu être observés dans le NMD. Ces cellules représentent seulement 5,4% du nombre total des corps cellulaires identifiés dans ce noyau.

Les corps cellulaires à marquage de type "solide" sont généralement triangulaires ou fusiformes (Fig. 36b) et présentent des dimensions plus importantes que celles des neurones du NMD : en moyenne $25,20 \mu\text{m}$ ($\sigma = 4,67 \mu\text{m}$) \times $10,72 \mu\text{m}$ ($\sigma = 1,76 \mu\text{m}$) ($n = 16$). Du corps cellulaire émergent 2 à 5 troncs dendritiques dont les 2 plus importants apparaissent dans le prolongement du soma et s'étendent sur une distance pouvant atteindre $600 \mu\text{m}$. Parfois ces longues dendrites se ramifient près du péricaryon et suivent ensuite un trajet assez rectiligne ne présentant que peu de ramifications.

La majorité des neurones de type "solide" de l'HL présente un champ dendritique orienté et possède des prolongements qui s'étendent dorsalement en direction du fornix et ventralement vers la surface basale du cerveau (Fig. 36 b, d). Ainsi, l'ensemble de ces cellules présente l'aspect caractéristique des plis d'un rideau qui tomberait du fornix vers la base de l'hypothalamus. Au contraire, les dendrites des neurones de type "solide" dont les corps cellulaires sont localisés dans l'aire périfornicale, contournent en les enserrant les colonnes du fornix.

De même que les cellules marquées dans le NMD, les cellules marquées dans l'HL sont observées tant du côté homolatéral à l'injection que du côté contralatéral.

a.2 - Transport rétrograde de fluorochromes

Un marquage consécutif à un transport rétrograde de fluorochrome implanté dans le SL (Fig. 37a) a été observé dans le NMD et l'HL (Fig. 37b). La distribution de ces corps cellulaires marqués par les produits fluorescents (DAPI et PI) correspond parfaitement à la distribution obtenue après transport rétrograde de peroxydase, laquelle a été détaillée dans la partie précédente.

Le marquage par le DAPI est constitué d'une grande abondance de grains brillants (bleus sous bloc de filtre A, verts sous bloc de filtres D) présents dans le cytoplasme du péricaryon et des prolongements dendritiques proximaux (Fig. 37c; 40 a, c, e). Le noyau présente une fluorescence faible sur laquelle tranche la fluorescence plus forte du nucléole qui apparaît sous la forme d'un anneau caractéristique (ILLERT et al., 1982) (Fig. 40c). Toute la région contenant les neurones marqués par le DAPI présente aussi une accumulation de noyaux cellulaires fluorescents correspondant à des cellules gliales. Ces éléments fluorescents se distinguent facilement des noyaux des neurones marqués après transport rétrograde grâce à leur petite taille ainsi qu'à l'absence de nucléole identifiable par un anneau brillant.

Après implantations de cristaux de PI, le marquage de teinte rouge orangé (sous bloc de filtre N₂) est distribué de manière diffuse dans le cytoplasme des corps cellulaires marqués du NMD (Fig. 37d, 40 b, d, f).

Il faut noter que le nombre de neurones marqués par le DAPI est toujours supérieur à celui des neurones marqués par le PI lorsque ce dernier est appliqué à des sites comparables (Fig. 37 c, d). Les deux fluorochromes ont des propriétés différentes de diffusion (HOKFELT et al., 1983b), et la délimitation des zones donnant lieu à un transport rétrograde efficace reste très aléatoire. D'autre part, comme l'ont montré ASCHOFF et HOLLANDER (1982) dans leur étude comparative de plusieurs fluorochromes utilisés pour le transport rétrograde, le DAPI est quantitativement un meilleur marqueur que le PI.

FIGURE 37

Microphotographies de coupes frontales du septum et de l'hypothalamus après implantation de cristaux de DAPI et de PI dans le septum latéral.

- a) Aspect histologique du site d'implantation du DAPI. Le centre de l'implantation est repéré d'une part par le bouchon de cire dentaire (b) scellant l'orifice de la micropipette et éjecté avec le traceur, et d'autre part par une zone de nécrose. Une aire de concentration dense du traceur et une aire renfermant des cellules fluorescentes individuelles et des noyaux fluorescents sont organisées de manière concentrique.

Barre de calibration : 223 μm

- b) Marquage fluorescent de corps cellulaires dans le noyau magnocellulaire dorsal (flèche) et dans l'hypothalamus latéral après implantation de DAPI dans le septum latéral. Noter la présence de nombreuses cellules gliales.. Le 3^e ventricule se trouve sur la droite de la microphotographie.

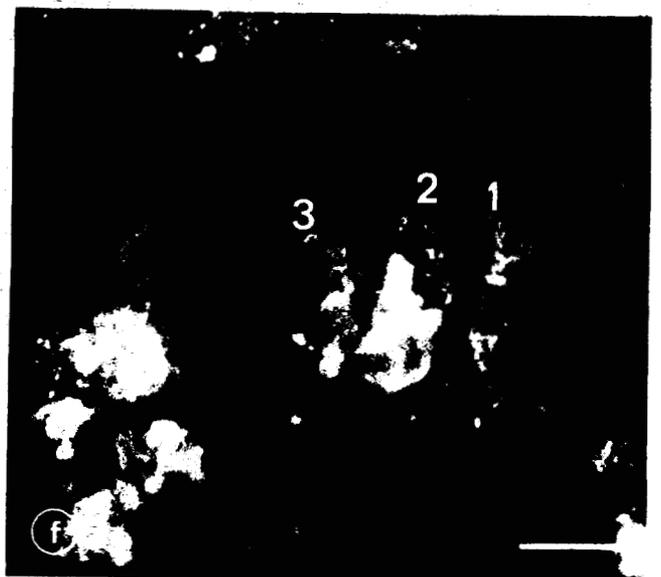
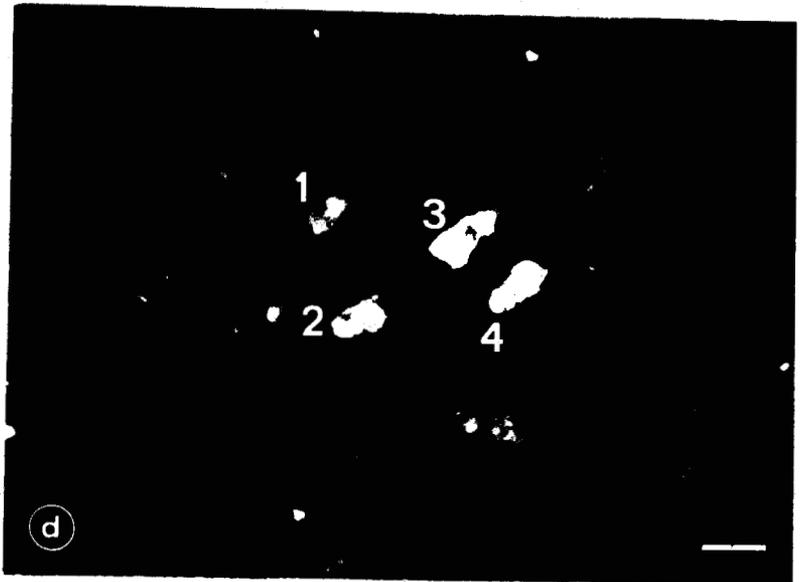
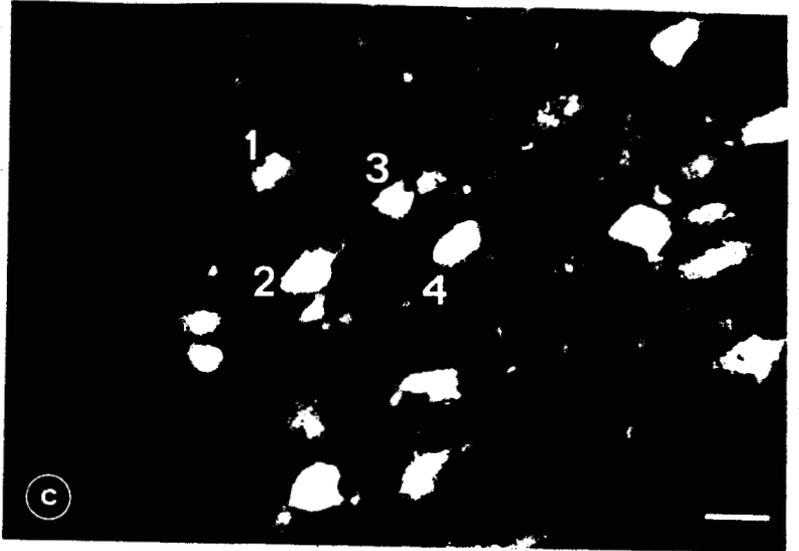
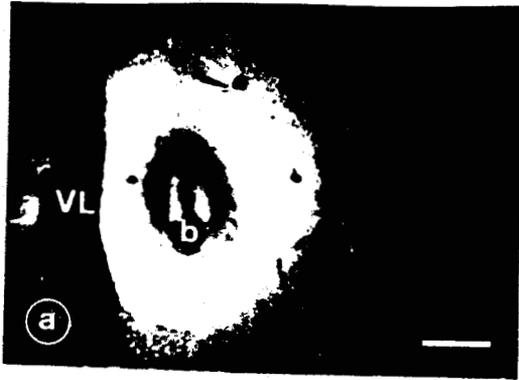
Barre de calibration : 168 μm

- c,d) Double marquage de corps cellulaires dans le noyau magnocellulaire dorsal après implantation de DAPI dans le septum latéral homolatéral et de PI dans le septum latéral controlatéral. Le nombre de péricaryons marqués par le DAPI (c) est beaucoup plus important que le nombre de péricaryons marqués par le PI (d). Les 4 cellules numérotées (1 à 4) sont marquées à la fois par le DAPI et le PI.

Barres de calibration = 20 μm

- e,f) Double marquage de corps cellulaires dans le noyau magnocellulaire dorsal par le DAPI transporté de manière rétrograde depuis le septum latéral (e) et par l'antisérum anti-*enképhaline* (f). Les cellules 1 et 3 marquées par le DAPI sont également immunoréactives. Ces figures sont un agrandissement des Fig 41a, b.

Barres de calibration = 9 μm



b - Etude quantitative réalisée sur les cellules marquées par la peroxydase

La facilité d'observation des cellules marquées par la peroxydase (utilisation du microscope optique en lumière blanche, longue conservation du produit de réaction après la révélation, grand nombre de corps cellulaires marqués) a permis de réaliser une étude quantitative des neurones du NMD marqués après implantation de ce traceur dans le SL.

b.1 - Corrélation entre les sites d'implantation et la localisation des cellules marquées

Bien que chez les 15 animaux retenus pour cette étude les sites d'implantation des cristaux soient toujours placés dans le SL, la répartition des cellules marquées dans le NMD a présenté des variations en fonction de la localisation précise du site d'implantation. Les résultats de cette étude quantitative menée sur 8 animaux sont représentés sur la figure 38.

Aux implantations localisées dans la partie caudale du SL, à égale distance des corps calleux et de la commissure blanche antérieure correspond le plus grand nombre de cellules marquées dans le NMD (animaux 9 et 10) (Fig. 38 b, c). Lorsque la peroxydase est appliquée dans des plans frontaux identiques, mais plus dorsalement (c'est-à-dire dans le SLd ; animal 6) (Fig. 38b) ou plus ventralement (dans le SLv ; animal 13) (Fig. 38c), le nombre de corps cellulaires marqués dans le NMD est très nettement réduit.

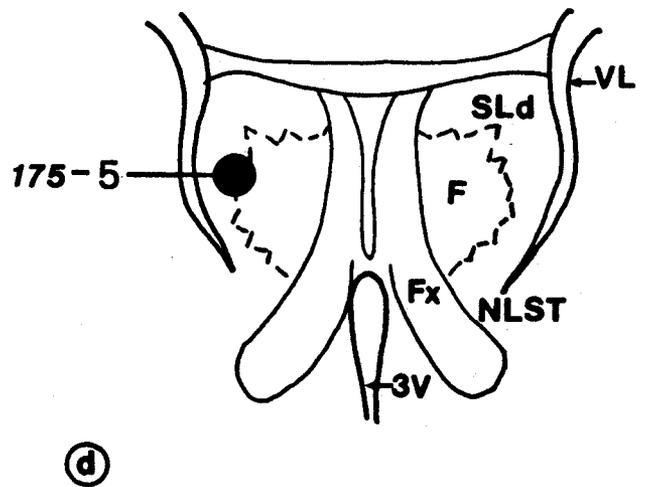
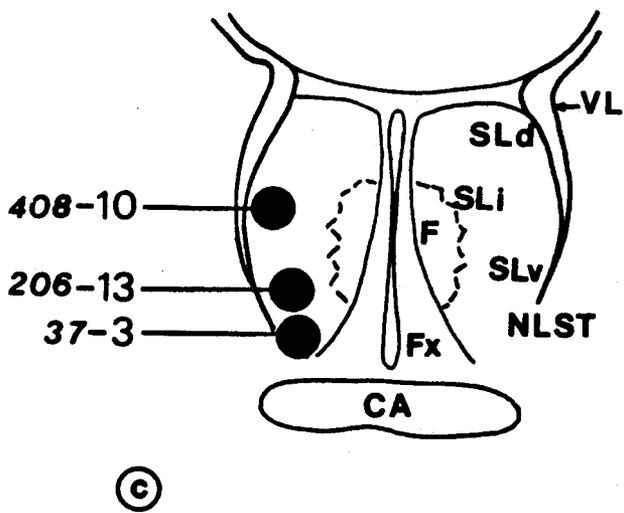
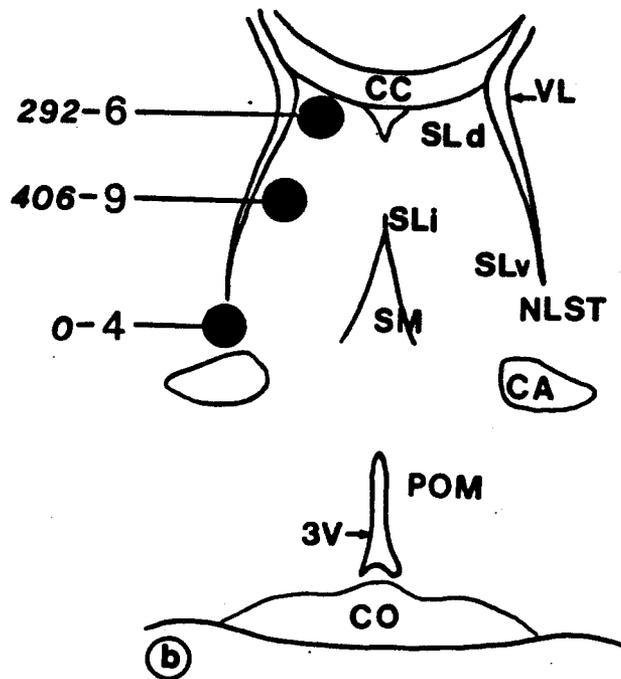
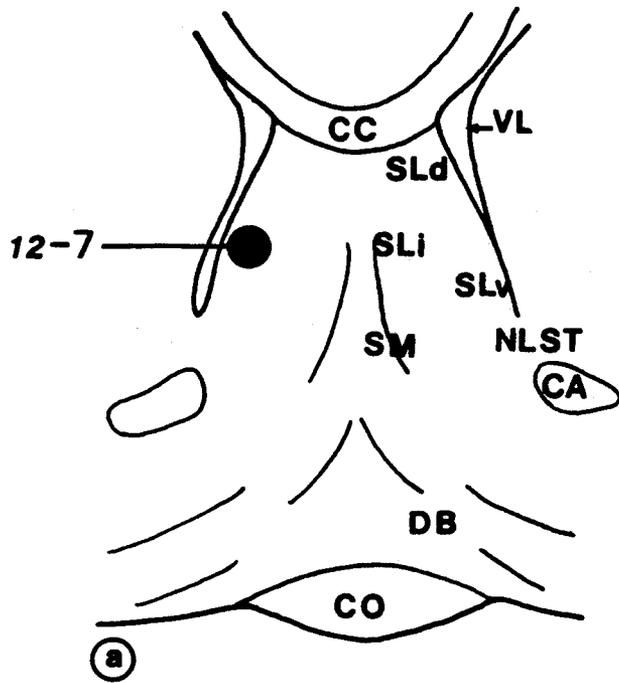
Un nombre encore important de neurones marqués est observé lorsque la peroxydase est implantée dans la partie la plus caudale du SL (animal 5) (Fig. 38d). Par contre, seul un faible contingent cellulaire se trouve marqué lorsque l'implantation est située dans la région rostrale du SL (animal 7) (Fig. 38a).

Dans deux cas (animaux 3 et 4) (Fig. 38 b, c), le site d'implantation de la peroxydase était situé dans le noyau du lit de la strie terminale. Bien que la zone de diffusion atteigne la région ventrale du SL ventral située à proximité, quelques cellules seulement sont observées dans le NMD pour l'animal 3 (Fig. 38c) et aucune pour l'animal 4 (Fig. 38d). Il faut noter qu'à la suite de ces injections dans le noyau du lit de la strie terminale, un grand nombre de corps cellulaires marqués était présent dans les noyaux centraux et médians de

FIGURE 38

Localisation sur des sections frontales des sites d'implantation de peroxydase dans le septum latéral en relation avec le nombre de cellules marquées par transport rétrograde dans le noyau magnocellulaire dorsal.

Les coupes sont ordonnées de la partie rostrale du septum latéral (a) vers la partie caudale (d). Le premier nombre (en italique) correspond au nombre de cellules marquées dans le noyau magnocellulaire dorsal, le second correspond au numéro de l'animal. La position du site d'implantation est matérialisée par les points.



l'amygdale homolatérale, illustrant la projection, bien connue chez le Rat, de l'amygdale vers le noyau du lit de la strie terminale (CONRAD et PFAFF, 1976a).

b.2 - Décussation

Ainsi que cela a déjà été signalé, le nombre de cellules marquées dans le NMD est toujours plus important du côté de l'implantation que de l'autre côté, indiquant l'existence d'une décussation des axones issus du NMD au cours de leur progression vers le SL. Un décompte précis du nombre de péricaryons marqués a été effectué sur 7 coupes sériées dans le cas de l'animal 9 (Fig. 38b). Le résultat de ce décompte met en évidence la nette différence entre le nombre de corps cellulaires marqués du côté homolatéral et du côté controlatéral à l'implantation (Fig. 39).

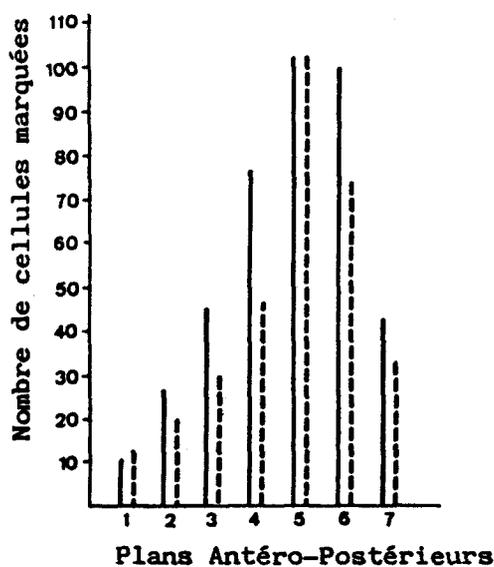


FIGURE 39 : Distribution des péricaryons marqués dans le noyau magnocellulaire dorsal homolatéral (ligne continue) et controlatéral (ligne pointillée) après implantation de peroxydase dans le cas de l'animal N°9. La hauteur du trait est proportionnelle au nombre de neurones marqués comptés par coupe frontale. Les coupes frontales sériées de 100µm sont numérotées de 1 à 7 de la partie rostrale du noyau magnocellulaire dorsal vers sa partie caudale.

3) Implantations bilatérales de deux traceurs fluorescents différents

Chez 5 animaux, une implantation de DAPI a été réalisée dans le SL d'un côté tandis que le SL de l'autre côté recevait une implantation de PI. De nombreuses cellules marquées de manière rétrograde soit par le DAPI, soit par le PI, ont été découvertes dans le NMD des deux côtés (Fig. 37 c, d, 40 a à f).

En plus des neurones simplement marqués par le DAPI (Fig. 37c, 40 a, e) ou le PI (Fig. 37d, 40 b, d), de nombreux péricaryons apparaissent doublement marqués par les 2 fluorochromes (Fig. 37 c, d, 40). Ces neurones présentent une fluorescence verte au cours de l'observation avec le bloc de filtres D (Fig. 40 a, c, e) et une fluorescence rouge avec le bloc de filtres N₂ (Fig. 40 b, d, f).

Les grains de DAPI contenus dans le cytoplasme sont plus difficiles à observer dans les neurones doublement marqués alors que le marquage du nucléole reste intense. Pour certaines cellules doublement marquées, la fluorescence verte des granules cytoplasmiques de DAPI est modifiée par la fluorescence rouge du PI et prend alors une teinte orangée lors de l'observation avec le bloc de filtre D (Fig. 40 a, c, e).

Le nombre de cellules doublement marquées dans la population totale des neurones fluorescents n'a pas été déterminé avec précision. Comme cela a déjà été signalé, les différences d'efficacité et de diffusion au site d'injection des deux fluorochromes employés rendent vaine toute étude quantitative. A ces restrictions s'ajoute l'impossibilité de reproduire par des moyens stéréotaxiques des sites d'implantation parfaitement symétriques dans le SL. Or nous savons que le nombre de neurones marqués dépend étroitement de la localisation du site d'implantation au sein même du SL. Cependant il apparaît qu'environ les 4/5^e des neurones marqués par le PI le sont également par le DAPI, ce qui indique qu'une grande proportion de neurones du NMD s'engagent dans une projection bilatérale vers le SL par le jeu d'une collatéralisation axonale.

FIGURE 40

Microphotographies de cellules marquées dans le noyau magnocellulaire dorsal après implantation de cristaux de DAPI et de PI dans le septum latéral (coupes frontales).

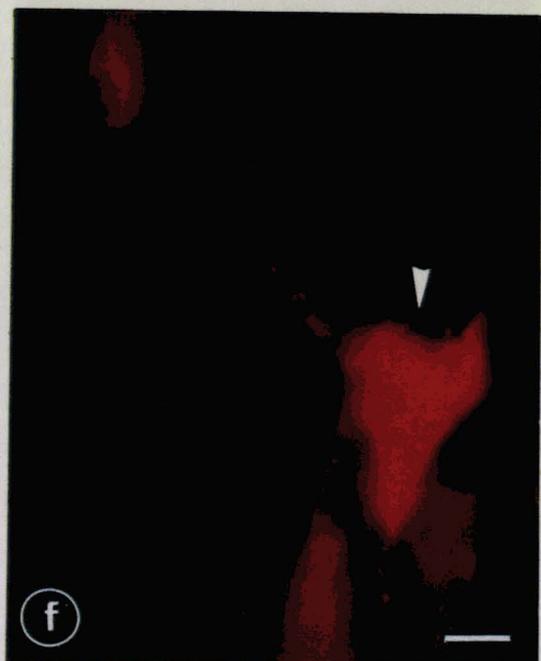
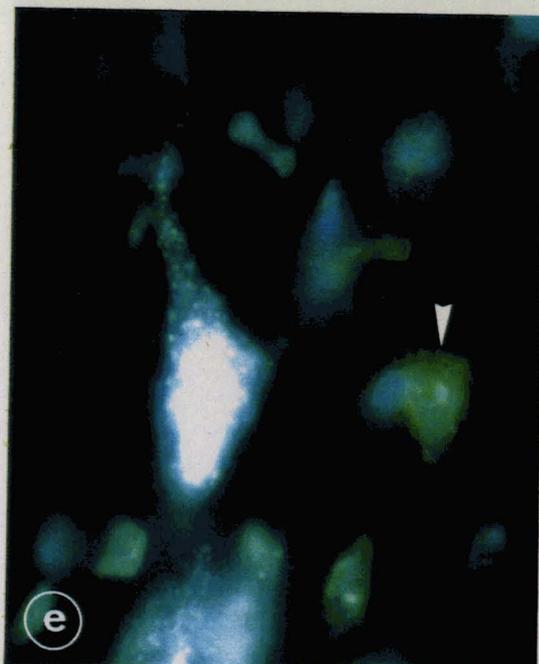
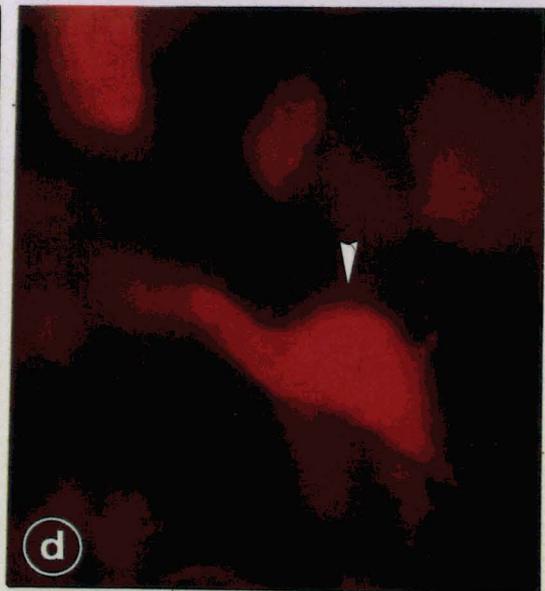
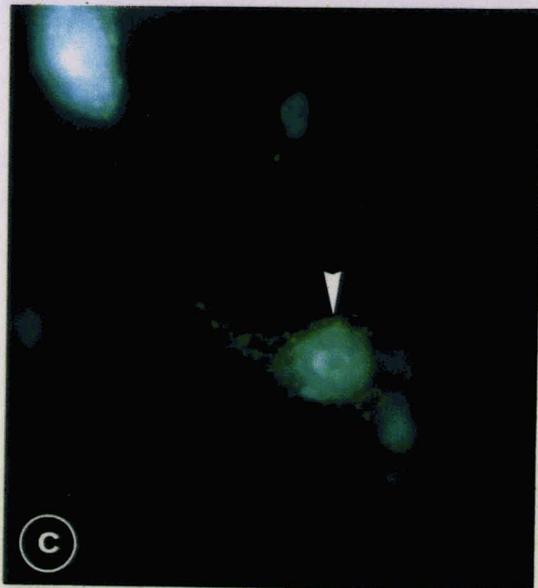
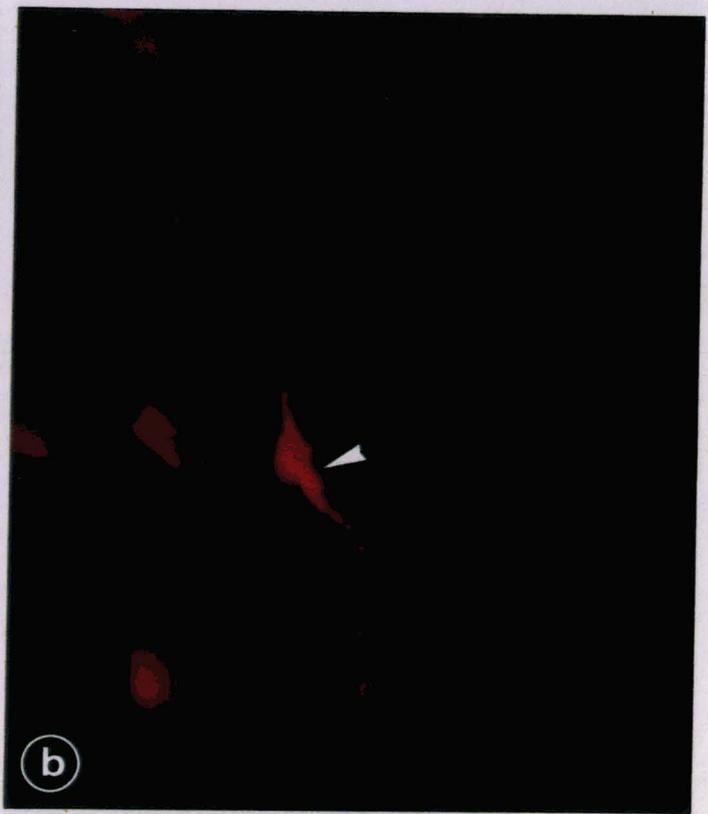
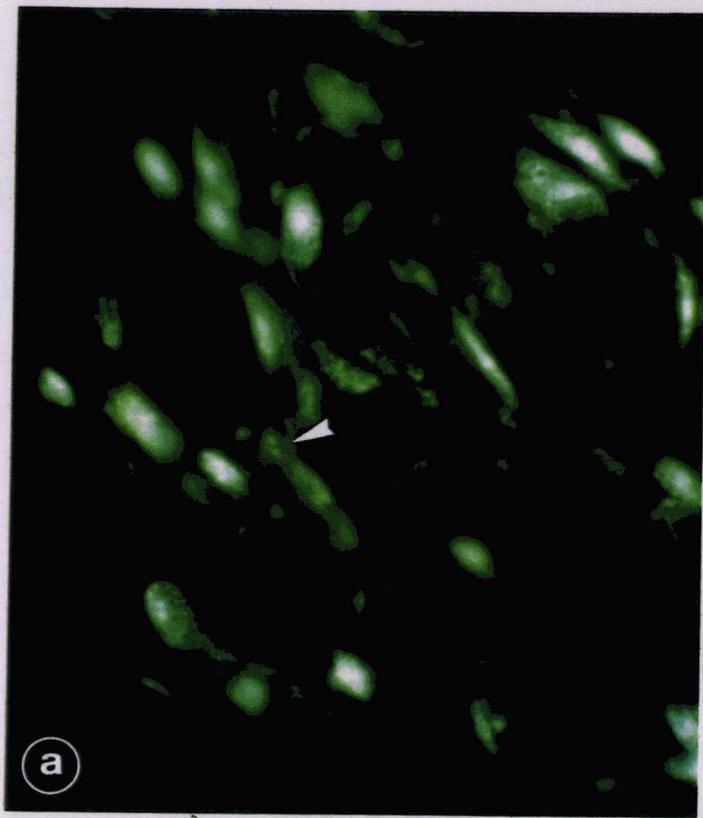
Les microphotographies présentant un marquage par le DAPI (a,c,e) et le PI (b,d,f) correspondent aux mêmes champs. Les pointes de flèches indiquent les cellules doublement marquées.

a-b. Le nombre de cellules marquées par le DAPI implanté dans le septum latéral homolatéral est beaucoup plus important que le nombre de cellules marquées par le PI implanté dans le septum latéral controlatéral.

c-d. Cellule doublement marquée par le DAPI et le PI.
Noter l'anneau fluorescent du nucléole ainsi que la présence de grains dans le cytoplasme qui caractérisent le marquage par le DAPI.

e-f. Cellule simplement marquée par le DAPI (e) et autre cellule doublement marquée par le DAPI et le PI.

Barre de calibration : 15 μm pour a,b
7 μm pour c,d,e,f,



BU
LILLE

4) Etude immunocytochimique des neurones identifiés après transport rétrograde de DAPI

Pour 8 animaux, l'implantation de DAPI a été suivie 4 jours plus tard d'une injection de Colchicine dans le ventricule cérébral latéral. Une réaction immunocytochimique dirigée contre les enképhalines a été ensuite réalisée sur les coupes présentant dans le NMD des neurones marqués par le DAPI.

Le marquage fluorescent des corps cellulaires après transport rétrograde de DAPI n'a pas été affecté de manière importante par le traitement immunocytochimique. Il a donc été possible d'observer dans le NMD des neurones identifiés soit par le DAPI (Fig. 37e, 41 a, c), soit par la FITC conjuguée à l'anticorps anti-enképhaline (Fig. 37f, 41 b, d). Les fluorescences vert brillant du DAPI (Fig. 41 a, c) et jaune verdâtre de la FITC (Fig. 41 b, d) se distinguent facilement l'une de l'autre lors de l'observation des coupes avec les bloc de filtres D et I₂. La fluorescence observée grâce à l'un des blocs de filtres est pratiquement totalement éteinte lors de l'observation avec l'autre filtre.

Un grand nombre de neurones marqués par le DAPI ont réagi avec l'anticorps anti-enképhaline. Ces neurones apparaissent donc doublement marqués, c'est-à-dire présentant alternativement la fluorescence due au DAPI et celle due à la FITC lors du passage du bloc de filtres D au bloc de filtres I₂ (Fig. 37 e, f, 41).

Le nombre de cellules doublement marquées présente des variations très importantes d'un animal à l'autre. Ceci est dû d'une part au fait que le nombre des neurones enképhalinerigues mis en évidence dépend de l'efficacité du traitement par la Colchicine et d'autre part au fait que le nombre de neurones marqués par transport rétrograde est variable et dépend notamment de l'emplacement du site d'implantation du traceur.

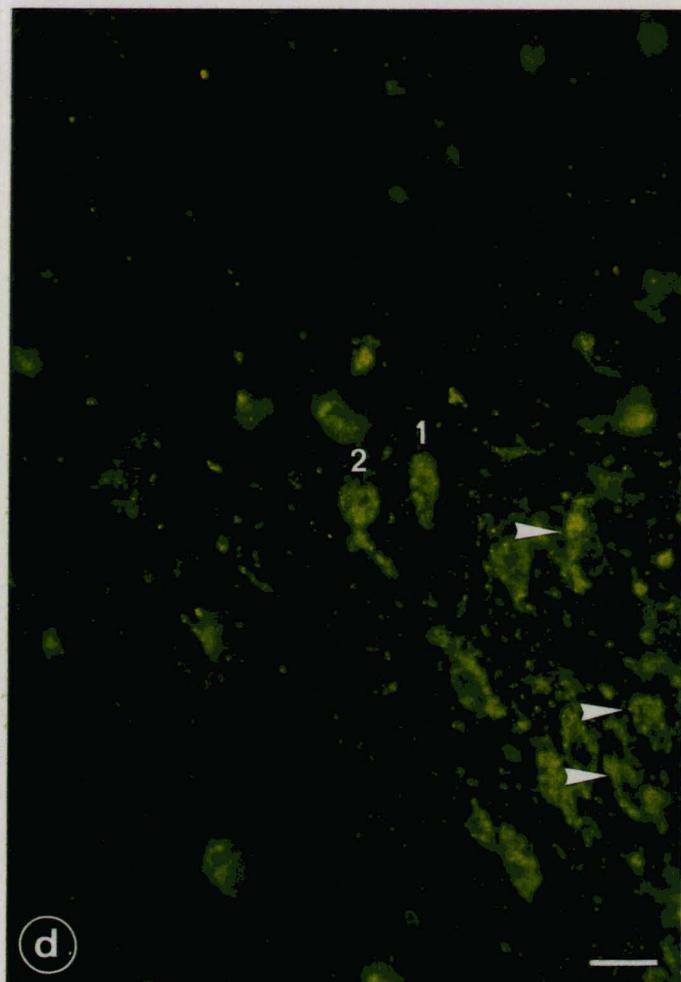
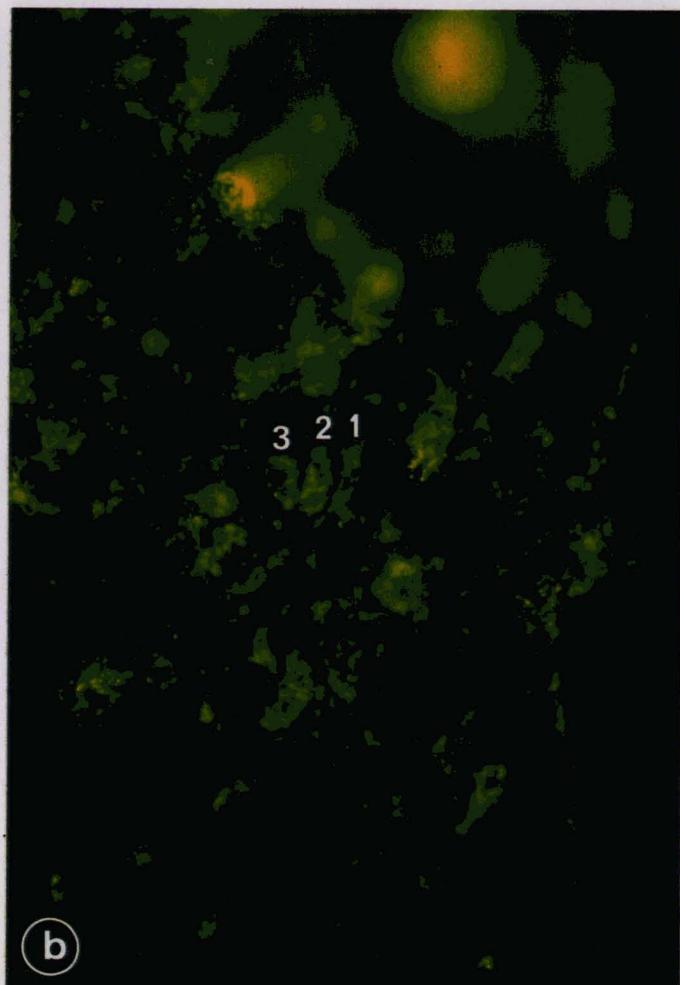
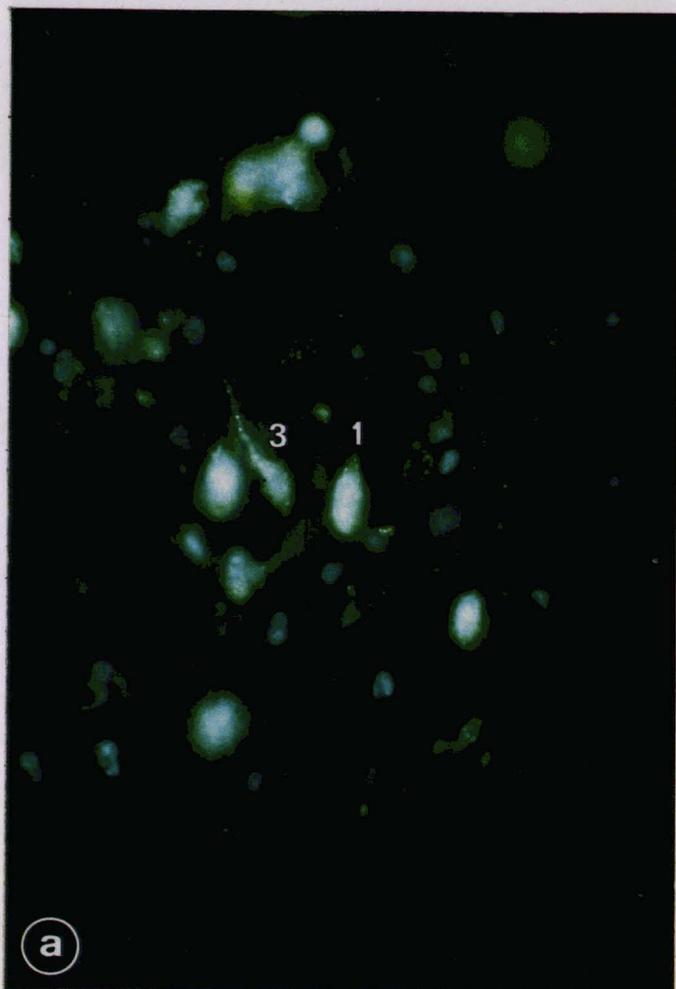
FIGURE 41

Microphotographies de cellules marquées dans le noyau magnocellulaire dorsal par le DAPI transporté de manière rétrograde et par l'antisérum anti-enképhaline conjugué à la FITC (coupes frontales).

- a) Cellules marquées (1,3) par le DAPI après transport rétrograde à partir du septum latéral.
- b) Cellules marquées (1,2,3) par le sérum anti-enképhaline. Il faut noter que les cellules 1 et 3 sont doublement marquées.
- c) Cellules marquées (1,2,3) par le DAPI après transport rétrograde à partir du septum latéral.
- d) Cellules marquées (1,2) par le sérum anti-enképhaline. Il faut noter que les cellules 1,2 sont doublement marquées.

Les pointes de flèches en c et d indiquent d'autres péricaryons doublement marqués.

Barre de calibration : pour a,b 15 μm
pour c,d 17 μm



BL
LILL

IV - ETUDE DES EFFERENCES DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL VERS LE THALAMUS ET D'AUTRES REGIONS DE L'HYPOTHALAMUS

La technique de transport antérograde de peroxydase a été utilisée dans le but de mettre en évidence les directions principales empruntées par les axones issus du NMD. Cette technique a tout d'abord été réalisée "in vivo", puis sur tranches de cerveau maintenues "in vitro".

A - Etude après injection de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal "in vivo"

L'existence d'une relation directe entre le NMD et le SL ayant été mise en évidence, nous avons tenté d'utiliser cette voie pour localiser "in vivo" le NMD grâce à un repérage électrophysiologique. En effet, la taille du NMD rend très aléatoire l'approche stéréotaxique qui de plus, comparativement à d'autres mammifères de laboratoire, manque beaucoup de précision chez le Cobaye.

L'approche du NMD a pu être réalisée grâce à une microélectrode d'enregistrement qui recueillait l'activité "antidromique" des neurones stimulés à partir du SL. Cette technique a été utilisée par POULAIN (1986) dans son étude de l'activité électrique unitaire des cellules du NMD repérées par stimulation septale.

Au cours de nos expériences, la microélectrode d'enregistrement contenait une solution de peroxydase qui était expulsée par iontophorèse lorsque les premières activités antidromiques étaient recueillies.

Bien que le NMD soit repérable de manière sûre par cette technique, l'extrême difficulté à circonscrire l'injection iontophorétique au seul noyau n'a pas permis d'obtenir des résultats reproductibles. Seules 3 injections se sont révélées bien situées et de taille

suffisamment réduite pour que l'on puisse retenir leurs résultats (Fig. 42a).

Suite à l'application de peroxydase dans le NMD, des fibres contenant le produit de réaction après révélation histochimique de l'enzyme sont observées au voisinage du site d'injection de l'enzyme (Fig. 42a) et/ou à plus grande distance. Leur aspect est caractéristique d'axones marqués après transport antérograde de peroxydase (Fig. 42a). Le marquage des axones a permis de mettre en évidence 3 directions préférentielles pour les projections efférentes du NMD.

1) Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus basal

La direction la plus fréquemment observée est matérialisée par des fibres se détachant de la région injectée et se dirigeant vers la base de l'hypothalamus. Ces fibres longent le 3^e ventricule ou cheminent au voisinage du bord externe du noyau ventro-médian. Dans un cas, des fibres prolongeant leur course sous le 3^e ventricule, s'insinuant dans la zone séparant la base du 3^e ventricule et la surface du cerveau, (Fig. 42b) puis remontant dans l'hypothalamus controlatéral, ont pu être observées.

2) Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus dorsal

De nombreuses fibres issues également du site d'injection ont été observées se dirigeant dorsalement vers la base du thalamus tant médian que latéral (Fig. 42c).

3) Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus latéral

Un dernier contingent de fibres se dirige vers l'aire hypothalamique latérale (Fig. 42a). Ces fibres contournent le fornix en longeant sa face supérieure. De nombreuses portions de fibres marquées sont observées dans l'HL.

FIGURE 42

Marquage de type antérograde après injection iontophorétique de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sous contrôle électrophysiologique (coupes frontales).

a) Site d'injection : il faut noter la trace de l'électrode (flèche), le centre du site d'injection (étoile) ainsi que des fibres marquées en direction de l'hypothalamus latéral et dorsolatéral (petites flèches).

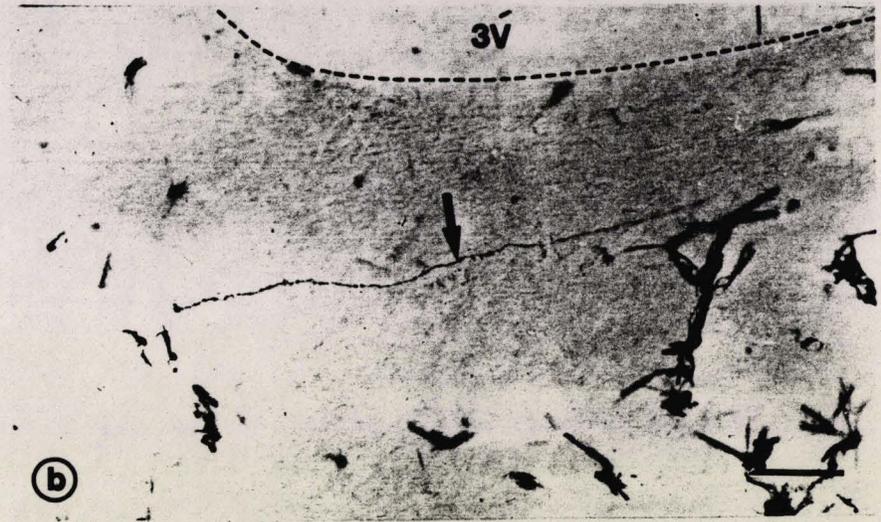
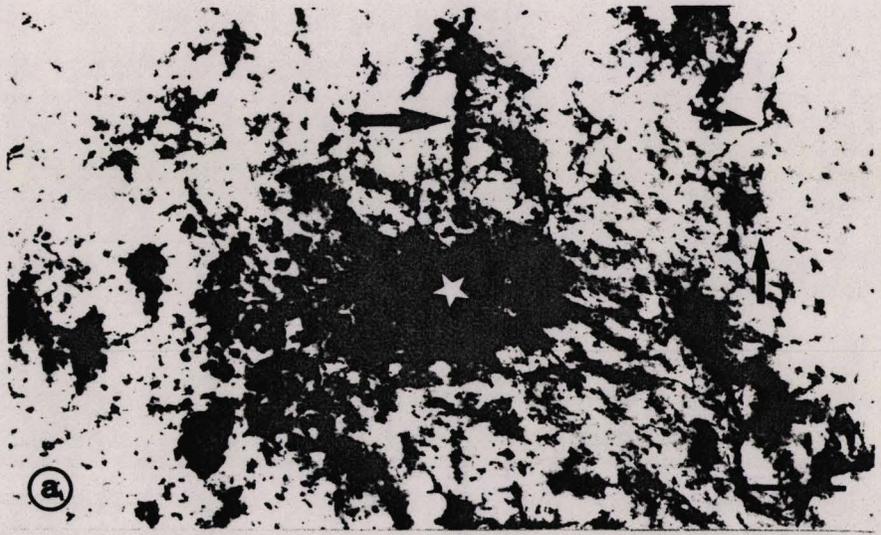
Barre de calibration : 100 μm .

b) Fibre marquée cheminant sous le 3^e ventriculé.

Barre de calibration : 100 μm .

c) Fibres issues du site d'injection en direction de l'hypothalamus dorsal (flèches).

Barre de calibration : 50 μm .



BU
LILLE

B - Etude après injection de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal "in vitro"

L'injection de peroxydase dans le NMD effectuée sous contrôle visuel sur tranches d'hypothalamus maintenues "in vitro" a permis d'obtenir des résultats beaucoup plus précis et reproductibles que ceux obtenus "in vivo". En effet, le NMD étant repéré visuellement, les risques d'erreur de localisation du site à injecter sont éliminés. L'accent a donc pu être mis sur la recherche des paramètres d'éjection permettant des applications de peroxydase strictement limitées au NMD, ce qui était difficile à obtenir dans les conditions "in vivo". Malgré tout, un grand nombre d'injections n'a pas donné de résultats exploitables du fait de la taille beaucoup trop importante de la région touchée par l'injection.

Sur les 32 injections réalisées "in vitro", 9 seulement recouvraient exactement le NMD. Les tranches correspondantes ont été retenues pour y examiner les projections efférentes du noyau. Parmi ces 9 injections, 6 l'ont été de manière unilatérale et 3 de manière bilatérale.

Dans tous les cas, le site d'injection présente (Fig. 47a):

- une zone centrale dense correspondant à une forte concentration de l'enzyme ;
- une zone périphérique moins intensément réactive correspondant à la zone de diffusion de l'enzyme.

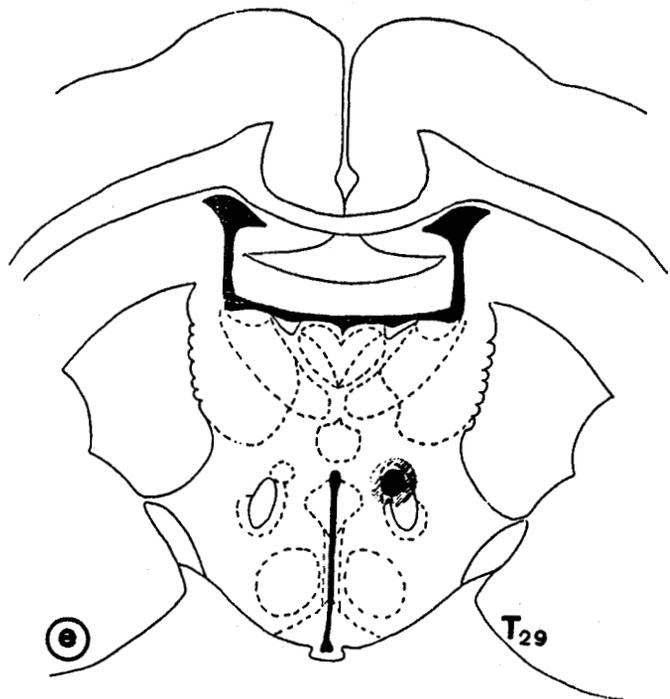
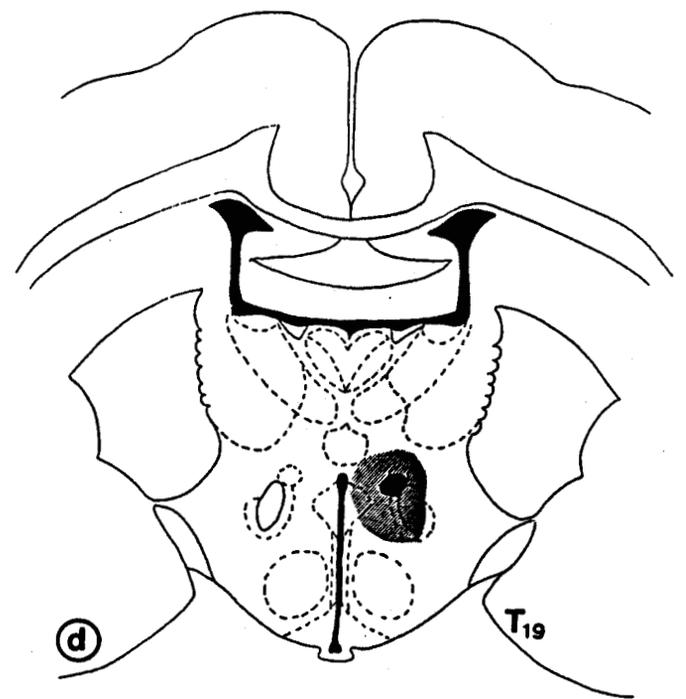
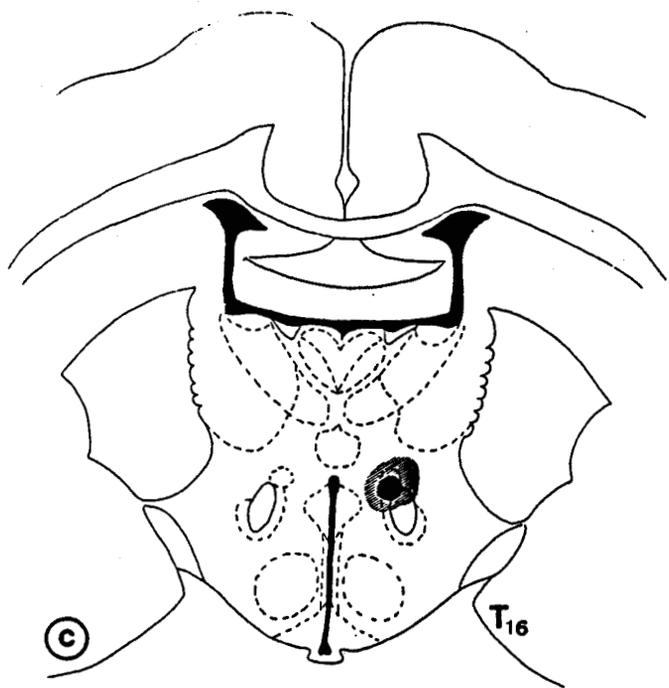
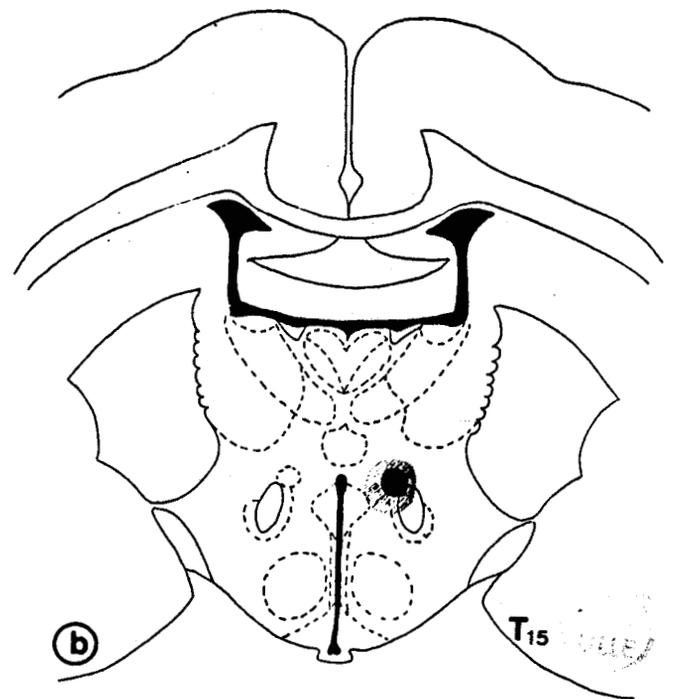
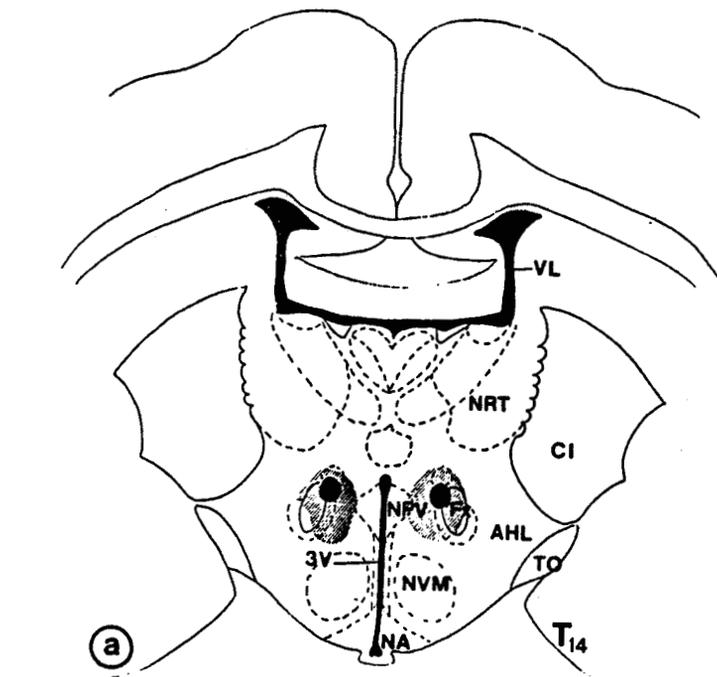
Les sites d'injections représentés sur la figure 43 correspondent aux 5 tranches ayant donné un nombre important d'informations sur les connexions thalamiques et intra-hypothalamiques. Les informations relatives aux autres tranches citées dans ce travail, bien qu'utilisables, n'ont été que ponctuelles (fibres isolées, marquage antérograde sur une courte distance...) et n'ont donc été représentées que sur la figure récapitulative 44.

Les fibres nerveuses chargées d'un produit de réaction étant dû à un transport antérograde de peroxydase sont observées sous deux aspects, selon l'orientation du trajet qu'elles suivent au sein de la tranche:

- certaines fibres nerveuses chargées de peroxydase sont orientées dans le même plan que la tranche. Les tranches étant ensuite coupées transversalement pour effectuer la réaction histochimique,

FIGURE 43

Localisation des sites d'injection iontophorétique de peroxydase et de leur extension sur les 5 tranches de cerveau maintenues "in vitro", ayant donnée un nombre important d'informations sur les efférences du noyau magnocellulaire dorsal (voir les résultats correspondants sur la figure 44). Chaque site d'injection comprend une zone centrale pleine correspondant à une forte concentration de l'enzyme et une zone périphérique hachurée correspondant à la zone de diffusion de l'enzyme.



les fibres apparaissent alors comme des segments de prolongements nerveux plus ou moins longs selon qu'ils suivent un trajet plus ou moins oblique dans la tranche. Le faible diamètre de ces prolongements, leur aspect souvent "monoliforme" ainsi que l'absence de ramifications nombreuses indiquent de toute évidence qu'il s'agit de fragments d'axones. Dans la suite de cet exposé, les fibres se présentant sous cet aspect seront nommées fibres longitudinales.

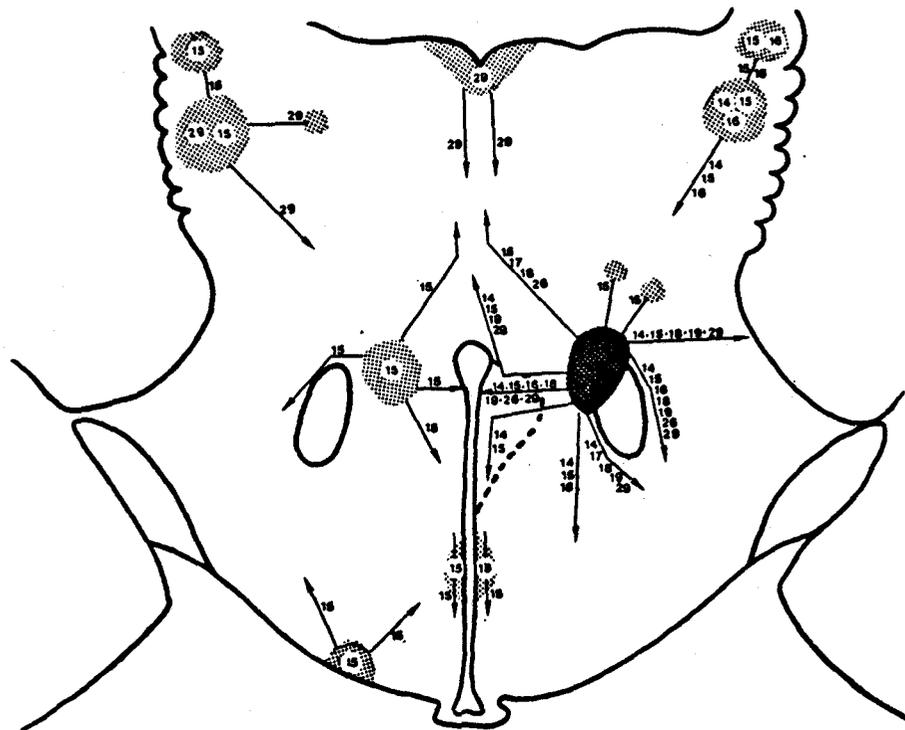


FIGURE 44 : Schéma récapitulatif représentant toutes les informations obtenues grâce aux injections de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sur tranches de cerveau. Les numéros correspondent aux tranches sur lesquelles les observations ont été réalisées.

-  site d'injection
-  zone de marquage à distance du site
-  fibres longitudinales isolées

- certaines fibres nerveuses marquées étaient orientées transversalement dans la tranche. Ces fibres apparaissent donc dans ce cas sous forme d'amas de ponctuations groupées. Elles seront nommées fibres transversales.

Dans les résultats qui vont être exposés par la suite, la description des projections du NMD est donc basée uniquement sur l'observation de fibres nerveuses, longitudinales ou transversales, chargées de péroxidase. La technique utilisée, tout comme l'autoradiographie, et contrairement à celle, plus récente, utilisant une lectine comme traceur antérograde (leuco-agglutinine de *Phaseolus vulgaris* (GERFEN ET SAWCHENKO, 1984)) ne permet pas de mettre en évidence des images caractéristiques de varicosités pouvant être identifiées comme correspondant à des terminaisons pré-synaptiques (boutons synaptiques) et donc ne permet pas de signaler des zones de contacts inter-neuronaux (WOUTERLOOD ET GROENEWEGEN, 1985). En conséquence, les régions décrites dans cette étude représentent indistinctement des zones de terminaisons et/ou de passage des fibres issues du NMD.

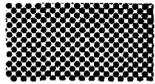
Dans certains cas, les fibres longitudinales marquées par transport antérograde ne sont suivies que sur une courte distance à partir du NMD : soit qu'elles quittent alors le territoire couvert par la tranche, soit qu'elles changent rapidement de direction et deviennent "transversales", soit enfin qu'elles correspondent à des fibres marquées sur une courte distance par simple diffusion.

L'observation de ces fibres courtes permet de dégager les directions suivies par les fibres efférentes directement à partir du NMD. Ces informations sont fournies par les tranches T₁₇, T₁₈, T₁₉ et T₂₆.

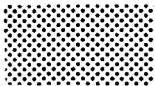
Dans d'autres cas, il est possible d'observer des zones denses de marquage antérograde constituées de fibres longitudinales et de fibres transversales isolées du site d'injection, à une certaine distance de celui-ci (Fig. 45), dans l'hypothalamus ainsi que dans le thalamus. Des connexions existent obligatoirement entre le site d'injection et les zones de marquage distantes. Ces connexions peuvent être réalisées par des fibres longitudinales espacées, non groupées en faisceaux denses et donc difficilement repérables au cours de leur trajet, mais qui finissent par se réunir pour constituer les zones denses observées à distance.

FIGURE 45

Dessin des 5 tranches de cerveau correspondant aux injections indiquées sur la figure 43. Les sites d'injections sont rappelés par les étoiles.



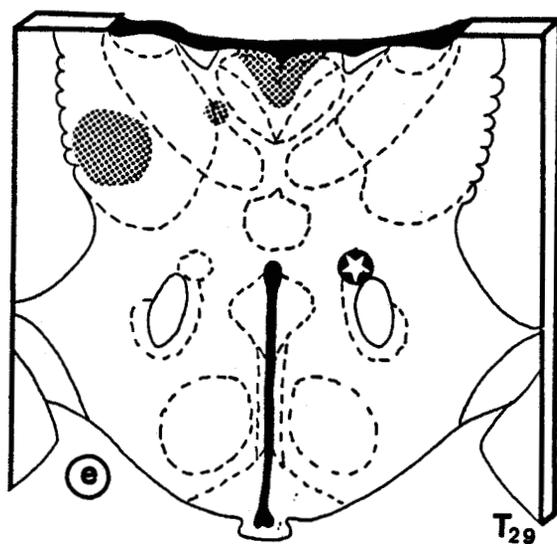
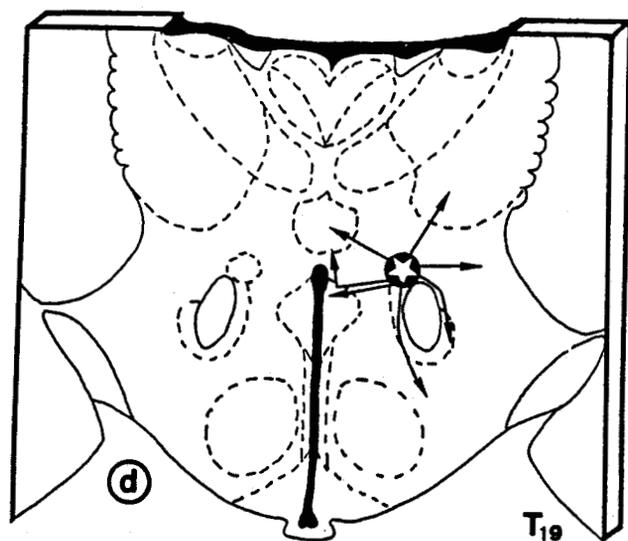
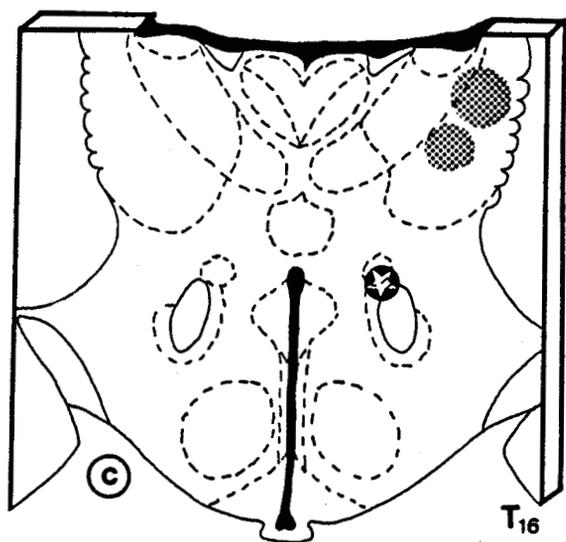
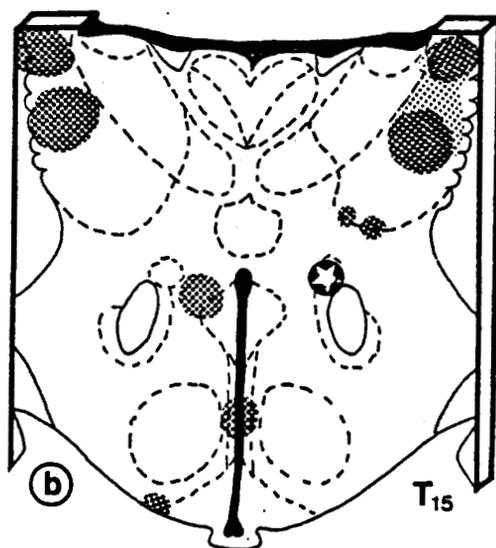
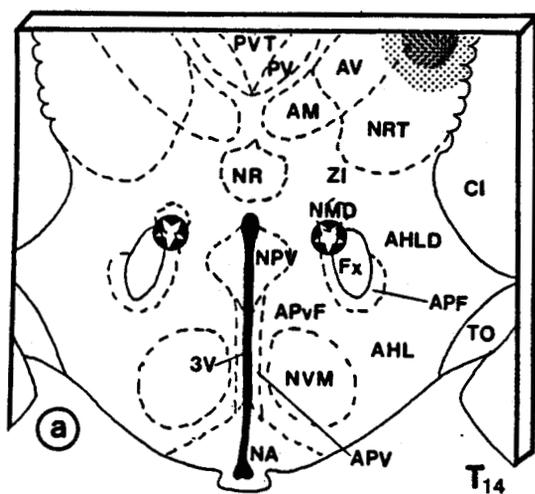
zone de fibres transversales et longitudinales observées à distance du site d'injection



zone de fibres longitudinales observées à distance du site d'injection



fibres isolées issues du site d'injection



L'étude de ces zones de marquage éloignées du site d'injection va permettre de définir des projections plus lointaines du NMD. Ces observations ont été réalisées sur les tranches T₁₄, T₁₅, T₁₆, T₁₉ et T₂₉ (Fig. 43, 45).

1) Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers le thalamus

Des fibres marquées par transport antérograde sont le plus souvent localisées dans la partie dorsale du thalamus latéral. Cependant, lors de l'injection T₂₉, un marquage du thalamus médian a été aussi observé.

a - Thalamus latéral

a.1 - Thalamus latéral homolatéral

A la suite de 3 injections de peroxydase (T₁₄, T₁₅ et T₁₆) (Fig. 45 a, b, c), un marquage de type antérograde a été observé homolatéralement dans la région dorso-latérale du thalamus, cette région correspondant plus précisément à la partie supérieure du noyau réticulaire thalamique (Fig. 46 a, d). Il faut cependant remarquer que le marquage obtenu lors de l'injection T₁₄ (Fig. 45a) faisait suite à une injection bilatérale dans les deux NMD.

Le marquage obtenu dans cette région se présente toujours sous les deux aspects caractéristiques décrits précédemment, c'est-à-dire association (dans une même zone de marquage) de fibres transversales et de fragments de fibres longitudinales orientées en direction du site d'injection (Fig. 46a).

Dans les cas T₁₅ (Fig. 45b) et T₁₆ (Fig. 45c), le marquage du noyau réticulaire thalamique est formé de 2 zones distinctes constituées de fibres transversales. La zone la plus dorsale est située à la limite du noyau réticulaire thalamique et de la strie terminale alors que la plus ventrale se trouve dans le noyau réticulaire thalamique. Ces zones de fibres marquées échangent entre elles des fibres longitudinales, ce qui indique vraisemblablement leur appartenance à une même région de projection contenant des fibres orientées dans les 2 plans.

FIGURE 46

Marquage observé dans le thalamus après injection iontophorétique de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sur tranche de cerveau.

a) Amas de fibres transversales et longitudinales localisées dans la partie dorsale du noyau réticulaire thalamique homolatéral (T₁₅). Les flèches indiquent les fibres s'échangeant entre les 2 taches observées dans ce noyau.

Barre de calibration : 100 μ m.

b) Zone externe d'un amas de fibres transversales et longitudinales dans le noyau réticulaire thalamique controlatéral, contre la capsule interne (T₂₉).

Barre de calibration : 100 μ m.

c) Corps cellulaires (doubles flèches) et fibres marquées dans le noyau réticulaire thalamique controlatéral (T₂₉).

Barre de calibration : 50 μ m.

d) Cellule (doubles flèches) possédant des granulations de peroxydase (après transport rétrograde) et fibres marquées dans le noyau réticulaire thalamique homolatéral, à la limite de la zone de marquage intense (T₁₄).

Barre de calibration : 50 μ m.



a.2 - Thalamus latéral controlatéral

Dans les 2 cas T₁₅ (Fig. 45b) et T₂₉ (Fig. 45e), un marquage controlatéral après injection unilatérale dans le NMD a été obtenu. La région marquée correspond au noyau réticulaire thalamique. Pour l'injection T₁₅ (Fig. 45b), le marquage controlatéral est symétrique à celui obtenu du côté homolatéral et se présente également sous forme de 2 amas de fibres transversales échangeant entre eux des fibres longitudinales. Dans le cas T₂₉ (Fig. 45e), un marquage constitué à la fois de fibres transversales et longitudinales est observé dans le noyau réticulaire thalamique controlatéral (Fig. 46 b, c) sans qu'il soit observé de marquage du côté homolatéral. Dans ce dernier cas, la zone de marquage unique de taille importante, formée de fibres transversales et longitudinales, se trouve alors située dans la partie médiane du noyau réticulaire thalamique. Lors de cette même injection, une autre zone marquée de plus petite taille est observée dans une région plus médiane. La localisation de cette zone correspond à la limite entre le noyau thalamique antéro-ventral et le noyau thalamique antéro-médian (Fig. 45e). Des fibres longitudinales relient cette zone à la région marquée beaucoup plus étendue du noyau réticulaire thalamique.

De plus, dans le cas T₂₉, des fibres isolées qui s'engagent au dessus du 3^e ventricule pour cheminer ensuite en direction du noyau réticulaire thalamique controlatéral marqué sont observées.

b - Thalamus médian

Dans le cas T₂₉ (Fig. 45e), une zone de marquage constituée de fibres transversales et longitudinales est observée dans le thalamus médian, dans la région du noyau paraventriculaire thalamique et dans la région comprise entre ce noyau et le bord des ventricules latéraux. Ce marquage présente une répartition parfaitement symétrique par rapport au plan médian du thalamus.

Par ailleurs, de nombreuses fibres longitudinales peuvent être observées entre cette région marquée du noyau paraventriculaire thalamique et la région médio-dorsale de l'hypothalamus. Ces fibres traversent de manière rectiligne le thalamus médian.

c - Zona incerta

c.1 - Zona incerta homolatérale

Dans le cas T₁₅ (Fig. 45b), de nombreuses fibres nerveuses issues du site d'injection se dirigent obliquement vers la zona incerta. Cette région présente alors 2 petites zones de fibres transversales marquées. Ces 2 zones sont directement reliées au site d'injection par de nombreuses fibres longitudinales qui peuvent être suivies sans interruption du site d'injection à la zone de marquage.

c.2 - Zona incerta controlatérale

Il n'a jamais été observé de fibres longitudinales marquées sur toute leur longueur entre le site d'injection et la zona incerta controlatérale. En revanche, dans le cas T₂₉, de nombreuses fibres longitudinales marquées sont présentes dans la zona incerta controlatérale et se prolongent jusque dans la zone de marquage localisée dans le noyau réticulaire thalamique du même côté.

2) Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers l'hypothalamus

Dans toutes les injections réalisées "in vitro" ayant donné des résultats exploitables, des traces de marquage antérograde de peroxydase sont observées dans l'hypothalamus. Ce marquage concerne les régions suivantes :

- Noyau paraventriculaire (NPV) ;
- Aire hypothalamique latérale (AHL) ;
- Aire périventriculo-fornicale (APvF) ;
- Aire périventriculaire (APV) ;
- Hypothalamus médio-dorsal (Hmd) ;
- Hypothalamus latéro-dorsal (Hld) ;
- Hypothalamus médio-basal (Hmb).

a - Noyau paraventriculaire

a.1 - Noyau paraventriculaire homolatéral

Dans les 7 cas T₁₄, T₁₅, T₁₆, T₁₈, T₁₉, T₂₆ et T₂₉ où la zone de diffusion de la peroxydase injectée dans le NMD ne s'étendait pas jusqu'au NPV, des fibres marquées issues du site d'injection ont été observées se dirigeant horizontalement vers ce noyau, puis le traversant en direction du 3^e ventricule (Fig. 47c). La plupart de ces fibres ne peuvent être suivies plus loin qu'au voisinage du 3^e ventricule. D'autres fibres, au contraire, montrent un brutal changement de direction et se dirigent soit vers la base de l'hypothalamus, soit vers le sommet du 3^e ventricule (Fig. 47b), en suivant dans les 2 cas un trajet parallèle au bord du ventricule.

a.2 - Noyau paraventriculaire controlatéral

Des traces de marquage antérograde controlatéral dans le NPV ont été observées dans le seul cas T₁₅ (Fig. 45b). La région, marquée de manière dense par des fibres transversales et longitudinales correspond à la partie latérale du noyau. S'échappant de cette région, des fibres longitudinales individuelles sont suivies dans quatre directions :

- vers l'hypothalamus basal, jusqu'à proximité du noyau ventro-médian et dans le noyau périventriculaire hypothalamique ;

- vers l'aire hypothalamique latérale, les fibres longeant la face externe du fornix ;

- vers le thalamus médian, en traversant l'hypothalamus médio-dorsal ;

- vers le 3^e ventricule, en traversant le NPV.

Il apparaît donc un fort contingent de fibres marquées qui, ayant effectué une décussation au sein de la tranche, se regroupent dans la partie externe du NPV et desservent ensuite différents territoires hypothalamiques. Il ne sera plus par la suite fait allusion à ces quatre régions qu'il faut également considérer comme étant des zones de projection et/ou de passage de fibres issues du NMD controlatéral.

FIGURE 47

Marquage observé dans l'hypothalamus après injection iontophorétique de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sur tranche de cerveau.

a) Site d'injection. Le centre du site d'injection est matérialisé par l'étoile. Il faut noter les fibres issues du site se dirigeant vers l'hypothalamus médio-dorsal (double flèche) ainsi que vers l'hypothalamus latéro-dorsal, latéral et latéro-basal (simples flèches) (T₁₅).

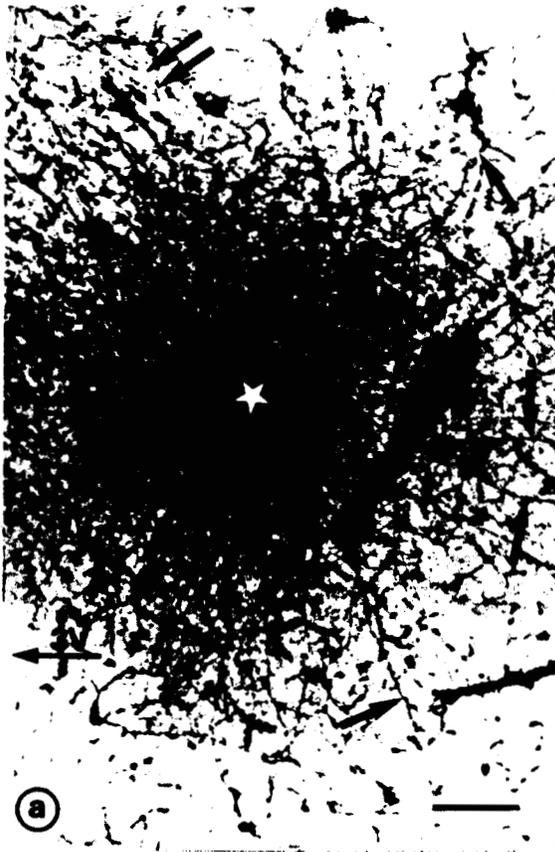
Barre de calibration : 100 μ m.

b) Fibres longitudinales issues du site d'injection (étoile) en direction du 3^e ventricule puis cheminant parallèlement à celui-ci vers son sommet. Il faut noter aussi des fibres longitudinales issues du site d'injection et cheminant obliquement en direction de l'hypothalamus médio-dorsal ou du thalamus médian (T₁₅).

Barre de calibration : 100 μ m.

c) Fibres longitudinales issues du site d'injection traversant le noyau paraventriculaire en direction du 3^e ventricule (T₁₅).

Barre de calibration : 100 μ m.



b - Aire hypothalamique latérale

Dans 7 cas (T_{14} , T_{15} , T_{16} , T_{18} , T_{19} , T_{26} et T_{29}), des fibres marquées ont été suivies homolatéralement jusqu'au niveau de l'HL (Fig. 48a). La plupart du temps, leur trajet s'effectue le long de la face externe du fornix. Plus rarement, les fibres longent la face interne du fornix pour desservir l'aire hypothalamique latérale.

c - Aire périventriculo-fornicale

Dans les 3 cas T_{14} , T_{15} et T_{18} , des fibres longitudinales issues du site d'injection ont été observées se dirigeant verticalement en direction du noyau ventro-médian, au travers de l'aire périventriculo-fornicale.

Ces fibres n'ont jamais été observées dans le centre du noyau ventro-médian mais semblaient toujours s'arrêter dans la capsule périphérique de ce noyau.

d - Aire périventriculaire

d.1 - Aire périventriculaire homolatérale

Un marquage de l'aire périventriculaire a été observé lors de l'injection T_{15} (Fig. 45b). Il présente une zone de fibres transversales située en bordure du 3^e ventricule, traversée par des portions de fibres longitudinales orientées parallèlement au bord du ventricule (Fig. 48c).

d.2 - Aire périventriculaire controlatérale

Pour la même tranche T_{15} (Fig. 45b), un marquage controlatéral parfaitement symétrique au marquage homolatéral a été obtenu, aussi bien pour la zone de fibres transversales que pour les fibres longitudinales la traversant.

e - Hypothalamus médio-dorsal

Des fibres originaires du site d'injection et se dirigeant obliquement vers le sommet du 3^e ventricule ont été remarquées dans les 4 cas T_{15} , T_{17} , T_{18} et T_{26} . Ces portions de fibres marquées sont toujours orientées en direction du thalamus médian (Fig. 48b).

FIGURE 48

Marquage observé dans l'hypothalamus après injection iontophorétique de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sur tranche de cerveau.

a) Fibres longitudinales issues du site d'injection (étoile) en direction de l'hypothalamus latéral (T₁₅).

Barre de calibration : 100 μm .

b) Bifurcation d'une fibre longitudinale au dessus du 3^e ventricule, en direction du thalamus médian (T₁₅).

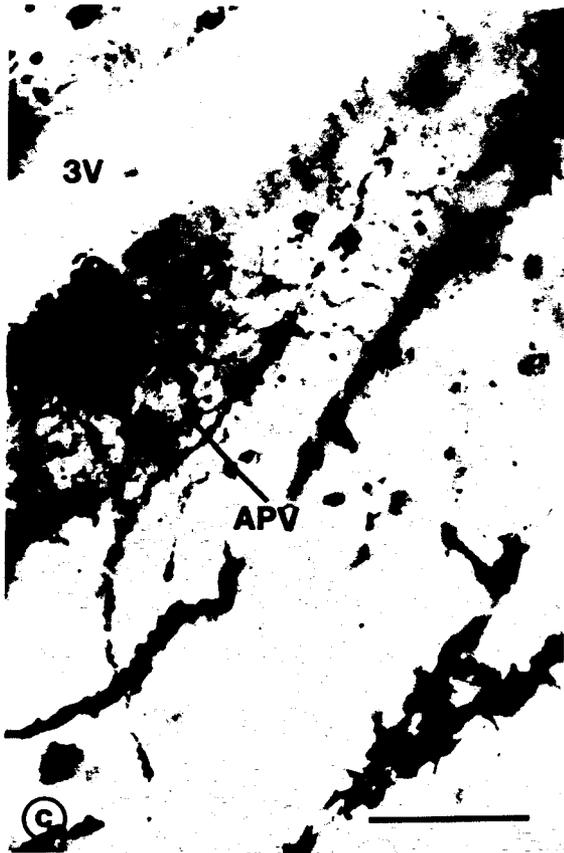
Barre de calibration : 50 μm .

c) Marquage de fibres transversales et longitudinales dans l'aire périventriculaire (T₁₅).

Barre de calibration : 50 μm .

d) Marquage dans l'hypothalamus médio-basal controlatéral (T₁₅). Les flèches indiquent des fibres longitudinales issues de la zone de marquage et se dirigeant soit vers le noyau ventro-médian, soit vers l'hypothalamus latéral.

Barre de calibration : 100 μm .



f - Hypothalamus latéro-dorsal

Un marquage, toujours homolatéral, a été observé à 5 reprises (T₁₄, T₁₅, T₁₈, T₁₉ et T₂₉) dans l'hypothalamus latéro-dorsal, toujours sous l'aspect de fibres partant du site d'injection et progressant dans une direction perpendiculaire au 3^e ventricule jusqu'au niveau de l'hypothalamus latéro-dorsal.

g - Hypothalamus médio-basal

Un marquage dans l'hypothalamus médio-basal n'a été obtenu que dans le cas T₁₅ (Fig. 45b) et ce uniquement du côté controlatéral. Ce marquage apparaît comme un regroupement de fibres transversales localisées à la base de l'hypothalamus, dans une région adjacente au noyau arqué mais en dehors de celui-ci, et associées à des fragments de fibres se dirigeant soit vers le noyau ventro-médian, soit vers l'aire hypothalamique latérale (Fig. 48d).

En conclusion, l'injection de peroxydase dans le NMD effectuée sous contrôle visuel sur tranche d'hypothalamus "in vitro", a permis de mettre en évidence certaines des projections efférentes du noyau, vers l'hypothalamus mais aussi vers le thalamus. La figure 49 est présentée afin de récapituler de manière synthétique l'ensemble des résultats obtenus.

FIGURE 49

Dessin regroupant l'ensemble des résultats obtenus après injection iontophorétique de peroxydase dans le noyau magnocellulaire dorsal sur tranches de cerveau, tant dans l'hypothalamus que dans le thalamus.



Fibres transversales



Fibres longitudinales



Site d'injection

DISCUSSION

Le premier objectif de ce travail était d'établir une classification des neurones du noyau magnocellulaire dorsal (NMD) d'après leurs caractéristiques morphologiques mises en évidence par imprégnation argentique.

Technique d'imprégnation argentique

Depuis la description initiale de la technique d'imprégnation fine du neuroplasma par un dépôt granulaire de chromate d'argent au siècle dernier (GOLGI, 1873), de nombreuses variantes ont été proposées (revues dans POULAIN et BARRY, 1971 et MILLHOUSE, 1981). Ces variantes semblent avoir des effets tant sur la nature que sur le nombre des neurones marqués (MAC MULLEN et ALMLI, 1981). Cela a donc entraîné le choix d'une variante de la technique de GOLGI particulièrement adaptée à l'imprégnation de l'hypothalamus, ce qui semblait être le cas de la technique décrite par MAC MULLEN et ALMLI (1981).

Il a toujours été rapporté que les méthodes d'imprégnation argentique de GOLGI ne marquaient qu'une partie éventuellement faible des neurones présents dans une région donnée du tissu nerveux (RAMON-MOLINER, 1961 ; SCHADE et al., 1964 ; SCHADE et CAVENESS, 1968 ; BARRY, 1972) et que certains neurones, en particulier les neurones magnocellulaires du noyau paraventriculaire (NPV) (BARRY, 1975), étaient difficilement imprégnés. Ceci conduit à soulever le problème de la sélectivité de l'imprégnation argentique (SHOLL, 1955 ; SMIT et COLON, 1969 ; PASTERNAK et WOOLSEY, 1975). Cette sélectivité aurait pour conséquence directe que certains types cellulaires ne seraient pas imprégnés à l'intérieur d'une population donnée et donc échapperaient complètement à l'examen microscopique. Récemment, SHIMONO et TSUJI (1987) ont démontré sans ambiguïté possible, en comparant la technique de GOLGI à la coloration de NISSL dans le noyau ventro-médian et l'aire hypothalamique latérale, que la technique d'imprégnation argentique était non sélective au sein

d'une même région, au moins dans l'hypothalamus. Pour cette raison, on peut supposer que tous les types cellulaires présents dans la région observée ont été imprégnés. Il n'est toutefois pas possible d'affirmer avec une totale certitude qu'il n'existe pas dans le NMD un type cellulaire totalement réfractaire à cette coloration argentique, bien que les résultats obtenus grâce aux autres méthodes que nous avons utilisées (transport rétrograde de peroxydase ou injections intracellulaires de LUCIFER YELLOW (LY)) tendent à infirmer une telle éventualité.

Etudes statistiques

Le grand nombre de mesures effectuées sur chacune des 213 cellules imprégnées dans la région du NMD nous a orienté vers l'utilisation de méthodes d'analyse statistique multivariable de nos données. Les analyses multivariées permettent en effet la combinaison de toutes les variables, ainsi que leur traitement de manière simultanée alors que les méthodes classiques d'analyse ne permettent d'étudier la population que variable par variable.

Les méthodes utilisées dans cette étude sont l'Analyse en Composante Principale (A.C.P.) (PEARSON, 1901 ; RAO, 1964 ; SNEATH et SOKAL, 1973 ; LEBART et al., 1982), l'Analyse Factorielle Discriminante (A.F.D.) (ROMEDER, 1973 ; LEFEBVRE, 1980 ; FOUCART, 1982), la Classification Automatique Hiérarchisée (C.A.H.) (SOKAL et SNEATH, 1963 ; LERMAN, 1970 ; JAMBU, 1978 ; BENZECRI et al., 1984 ; ROUX, 1985) et le calcul de la Distance Généralisée de MAHALANOBIS (D^2 de MAHALANOBIS) (MAHALANOBIS, 1927 ; 1930 ; 1936 ; BOITARD, 1978 ; LEFEBVRE, 1980 ; LEGENDRE et LEGENDRE, 1984).

L'A.C.P. était la méthode la plus appropriée à notre étude morphométrique et à la nature de notre tableau de données. Cette méthode permet en effet de combiner tous les paramètres les uns aux autres et de réduire l'ensemble des données initiales en un ensemble de données plus réduit en ne perdant qu'un minimum d'informations. Le rôle de l'A.F.D. dans ce type de travail était de déterminer les paramètres qui caractérisent les types cellulaires définis par l'A.C.P., le calcul du D^2 de MAHALANOBIS justifiant le bien fondé de la constitution des sous populations de neurones. Récemment, PEARSON et al (1985) ont indiqué que l'utilisation d'une A.C.P. pour réaliser des subdivisions à l'intérieur d'une population cellulaire donnait des résultats comparables à ceux

obtenus par les méthodes non statistiques (n'utilisant que des critères d'observation) mais de plus faisait ressortir des caractéristiques impossibles à appréhender au cours d'une simple observation microscopique.

Les méthodes d'analyse statistique multivariable nous ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité dans la population cellulaire du NMD. Quatre types de cellules ont ainsi été décrits.

Synthèse des résultats des études morphologiques

La morphologie des neurones du NMD a également été étudiée par injection intracellulaire de LY. Les résultats obtenus sur 14 neurones injectés confirment pour certains aspects les observations réalisées après imprégnation argentique, tant en ce qui concerne la morphologie des corps cellulaires que la direction préférentielle des axones.

Les images obtenues dans le NMD après transport intra-axonal rétrograde de peroxydase à partir du septum latéral (SL), qui ont contribué à démontrer l'existence d'une relation directe entre le NMD et le SL, ont aussi permis de détailler la morphologie des péricaryons et des troncs dendritiques proximaux des neurones du NMD.

Nous présenterons ci-après une comparaison des informations morphologiques obtenues par l'application de ces trois techniques d'étude (technique de GOLGI, injection intracellulaire de LY et transport rétrograde de peroxydase) en classant les types cellulaires présents dans le NMD selon les critères qui ont été définis au cours de l'analyse statistique (neurones de type I, II, III et IV). Dans cette comparaison, il est toutefois difficile d'établir une relation entre les tailles des corps cellulaires d'un même type lorsqu'elles sont mesurées sur des neurones mis en évidence par des techniques différentes. En effet, la déshydratation du tissu par l'alcool qui précède le traitement au toluène destiné à solubiliser les composants lipidiques de la membrane s'accompagne d'une forte réduction de la taille des corps cellulaires, y compris lors de l'utilisation de la technique de GOLGI (BARRET et CRILL, 1974). Dans notre étude, l'utilisation du DMSO lors du traitement des tranches contenant des cellules injectées au LY a permis au contraire d'éviter la rétraction due à la déshydratation tout en assurant une bonne solubilisation des lipides (GRACE et LLINAS, 1985). Ces auteurs indiquent que le traitement des tranches au DMSO ne provoque pas de modification morphologique des neurones injectés au LY. En réalité, dans notre étude,

la taille des neurones mesurée après injection intracellulaire est apparue plus importante, et vraisemblablement plus proche des tailles réelles, que celle obtenue par les autres techniques morphologiques (technique de GOLGI et transport rétrograde de peroxydase).

1) Neurones de type I : (Fig. 50)

Les péricaryons imprégnés par la méthode de GOLGI et classés dans ce type sont les plus nombreux. Ils sont décrits comme ayant un aspect globuleux ou polygonal. Ils sont d'une taille inférieure à celle des péricaryons des autres types. Les troncs dendritiques issus de ces péricaryons sont simples ou doubles, peu ramifiés et sans direction préférentielle. Les axones, au contraire, empruntent trois directions préférentielles : vers l'hypothalamus médio-dorsal, vers l'aire périfornicale externe et vers l'aire périventriculo-fornicale.

L'examen des cellules du NMD injectées par le LY a permis de confirmer l'existence de neurones appartenant à ce type cellulaire. En effet, un certain nombre de cellules injectées peut être inclus dans ce type I, tant pour l'aspect globuleux du péricaryon que pour la forme du champ dendritique à ramifications très réduites (cellules 23, 26, 27, 35 et 41). En ce qui concerne la direction empruntée par les axones, seul le cheminement vers l'hypothalamus médio-dorsal a pu être confirmé (cellules 23 et 35).

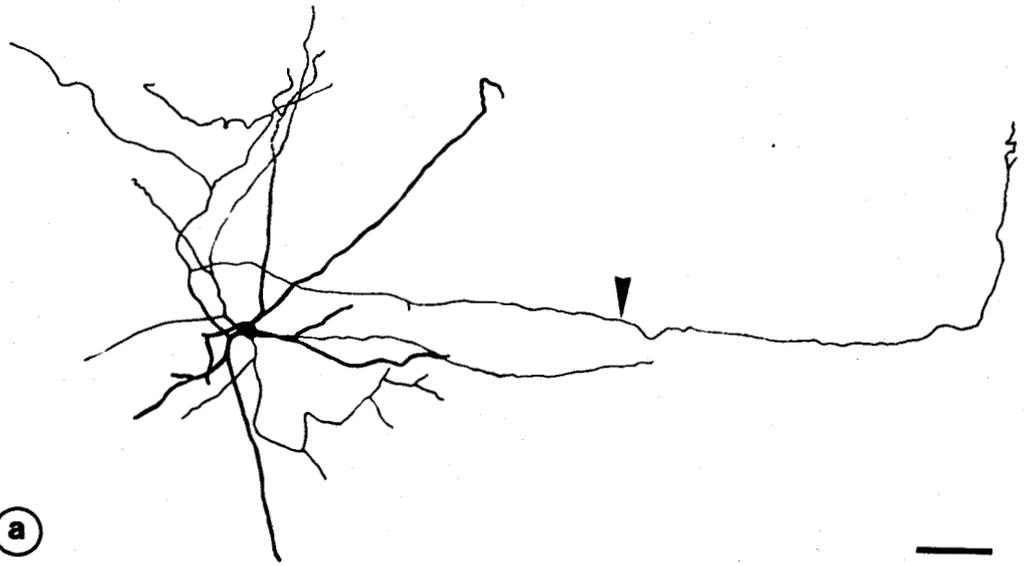
L'observation des neurones marqués par la peroxydase utilisée pour mettre en évidence les efférences du NMD vers le SL a permis de visualiser des corps cellulaires de forme globuleuse pouvant raisonnablement être inclus dans ce type I. Ce contingent est assez réduit par rapport à l'ensemble des neurones marqués après transport rétrograde depuis le SL. Aucune information quant à la forme du champ dendritique ou à la direction empruntée par l'axone n'a pu nous être fournie par cette technique.

Il faut signaler que lors des injections intracellulaires réalisées sur les cellules 23 et 27, l'enregistrement de leur activité électrique a mis en évidence la présence d'un potentiel dépolarisant lent, lié à une conductance calcique inactivée au potentiel de repos et désinactivée par l'hyperpolarisation de la membrane (POULAIN, communication personnelle). Des neurones présentant des propriétés semblables ont été découverts dans la même espèce au voisinage du NPV (POULAIN et CARETTE,

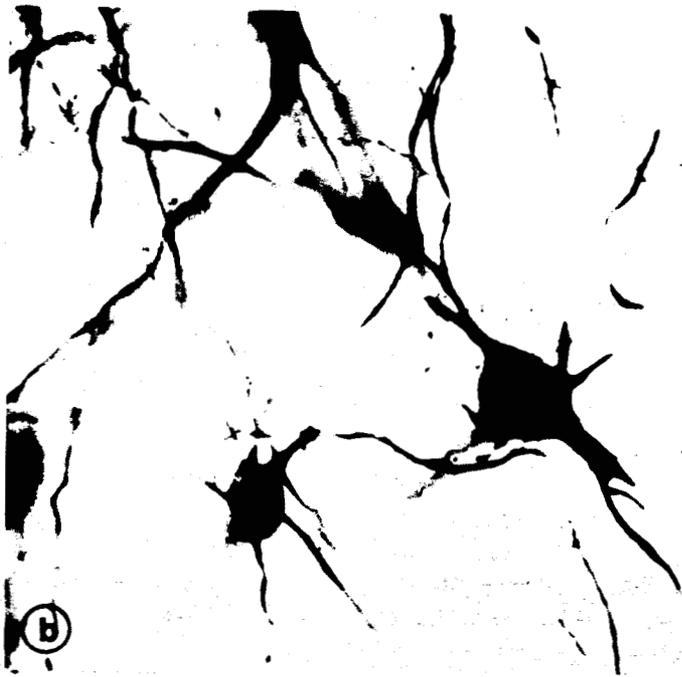
FIGURE 50

Cellules de Type I.

- a) Dessin d'une cellule marquée par injection intracellulaire de Lucifer-Yellow (cellule 23).
Barre de calibration : 100 μm .
- b) Cellule imprégnée par la technique de GOLGI modifiée.
Barre de calibration : 25 μm .
- c) Cellule marquée après transport rétrograde de peroxydase à partir du septum latéral.
Barre de calibration : 25 μm .



(a)



(b)



(c)

1987) et dans le noyau ventro-médian (MINAMI et al., 1986). Ils sont également nombreux dans toute la région périfornicale (POULAIN, communication personnelle). Leur analyse morphologique (POULAIN et CARETTE, 1987) permet de les définir comme étant des éléments de type réticulaire. Ils possèdent en effet un petit nombre de dendrites assez rectilignes et surtout peu ramifiées, issues d'un péricaryon globuleux d'assez petite taille. Cette description correspond en tout point à celle des cellules réticulaires "isodendritiques" (RAMON-MOLINER et NAUTA, 1966) qui sont nombreuses dans l'hypothalamus (BARRY, 1972 ; LEONTOVICH et ZHUKOVA, 1963) où elles ont été décrites à partir de préparations de GOLGI dans la région du NPV (BARRY, 1975; LEFRANC, 1966). On peut supposer qu'à l'intérieur du groupe des neurones de type I peut être classée une sous-population de cellules non pas spécifique au NMD, mais appartenant au réseau de neurones réticulaires qui s'étend dans la majeure partie de l'hypothalamus, assurant les connections entre structures voisines (LEONTOVICH et ZHUKOVA, 1963). A l'appui de cette proposition vient la constatation que les neurones de type I, très nombreux sur les préparations de GOLGI, ne représentent qu'une faible proportion des neurones marqués par transport rétrograde à partir du SL. Il peut donc être envisagé que le groupe des neurones de type I soit constitué d'une part de neurones (enképhalinergiques) se projetant vers le SL mais aussi de neurones (réticulaires) établissant d'autres relations de type local, et que ces sous-populations possèdent cependant des caractéristiques morphologiques communes.

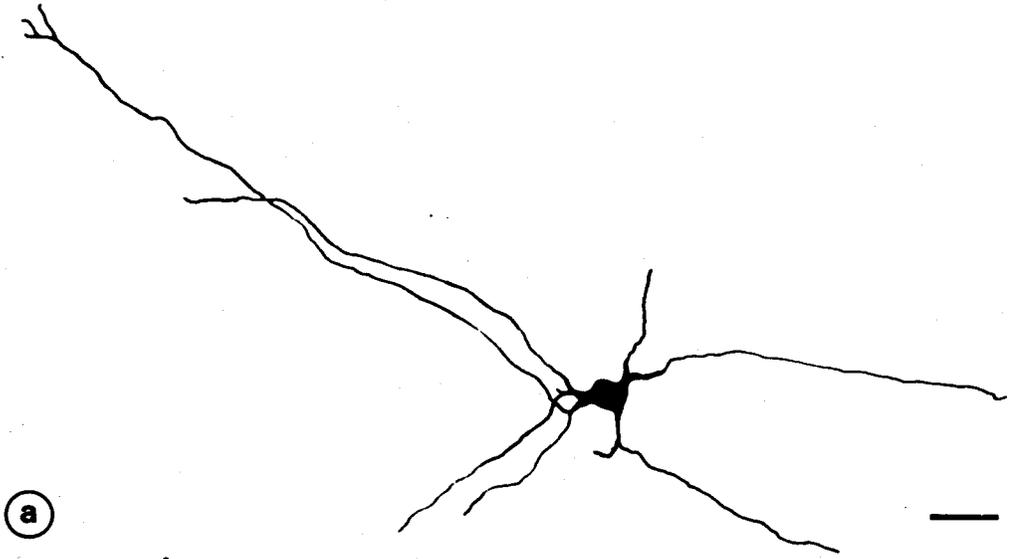
2) Neurones de type II : (Fig. 51)

Les neurones classés dans ce type cellulaire présentent après imprégnation argentique des péricaryons de forme sphérique ou triangulaire selon le plan dans lequel ils sont observés. Lorsque le péricaryon a un aspect triangulaire, on peut observer trois troncs dendritiques issus de chacun des angles, ce qui renforce l'aspect triangulaire du corps cellulaire. Si ce dernier apparaît sphérique, les troncs dendritiques sont placés tangentiellement au péricaryon. Les dendrites présentent d'autre part une ramification abondante recouvrant une surface importante. Bien que non appuyés par une étude statistique, les résultats des observations réalisées sur les axones ont permis de localiser le cône d'émergence le plus souvent sur le péricaryon ou à faible distance de celui-ci. Deux

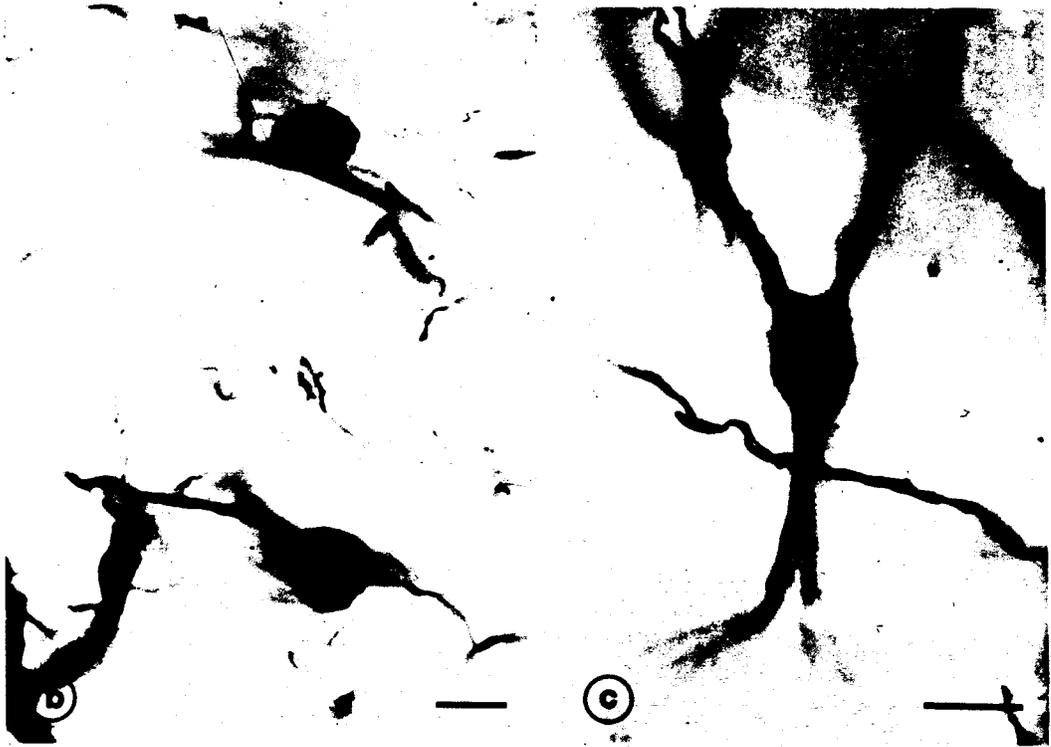
FIGURE 51

Cellules de Type II.

- a) Dessin d'une cellule marquée par injection intracellulaire de Lucifer-Yellow (cellule 25).
Barre de calibration : 50 μm
- b) Cellules imprégnées par la technique de GOLGI modifiée.
Barre de calibration : 20 μm
- c) Cellule imprégnée par la technique de GOLGI modifiée.
Barre de calibration : 20 μm
- d) Cellule marquée après transport rétrograde de peroxydase à partir du septum latéral.
Barre de calibration : 20 μm



(a)



(c)

(b)

(d)



directions préférentielles de l'axone ont pu être mises en évidence, l'une vers l'hypothalamus dorsal et l'autre, plus rare, vers l'aire périfornicale externe.

Les injections intracellulaires de LY ont permis de confirmer l'existence de cette population de neurones à péricaryon triangulaire et à arborisation dendritique abondante (cellules 25, 28, 31, 33, 34 et 38). En ce qui concerne les axones, ils sont toujours dirigés vers la zona incerta, au travers de l'aire hypothalamique latéro-dorsale (cellule 33) et dans l'aire périfornicale (cellule 38), ce qui est parfaitement compatible avec les directions observées en GOLGI vers l'hypothalamus dorsal.

Après observation des neurones marqués par transport rétrograde de peroxydase à partir du SL, de nombreux de corps cellulaires d'aspect piriforme peuvent être rapprochés de ce type II. Il faut noter que ces corps cellulaires constituent une population importante parmi les neurones marqués par transport rétrograde.

3) Neurones de type III : (Fig. 52)

Les neurones appartenant à cette population cellulaire et imprégnés par la technique de GOLGI sont de taille assez importante, toujours de forme allongée et oblongue et présentent 2 troncs dendritiques importants diamétralement opposés. Ces neurones sont orientés préférentiellement selon un axe perpendiculaire au 3^e ventricule. L'axone est, dans la majorité des cas, supporté par une branche dendritique et naît assez loin du péricaryon. Les directions préférentielles de l'axone, lorsqu'elles ont pu être mises en évidence, indiquent un cheminement vers la zona incerta et l'aire périventriculo-fornicale.

Lors des injections intracellulaires de LY, des cellules présentant des caractéristiques morphologiques remarquablement identiques (cellules 24, 29 et 39), ont été mises en évidence tant en ce qui concerne la forme du péricaryon que l'apparence du champ dendritique. Dans le cas des cellules 24 et 29, le cône d'émergence est toujours situé sur une dendrite, ce qui corrobore les observations obtenues grâce à la technique de GOLGI. En ce qui concerne la direction empruntée par les axones de ces neurones, les cellules 24 et 29 ont présenté des axones dirigés respectivement vers la zona incerta et l'aire hypothalamique latéro-dorsale. Par contre, l'orientation de l'axone vers l'hypothalamus médio-

FIGURE 52

Cellules de Type III.

a) Dessin d'une cellule marquée par injection intracellulaire de Lucifer-Yellow (cellule 29).

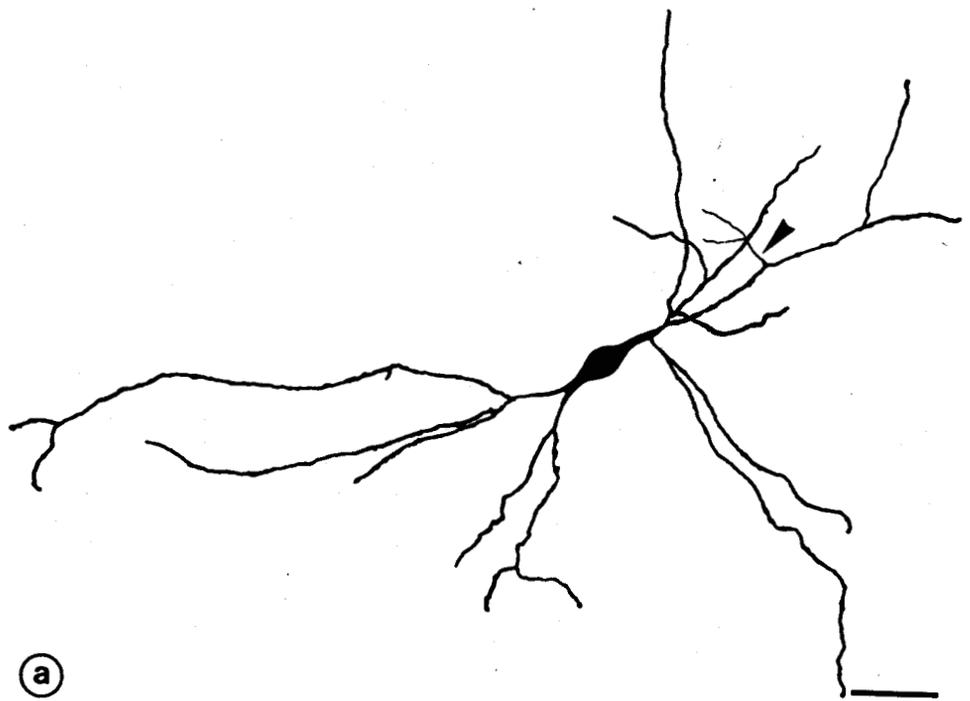
Barre de calibration : 50 μm

b) Cellule imprégnée par la technique de GOLGI modifiée.

Barre de calibration : 20 μm

c) Cellule marquée après transport rétrograde de peroxydase à partir du septum latéral.

Barre de calibration : 14 μm



(a)



(b)



(c)

dorsal (observée parmi la population de neurones de ce type imprégnés par la méthode de GOLGI) n'a jamais été retrouvée avec cette technique.

L'observation des cellules marquées par transport rétrograde de peroxydase a permis de confirmer l'existence d'un type cellulaire présentant ces caractéristiques morphologiques ainsi que l'importance de leur effectif.

4) Neurones de type IV

Les neurones de ce type, dont le péricaryon est de taille moyenne, présentent une orientation verticale parallèle au 3^e ventricule et un champ dendritique de très grande étendue. Ces neurones n'ont été mis en évidence que par la technique d'imprégnation argentique et n'ont jamais pu être observés par les deux autres techniques. Le faible effectif de ce groupe, ainsi que l'extrême difficulté à imprégner les axones, ne nous permettent pas de conclure de manière précise en ce qui concerne les autres critères morphologiques qui caractériseraient les neurones de ce groupe.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous permet de supposer que dans la région du NMD existent quatre groupes de cellules nerveuses possédant des caractéristiques morphologiques et des orientations d'axones bien distinctes. Deux d'entre eux se projetteraient plus particulièrement vers le SL (types II et III) et correspondraient aux neurones enképhalinergiques du NMD. Un troisième groupe (type I) interviendrait plutôt dans des relations locales. Un dernier groupe enfin ne se projetterait (type IV) pas vers le SL, et représenterait un très faible effectif parmi les neurones étudiés.

Le second objectif de ce travail était de mettre en évidence les efférences du NMD.

Absence d'efférence du noyau magnocellulaire dorsal vers l'éminence médiane

De nombreuses fibres et terminaisons nerveuses enképhalinergiques étant présentes dans la lèvre externe de l'éminence médiane (EM) chez le Cobaye, nous avons voulu tout d'abord vérifier si le

NMD pouvait être à l'origine de cette innervation. Dans nos expériences de lésion électrolytique du NMD, aucune différence qualitative ou quantitative n'a été notée en ce qui concerne l'immunoréactivité vis-à-vis des enképhalines entre les animaux témoins et ceux ayant subi une destruction bilatérale du noyau.

L'absence de relation directe entre le NMD et l'EM a ensuite été confirmée par les expériences d'injection intraveineuse de peroxydase. Ces expériences ont permis de détailler la topographie des neurones hypothalamiques afférents aux organes dénués de barrière hémato-encéphalique (dont l'EM et la neurohypophyse). Cette topographie, décrite ici pour la première fois chez le Cobaye, est tout à fait en accord avec les résultats obtenus chez la Souris par BROADWELL et BRIGHTMAN (1976), par YOUNGSTROM et NUNEZ (1987) en ce qui concerne les neurones voisins des noyaux suprachiasmatiques et par JENNES et STUMPF (1986) pour les neurones parvicellulaires disséminés dans tout l'hypothalamus.

Les neurones magnocellulaires marqués dans le NPV et le noyau supra-optique après application intraveineuse correspondent à l'origine du tractus hypothalamo-neurohypophysaire, apparaissant chez le Rat après injection de traceurs dans la neurohypophyse (SHERLOCK et al., 1975 ; ARMSTRONG et al., 1980 ; WIEGAND et PRICE, 1980) ou dans l'EM (LECHAN et al., 1980 ; WIEGAND et PRICE, 1980), en considérant que dans ce dernier cas le tractus hypothalamo-neurohypophysaire est également touché par l'injection.

Les neurones parvicellulaires, hormis les éléments appartenant au noyau arqué qui ne peuvent être identifiés par cette technique, contribuent quant à eux au tractus tubéro-infundibulaire qui se termine dans la partie externe de l'EM comme cela est démontré chez le Rat après application de traceurs sous contrôle visuel à proximité des vaisseaux portes de l'EM (WIEGAND et PRICE, 1980 ; LECHAN et al., 1982 ; SILVERMAN et al., 1987).

L'impossibilité de marquer les péricaryons du NMD dans notre matériel permet donc de conclure que ceux-ci ne sont pas à l'origine de projections s'engageant dans les tractus hypothalamo-neurohypophysaire ou tubéro-infundibulaire.

Un autre apport des résultats obtenus après injection intraveineuse de peroxydase est la possibilité d'établir une claire

distinction topographique entre le NMD (non marqué) et deux groupes de neurones magnocellulaires qui lui sont voisins mais qui, au contraire, apparaissent marqués après l'intervention. Ces groupes de neurones constituent d'une part le noyau paraventriculaire accessoire, qui se situe dans la partie dorso-latérale de l'aire périfornicale et d'autre part le noyau fornical antérieur qui prolonge postérieurement le noyau paraventriculaire accessoire en s'étendant sur le bord externe du fornix. Les neurones de ces groupes magnocellulaires sont connus pour renfermer la neurophysine chez le Rat (ARMSTRONG et al., 1980 ; SOFRONIEW et GLASMANN, 1981) et chez le Cobaye (résultats inédits obtenus au laboratoire). Ils se projettent dans la neurohypophyse chez le Rat (ARMSTRONG et al., 1980) et vraisemblablement participent aussi au tractus hypothalamo-neurohypophysaire chez le Cobaye. Il apparaît donc que le NMD et les "noyaux neurosécréteurs accessoires", bien que très proches, diffèrent tant par leur localisation de part et d'autre du fornix, que par leurs projections efférentes et par les produits de sécrétion qu'ils élaborent.

En conclusion, la confrontation des données obtenues par lésions électrolytiques et par injections intraveineuses de peroxydase permet d'affirmer que les neurones enképhalinergiques du NMD ne s'engagent pas dans la constitution d'un tractus aboutissant à l'EM.

L'origine du tractus enképhalinergique destiné à l'EM reste hypothétique. A part la région infundibulaire elle-même (ROMAGNANO et al., 1982), d'autres origines peuvent être supposées si l'on remarque que lors d'études immunocytochimiques menées à l'échelle ultrastructurale, les enképhalines apparaissent être co-localisées (dans les mêmes granules) avec la somatostatine (BEAUVILLAIN et al., 1984) ou le CRF (HISANO et al., 1986) dans l'EM. Les projections enképhalinergiques vers l'EM pourraient en conséquence provenir des territoires hypothalamiques contenant des corps cellulaires à somatostatine ou à CRF.

Pour la somatostatine, s'il existe une parfaite concordance chez le Cobaye entre les terminaisons nerveuses contenant ce peptide et celles contenant les enképhalines, il n'a toutefois pas été découvert de corps cellulaires à somatostatine (présents dans la région périverriculaire), contenant également les enképhalines (TRAMU et al., 1981).

En ce qui concerne la co-localisation entre le CRF et les

enképhalines, la partie parvicellulaire du NPV représente vraisemblablement, au moins chez le Rat, l'origine de la projection enképhalinergique vers l'EM. Dans cette espèce en effet, les péricaryons de la partie parvicellulaire du NPV présentent une forte immunoréactivité vis-à-vis des enképhalines (KHACHATURIAN et al., 1985), du CRF (BUGNON et al. 1982 ; SWANSON et al., 1983) ou des deux à la fois (HOKFELT et al., 1983a ; DAIKOKU et al., 1985). Il est bien connu de plus que les neurones à CRF de la partie parvicellulaire du NPV se projettent vers l'EM (BLOOM et al., 1982).

Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers le septum latéral

Le résultat principal de notre étude concernant les efférences du NMD est la démonstration d'un tractus enképhalinergique hypothalamo-septal ayant pour origine le NMD et se terminant dans le SL.

Les caractéristiques du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal peuvent être résumées et discutées comme suit :

1) Le noyau magnocellulaire dorsal se projette vers le septum latéral

Les expériences basées sur le transport rétrograde intra-axonal de peroxydase et de fluorochromes (DAPI et PI) in vivo démontrent l'existence d'une relation directe entre le NMD et le SL. Elles montrent également que c'est dans la portion juxtaventriculaire de la partie postérieure du septum, et à égale distance entre les corps calleux et la commissure blanche antérieure, que se projette le plus grand nombre des axones issus du NMD. Ce résultat est en accord avec la distribution de l'immunoréactivité vis-à-vis des enképhalines qui, chez le Cobaye (STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; TRAMU et al., 1981), est plus prononcée dans la partie postérieure du SL, tandis qu'elle décroît dans les régions plus antérieures. Des études chez le Rat (CONRAD et PFAFF, 1976b ; LUITEN et al., 1982) et le Cobaye (SHEN et ANDERSON, 1980) avaient suggéré que l'aire périfornicale au niveau du NPV se projetait vers le septum. Il est établi d'après nos expériences, que chez le Cobaye, la plupart des neurones de l'aire périfornicale se projetant vers le SL sont concentrés dans les limites du NMD. Récemment, l'existence d'une projection de l'aire périfornicale au niveau du NPV vers le SL a été confirmée chez le Rat (ONTENIENTE et al., 1986 ; TER HORST et LUITEN, 1986 ; ONTENIENTE-KAH, 1987 ; SAKANAKA et al., 1988).

2) La projection noyau magnocellulaire dorsal-septum latéral est enképhalinergique

La combinaison des techniques de transport rétrograde intra-axonal "in vivo" par le DAPI et d'immunofluorescence a permis d'apporter la preuve directe que les neurones du NMD se projetant dans le SL étaient bien enképhalinergiques.

Avant cette démonstration (POULAIN et al., 1984), la méthode consistant à combiner le marquage rétrograde par la péroxydase ou les fluorochromes et l'immunocytochimie avait déjà été utilisée pour tracer certains trajets enképhalinergiques dans le système nerveux central (HOKFELT et al., 1979 ; BRANN et EMSON, 1980 ; BOWKER et al., 1981 ; BEITZ, 1982 ; DALSGAARD et al., 1982), avec plus ou moins de succès étant donné surtout que la fluorescence émise par les fluorochromes utilisés (PI, Fast Blue, True Blue) était fortement réduite, voire totalement éliminée, au cours du traitement immunocytochimique. Dans notre étude, l'utilisation du DAPI et son mode d'administration ont facilité l'obtention d'un double marquage tenace permettant d'aboutir à la démonstration d'un tractus enképhalinergique hypothalamo-septal.

Les résultats basés sur le transport rétrograde peuvent laisser subsister un doute quant à la terminaison réelle dans le SL des axones issus du NMD, si l'on invoque le marquage possible d'axones lésés lors des implantations du traceur. Toutefois, ces résultats sont tout à fait corroborés par les expériences de lésion électrolytique du NMD. Après destruction bilatérale du NMD, une disparition totale des fibres et terminaisons immunoréactives vis-à-vis des enképhalines a été en effet constatée dans le SL. Cela indique d'une part la nature enképhalinergique du tractus NMD-SL et suggère d'autre part que le NMD est la seule source des enképhalines présentes dans le SL. Ce dernier point est important car il apporte un argument en faveur de l'absence d'une innervation enképhalinergique intrinsèque du SL tout au moins chez le Cobaye, et laisse au contraire supposer que si des neurones enképhalinergiques sont présents dans la région septale, ils ne contribuent pas à l'innervation du SL.

Au moment de la destruction électrolytique du NMD, il est possible que des fibres enképhalinergiques provenant d'autres régions du cerveau et destinées au SL aient été lésées, ce qui pourrait rendre contestable l'interprétation faite des résultats. Cette possibilité est

hautement improbable pour plusieurs raisons. Tout d'abord les autres régions hypothalamiques se projetant vers le SL (POULAIN, 1983) ne contiennent pas de neurones enképhalergiques (TRAMU et al., 1981). Il faudrait donc invoquer l'interruption de fibres issues de groupes de neurones enképhalergiques présents dans des régions plus postérieures du système nerveux central et transitant par la région du NMD. L'existence d'un tel tractus n'est pas établie. Ensuite, dans nos expériences, des lésions situées à proximité mais en dehors des limites du NMD n'ont jamais donné lieu à une réduction du matériel immunoréactif dans le SL.

3) La projection noyau magnocellulaire dorsal-septum latéral est bilatérale

Chez les animaux ayant subi une destruction électrolytique unilatérale du NMD, il n'a jamais été observé une disparition totale des fibres et terminaisons immunoréactives vis-à-vis des enképhalines dans le SL homolatéral. A moins d'invoquer une destruction incomplète du noyau, ce qui est apparu très improbable après vérification histologique, la présence d'enképhalines dans le SL homolatéral indique de toute évidence que des neurones appartenant au NMD laissé intact atteignent le SL controlatéral, après que leurs axones ou collatérales d'axones aient effectué une décussation au cours de leur trajet.

Suite à une application unilatérale de peroxydase ou de fluorochrome dans le SL, la présence de corps cellulaires marqués par transport rétrograde dans le NMD a été constatée tant du côté de l'application que de l'autre côté. Cela conforte l'idée d'une décussation axonique sur le parcours NMD-SL. Cependant, comme le nombre de corps cellulaires marqués est nettement plus important du côté de l'application (ceci apparaît bien dans l'étude quantitative menée sur les neurones marqués par la peroxydase), il ne peut être supposé qu'un nombre égal de neurones dans chaque noyau se projette vers le SL controlatéral et homolatéral. Si tel était le cas, on observerait un nombre identique de neurones marqués dans le NMD de chaque côté, après application unilatérale de traceurs dans le SL. En réalité, nos expériences ont clairement démontré qu'une bifurcation axonique se produisait sur le parcours NMD-SL, donnant naissance à deux collatérales dont l'une franchissait la ligne médiane pour rejoindre le NMD controlatéral. Cette démonstration a été faite lors de l'utilisation d'une double injection de DAPI et de PI dans

le SL, laquelle a permis d'obtenir d'un double marquage des neurones du NMD de chaque côté. Bien que la fréquence d'observation de neurones doublement marqués soit très élevée, il n'est pas concevable que tous les neurones du NMD, par le jeu d'une bifurcation axonique, se projettent à la fois vers le SL homolatéral et controlatéral. Là encore, la différence dans le nombre de corps cellulaires marqués par transport rétrograde après une application unilatérale du traceur, à laquelle s'ajoute la dissymétrie observée dans le matériel immunoréactif encore présent dans le SL après lésion unilatérale du noyau, est incompatible avec cette hypothèse. Ces deux arguments conduisent à supposer qu'une certaine proportion de neurones du NMD se projette uniquement vers le SL homolatéral (Fig. 53). Ceci expliquerait d'ailleurs la présence de neurones simplement marqués après double application de traceurs. Les techniques que nous avons utilisées ne nous fournissent pas d'argument qui permette d'affirmer que certains neurones du NMD se projettent uniquement vers le SL controlatéral, bien que cela ait été démontré en faisant appel à des techniques électrophysiologiques (POULAIN, 1986).

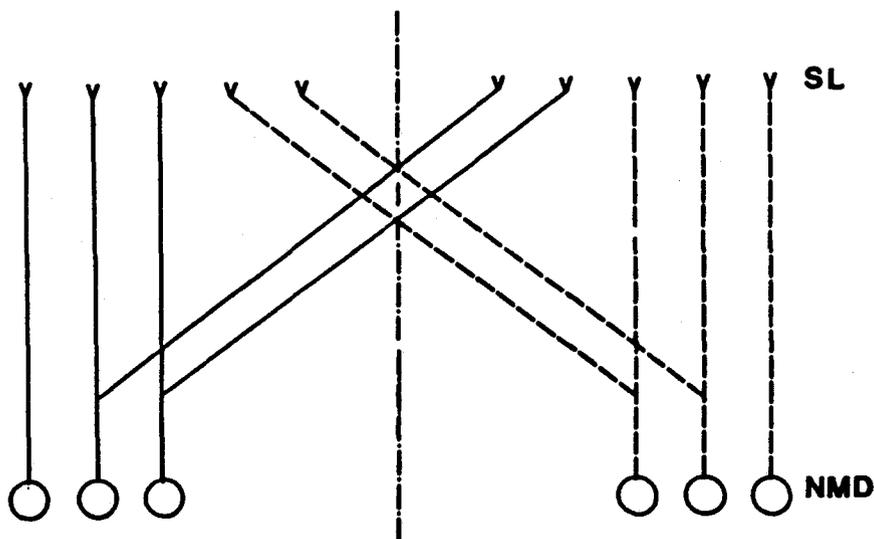


FIGURE 53 : Schéma pouvant expliquer les relations anatomiques entre le septum latéral et le noyau magnocellulaire dorsal. Ce schéma fait intervenir la collatéralisation d'axones issus du noyau magnocellulaire dorsal et tient compte du nombre relatif de cellules effectuant cette collatéralisation.

En conclusion, un grand nombre d'observations permettent de démontrer que les axones de certains neurones du NMD se projetant vers le SL présentent les deux particularités suivantes :

- existence d'une bifurcation
- décussation d'une des deux collatérales qui rejoint le SL controlatéral

Des renseignements complémentaires concernant ces deux points peuvent être retirés de nos expériences "in vivo" et "in vitro" relatives à l'identification des voies efférentes du NMD par transport antérograde de peroxydase et de nos injections intracellulaires de LY. Un exemple de bifurcation axonique est donné par la cellule injectée 35 qui présente cette particularité à 120 μm du corps cellulaire. Cette valeur est très proche de celles obtenues par l'électrophysiologie (POULAIN, 1986), qui permettent de situer la bifurcation axonique des neurones du NMD se projetant bilatéralement vers le SL à une distance de 25-100 μm du corps cellulaire. Au contraire, un autre exemple de bifurcation obtenu lors d'injection de peroxydase dans le NMD "in vitro" situe celle-ci au dessus du 3^e ventricule (Fig. 48b), donc à une distance beaucoup plus importante du corps cellulaire. On peut supposer qu'un tel exemple intéresse plutôt un neurone établissant des relations avec des régions du système nerveux central différentes du SL.

L'emplacement précis de la décussation des fibres du tractus NMD-SL ne peut être déterminé avec certitude. Des exemples de décussation après injection de peroxydase dans le NMD "in vivo" et "in vitro" ont été rapportés : des fibres marquées sont observées en effet passant au dessus (Fig. 48b) ou en dessous (Fig. 42b) du 3^e ventricule. On ne peut cependant pas affirmer que ces décussations intéressent réellement le tractus NMD-SL.

4) Comparaison avec les données obtenues chez le Rat

Les résultats discutés ci-dessus ont amené la première démonstration directe d'un tractus enképhalinergique originaire de l'hypothalamus et aboutissant au SL (POULAIN et al., 1984).

Nos résultats contrastent avec ceux obtenus chez le Rat (SAKANAKA et al., 1982) qui précisent qu'une destruction unilatérale de la région "juste ventro-latérale" à l'aire hypothalamique antérieure provoque la disparition complète du matériel immunoréactif vis-à-vis des

enképhalines dans le SL homolatéral. Cette région située en fait en dessous du fornix correspond parfaitement à la partie de l'hypothalamus latéral (HL) qui, dans nos expériences, a présenté un grand nombre de neurones marqués après implantation de traceurs dans le SL. Lorsqu'ils sont mis en évidence par la peroxydase (marquage de type "solide"), ces neurones présentent une orientation préférentielle de leurs troncs dendritiques principaux dans les directions dorso-médiale et ventro-latérale. Ils possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques et la même orientation que les neurones de l'HL situés le long du parcours du faisceau médian du télencéphale et appelés "path neurons" (MILLHOUSE, 1969) ou "Class I neurons" (MAC MULLEN et ALMLI, 1981) sur la base d'études en GOLGI menées chez le Rat. D'autres études dans cette même espèce ont démontré que des lésions de l'HL conduisaient à une dégénérescence des fibres ascendantes du faisceau du télencéphale se dirigeant vers le septum (GUILLERY, 1957 ; RAISMAN, 1966 ; WOLF et SUTIN, 1966). Cependant, les conclusions qui émanent d'études autoradiographiques chez le Rat laissent plutôt supposer que l'aire hypothalamique latérale se projette massivement vers le septum médian, plutôt que vers le SL (SAPER et al., 1979 ; SWANSON et COWAN, 1979). Au contraire, d'autres études autoradiographiques (BERK et FINKELSTEIN, 1982) ou basées sur le transport rétrograde de peroxydase (LUITEN et al., 1982 ; VEENING et al., 1987) démontrent clairement la projection de la partie rostrale de l'aire hypothalamique latérale vers le SL. Les neurones marqués par la peroxydase dans ces deux dernières études sont présents dans la région "juste ventro-latérale" à l'aire hypothalamique antérieure, telle que l'entendent SAKANAKA et al. (1982). Il est donc tout à fait démontré, par les résultats obtenus chez le Rat qui viennent d'être rappelés et par nos propres résultats chez le Cobaye, corroborant d'ailleurs ceux obtenus par SHEN (1983) dans la même espèce, qu'une partie de l'HL se projette vers le SL à la fois chez le Rat et le Cobaye.

Une différence entre les deux espèces viendrait donc du fait que l'HL serait à l'origine du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal chez le Rat (SAKANAKA et al., 1982). Il faudrait donc admettre que si certaines similitudes existent entre les deux espèces en ce qui concerne une projection hypothalamo-septale issue de l'HL, l'origine des tractus enképhalinergiques atteignant le SL soit différente : HL chez le Rat, NMD chez le Cobaye. Il est bon de rappeler l'absence de corps

cellulaires enképhalinergiques dans l'HL du Cobaye (TRAMU et al., 1979). Si l'innervation du SL chez le Rat provient de l'HL, on peut également s'interroger sur la contribution à cette innervation du groupe de neurones enképhalinergiques décrits entre le NPV et le fornix dans la même espèce (KRUKOFF et CALARESU, 1984 ; ONTENIENTE et al., 1986; ONTENIENTE-KAH, 1987). A défaut d'études neuroanatomiques précises, cette question reste posée. On peut envisager avec KRUKOFF et CALARESU (1984) que ces neurones établissent plutôt des relations courtes avec d'autres neurones de l'hypothalamus antérieur auxquels ils sont associés. On peut penser au contraire avec ONTENIENTE et al. (1986) et ONTENIENTE-KAH (1987) que ce groupe de neurones s'engage dans une relation longue avec le SL tout à fait comparable à celle décrite dans cette étude. En effet, d'après ces auteurs, les neurones enképhalinergiques présents entre le NPV et le fornix sont marqués après une injection de peroxydase dans le SL.

5) Signification fonctionnelle de l'innervation enképhalinergique du septum latéral

L'identité des neurones du SL recevant l'innervation enképhalinergique en provenance du NMD n'est pas connue. Par comparaison avec le Rat et d'après ONTENIENTE-KAH (1987), il pourrait s'agir de neurones GABAergiques. En considérant la disposition péricellulaire des terminaisons enképhalinergiques tout à fait caractéristique dans le SL (Fig. 33d), on peut penser que les enképhalines interviennent sur leurs neurones cibles par une action post-synaptique. Par iontophorèse "in vivo" chez le Cobaye, CARETTE et POULAIN (1982) ont démontré la réalité d'une telle action, qui se manifeste par une inhibition de la décharge de neurones individuels du SL soumis à l'application de la Leu- et de la Met-enképhaline. Pour STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON (1983), les deux peptides co-existeraient (seraient co-localisés dans les mêmes terminaisons ?) dans le SL du Cobaye.

Le rôle fonctionnel de l'innervation enképhalinergique du SL revêt certainement une grande importance si l'on considère d'une part le nombre considérable de neurorégulateurs qui sont recensés dans le SL et d'autre part les projections efférentes de cette région, principalement destinées à l'hippocampe et à l'hypothalamus.

Un grand nombre de neurorégulateurs, incluant dopamine, noradrénaline, sérotonine, substance P, cholécystokinine, vasopressine,

angiotensine II et CRF (MOORE, 1978 ; GALL et MOORE, 1984 ; SAKANAKA et al., 1988 ; revues dans POULAIN et al., 1984 et ONTENIENTE-KAH, 1987) sont en effet présents dans le SL, qui possède également des récepteurs aux stéroïdes (STUMPF et SAR, 1975 ; WAREMBOURG, 1977). La concentration de terminaisons aminergiques, sérotoninergiques et peptidergiques dans le SL, lequel est également une région-cible pour les hormones stéroïdiennes, indique l'importance potentielle de cette région dans une large gamme de fonctions et laisse préjuger d'interactions complexes entre les terminaisons enképhalinergiques et les autres terminaisons nerveuses. Par exemple, venant confirmer les résultats précités de CARETTE et POULAIN (1982) , les expériences de NAYAR et al. (1987) dans le SL du Rat "in vitro" ont récemment démontré l'action inhibitrice des enképhalines sur l'activité électrique de neurones individuels, s'y ajoutant l'action de la substance P, certains neurones étant sensibles aux deux substances.

Le résultat de l'intégration complexe des sollicitations neurorégulatrices reçues par les neurones du SL sera transmis principalement aux structures hippocampiques, après relai dans le septum médian (RAISMAN, 1966 ; MEIBACH et SIEGEL, 1977, SWANSON et COWAN, 1979 ; CRUTCHER et al., 1981) et à l'hypothalamus. Concernant les relations entre le SL et l'hypothalamus, les différents territoires de ce dernier reçoivent les afférences du SL par l'intermédiaire du faisceau médian du télencéphale (RAISMAN, 1966 ; MEIBACH et SIEGEL, 1977 ; GARRIS, 1979 ; SWANSON and COWAN, 1979) et par un tractus direct septo-tubéral, décrit à l'origine chez le Cobaye par POULAIN (1977) et retrouvé chez le Rat (HAGINO et al., 1977 ; GARRIS, 1979) où il réalise une connexion monosynaptique entre le SL et les neurones tubéro-infundibulaires (BLUME et al., 1982). Par ces voies, de manière directe ou indirecte, le SL peut intervenir de manière excitatrice ou inhibitrice sur de nombreuses régions hypothalamiques : aire hypothalamique antérieure (KENDRICK, 1983), NPV (SUNDSTEN, 1971 ; NEGORO et al., 1973 ; PITMANN et al., 1981), noyaux dorso- et ventro-médians (BLUME et al., 1982 ; ANSCHEL et al., 1982) mais aussi, en retour, NMD lui-même (POULAIN, 1986). La signification fonctionnelle de ces projections n'est pas élucidée mais l'ensemble des observations laisse supposer que les neurones enképhalinergiques se projetant vers le SL sont en mesure d'intervenir sur différents rôles assignés à cette dernière structure, laquelle est impliquée dans des fonctions comportementales (GRAY et Mac NAUGHTON, 1983), psycho-neuroendocrines (NANCE, 1983) et neuroendocrines (HAGINO et YAMAOKA, 1976).

Efférences du noyau magnocellulaire dorsal vers le thalamus et l'hypothalamus

La plupart des informations concernant les projections efférentes du NMD autres que celle dirigée vers le SL ont été obtenues après injection "in vitro" de peroxydase dans le noyau sous contrôle de la loupe binoculaire. Il faut cependant noter que bien que nous n'ayons retenu pour cette étude que les cas où l'injection était exactement centrée sur le NMD, les limites des injections réalisées s'étendaient plus ou moins en dehors du noyau ; l'injection parfaitement circonscrite à l'intérieur du NMD étant techniquement irréalisable. Il faut également rappeler que les efférences décrites dans ce travail peuvent correspondre soit à des régions de terminaisons nerveuses soit à des régions de passage des fibres efférentes.

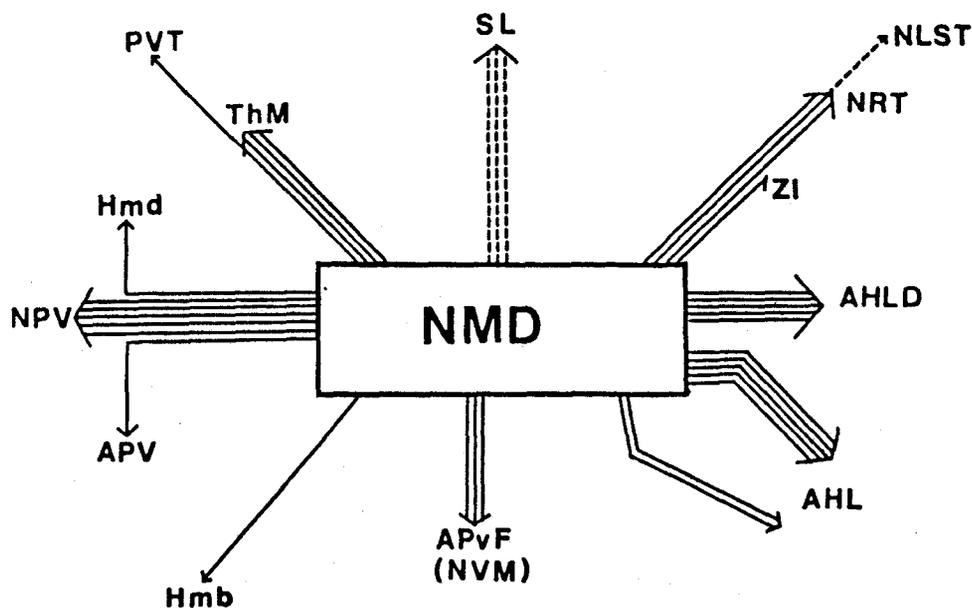


FIGURE 54 : Schéma synthétique récapitulatif des directions empruntées par les fibres issues du noyau magnocellulaire dorsal mises en évidence par transport antérograde et rétrograde de traceurs "in vivo" et "in vitro".

Globalement, il est possible d'affirmer que les projections du NMD les plus souvent observées (Fig. 54) l'ont été en direction du noyau réticulaire thalamique, du thalamus médian, de l'aire hypothalamique

latérale (dans la région périfornicale principalement) et du NPV, régions dans lesquelles le marquage antérograde découvert a toujours été intense. Des fibres efférentes ont aussi été découvertes de façon beaucoup plus isolée dans la zona incerta, l'aire périventriculaire, l'hypothalamus médio-dorsal, l'hypothalamus latéro-dorsal, l'hypothalamus médio-basal et l'aire périventriculo-fornicale (en direction du noyau ventro-médian). Enfin, il faut noter que le noyau ventro-médian et le noyau arqué ne sont jamais apparus comme étant des sites de projection pour les fibres issues du NMD.

Les projections du NMD s'effectuent du côté où l'injection a été réalisée, mais aussi, dans la plupart des cas, dans les mêmes régions mais du côté opposé à l'injection. Cela signifie, comme cela a déjà été signalé, que les fibres efférentes du NMD peuvent effectuer une décussation au sein même de la tranche, en passant au dessus ou en dessous du 3^e ventricule.

La comparaison des résultats obtenus au cours de cette étude avec les données citées dans la littérature est assez difficile dans la mesure où, chez le Cobaye, il n'existe pas de description des efférences de la région renfermant le NMD. Dans les seules études neuroanatomiques réalisées sur cette espèce par ANDERSON et SHEN (1980), SHEN et ANDERSON (1980) et SHEN (1983), qui ont utilisé des techniques autoradiographiques pour démontrer les efférences respectivement de l'aire préoptique médiane, de l'aire hypothalamique antérieure médiane et de l'HL, aucune des injections de (³H) proline n'était apparemment située dans la région du NMD. De même, chez le Rat, il n'existe pas de donnée bibliographique précise concernant les projections des neurones localisés dans la région périfornicale. Nous avons cependant retenu, pour les comparer avec nos propres résultats, les résultats obtenus chez le Rat sur les projections efférentes de la région située entre le NPV et le fornix qui, topographiquement, est équivalente à la région du NMD chez le Cobaye et qui, de plus, contient le groupe de neurones enképhalinergiques décrit par KRUKOFF et CALARESU (1984), ONTENIENTE et al. (1986) et ONTENIENTE-KAH (1987). En particulier, il sera souvent fait référence aux travaux de TER HORST et LUITEN qui, dans leurs études des projections du noyau dorso-médian chez le Rat, ont réalisé des injections de traceurs antérogrades : (³H) Leucine et leuco-agglutinine de *Phaseolus vulgaris* dans la région située entre le NPV et le fornix (TER HORST et LUITEN, 1986), ainsi que

plus postérieurement et plus médialement dans la partie dorsale du noyau dorso-médian (TER HORST et LUITEN, 1987).

1) Projection vers le thalamus latéral

Les efférences du NMD au travers de l'hypothalamus latéro-dorsal en direction de la zona incerta et du thalamus latéral, en particulier vers le noyau réticulaire thalamique, ont été observées après injection "in vitro" de peroxydase mais également par d'autres techniques. Après imprégnation argentique, des fibres issues des neurones du NMD sont en effet suivies dans cette direction, au travers de l'hypothalamus latéro-dorsal, dans le cas des neurones de type II et III, résultats que nous avons également retrouvés lors des injections intracellulaires de LY sur les cellules 29 et 33.

En général, pour les injections "in vitro" de peroxydase, l'observation d'un marquage antérograde dans le noyau réticulaire thalamique du côté homolatéral et controlatéral est associée à un marquage de la zona incerta du même côté, les limites entre ces deux régions étant difficiles à définir de manière précise. Ces deux régions forment en effet une bande continue, adossée à la capsule interne, qui assure la transition entre l'hypothalamus et le thalamus latéral. On peut donc considérer que le NMD se projette vers ces deux régions et envisager que les fibres observées dans la zona incerta soient destinées à des régions plus lointaines comme le noyau réticulaire thalamique.

Une projection de la région où sont situées nos injections vers le noyau réticulaire thalamique n'a jamais été décrite de manière précise jusqu'à présent. Trois publications cependant laissent envisager chez d'autres espèces l'existence d'une projection directe de l'hypothalamus vers le noyau réticulaire thalamique. TER HORST et LUITEN (1986) montrent chez le Rat des fibres provenant de la région située entre le NPV et le fornix et se dirigeant au travers de l'hypothalamus latéro-dorsal, puis s'engageant nettement dans la zona incerta en direction du noyau réticulaire thalamique, tant du côté homolatéral à l'injection que du côté controlatéral. Chez le Chat, STERIADE et al. (1987) indiquent la présence dans l'hypothalamus antérieur et l'HL de corps cellulaires marqués après transport rétrograde de peroxydase injectée dans le noyau réticulaire thalamique. Enfin, très récemment chez la Souris, un fort contingent de fibres vasopressinergiques et ocytocinergiques, provenant du

NPV et des groupes magnocellulaires "accessoires" de la région périfornicale, a été découvert le long du noyau réticulaire thalamique, progressant dorsalement vers le striatum (CASTEL et MORRIS, 1988).

Il a été possible d'observer dans le noyau réticulaire thalamique des neurones marqués par transport rétrograde de peroxydase après injection de l'enzyme dans le NMD (Fig. 46 c, d). Cela signifie que des neurones du noyau réticulaire thalamique se projettent vers le NMD et permet donc d'envisager l'existence de relations bi-directionnelles entre les deux noyaux. L'existence de ces neurones marqués par transport rétrograde n'a pas été évoquée dans le présent mémoire. Cette observation mérite cependant d'être signalée étant donné que le noyau réticulaire thalamique diffère des autres noyaux thalamiques en ce sens que la totalité des neurones qui le composent synthétisent le GABA, chez le Rat (HOUSER et al, 1980), le Chat (OERTEL et al, 1983) et le Singe écureuil (SMITH et al, 1987). Chez cette dernière espèce, le noyau réticulaire thalamique ne présente pas de limite clairement définie avec la zone incertaine laquelle contient également une forte proportion de neurones GABAergiques. Récemment, BEAUVILLAIN et al. (1988) ont démontré chez le Cobaye, à l'échelle ultrastructurale, la riche innervation GABAergique des neurones du NMD. Ce dernier résultat, s'il est associé à nos propres observations, laisse supposer que le NMD reçoit des afférences GABAergiques originaires du noyau réticulaire thalamique. L'existence d'une projection du noyau réticulaire thalamique vers le NMD pourrait être d'un très grand intérêt fonctionnel, si l'on considère que le noyau réticulaire thalamique exerce une influence inhibitrice vis-à-vis des neurones du thalamus dorsal (STERIADE et DESCHENES, 1984), vers lesquels il se projette massivement (FRASSONI et al, 1984).

2) Projection vers le thalamus médian

Lors des injections de peroxydase dans le NMD sur tranche, des afférences en direction du noyau paraventriculaire thalamique au travers de l'hypothalamus médio-dorsal et du thalamus médian ont été observées. Ces résultats sont corroborés par les observations faites après l'imprégnation argentique des neurones de type I et II, l'injection intracellulaire de LY sur la cellule 35 et l'injection de peroxydase "in vivo" dans le NMD. En effet, les neurones marqués par ces différentes

techniques ont présenté des orientations d'axone en direction du thalamus médian.

Il faut signaler que ces efférences ont présenté un aspect remarquablement identique, c'est-à-dire un cheminement vertical, exactement dans le plan médian du thalamus au dessus du 3^e ventricule.

Chez le Rat, une projection vers le thalamus médian provenant de la région située entre le NPV et le fornix est décrite par TER HORST et LUITEN, (1986). Cette projection est composée de fibres progressant verticalement dans le plan du 3^e ventricule, en direction du noyau paraventriculaire thalamique. Dans la même espèce, HOSOYA (1985) montre par autoradiographie une projection de l'aire dorso-médiale hypothalamique vers le thalamus ventro-médian. Ces observations sont tout à fait en accord avec les résultats obtenus ici chez le Cobaye à partir du NMD. Il faut de plus ajouter que d'après CONRAD et PFAFF (1976b), BUIJS (1978) et LUITEN et al. (1985), les neurones situés dans la région du NPV se projettent massivement vers le thalamus médian chez le Rat. Pour TER HORST et LUITEN (1986), comme c'est le cas dans le présent travail, certaines fibres empruntant la direction du noyau paraventriculaire thalamique, franchissent le plan médian et se répartissent bilatéralement dans le thalamus médian.

3) Projection vers le noyau paraventriculaire

Les relations entre le NMD et le NPV homolatéral, en particulier la partie latérale magnocellulaire de celui-ci, sont difficiles à déterminer, étant donnée la proximité des deux noyaux. En effet, la région externe du NPV est en général touchée par le produit de réaction accumulé au site d'injection. Des fibres représentant un contingent assez important ont cependant été observées qui reliaient horizontalement le site d'injection et le 3^e ventricule. Il n'a jamais été possible d'affirmer à partir de ces observations si ces fibres étaient réellement destinées au NPV, bien qu'elles le traversent dans son entier au cours de leur cheminement vers le 3^e ventricule. En fait, plusieurs de ces fibres, après un changement brutal de direction, poursuivent leur trajet le long du 3^e ventricule, soit en direction de l'hypothalamus basal, soit vers le sommet du ventricule. Cette dernière observation peut être rapprochée du résultat obtenu lors de l'injection intracellulaire de LY dans la cellule 23 pour laquelle, après un trajet rectiligne au

travers du NPV, l'axone présente un brusque changement de direction vers le sommet du 3^e ventricule. Cette région située au sommet du 3^e ventricule pourrait correspondre à l'endroit où ces fibres effectuent leur décussation pour atteindre l'hypothalamus controlatéral.

TER HORST et LUITEN (1986 ; 1987) indiquent une forte accumulation de boutons terminaux issus de fibres originaires du noyau hypothalamique dorso-médian dans la partie parvicellulaire du NPV. Il est reconnu que la partie dorsale du noyau dorso-médian est en relation directe avec le NPV (LEVIN et al., 1987 ; BERNARDIS et BELLINGER, 1987). Il n'est pas possible par nos techniques de préciser si le NMD entretient avec le NPV des relations semblables. L'observation de nos préparations nous fait plutôt pencher en faveur d'une projection des fibres issues du NMD vers la région bordant le 3^e ventricule. Il a en effet été signalé que des lésions de la région du noyau hypothalamique dorso-médian provoquent la dégénérescence de fibres situées au voisinage du 3^e ventricule chez le Rat (PETROVICKY, 1967).

Dans un seul cas d'injection de peroxydase sur tranche, un marquage de la région correspondant au NPV controlatéral a été observé (T₁₅). Plutôt qu'une projection controlatérale du NMD vers le NPV, ce marquage semblait correspondre à un regroupement compact de fibres avant que celles-ci ne se dispersent dans plusieurs régions de l'hypothalamus.

4) Projection vers l'hypothalamus latéral et la région périfornicale

Des fibres ont été observées dans l'HL et la région périfornicale de façon homolatérale et controlatérale, après injection "in vitro" de peroxydase dans le NMD. Par la technique d'imprégnation argentique, une même orientation des axones a été notée (neurones de type I, II et III), ces résultats étant confirmés par les injections intracellulaires des cellules 24, 26 et 38. Enfin, après injections "in vivo" de peroxydase dans le NMD, des fibres traversant l'aire périfornicale par la face externe du fornix ont été observées de même que des fibres (en plus petit nombre) traversant cette même région mais en longeant la face interne du fornix.

TER HORST et LUITEN (1986) rapportent également l'existence dans l'HL et l'aire périfornicale homolatérale et controlatérale d'un grand nombre de fibres provenant de la région situé entre le NMD et le 3^e

ventricule. Pour ces auteurs, le cheminement préférentiel des fibres destinées à l'HL homolatéral s'effectue entre le fornix et la limite externe du noyau ventro-médian, avant de s'incurver vers l'HL. Des images semblables sont obtenues par TER HORST et LUITEN (1987) lors d'injections réalisées cette fois plus médialement dans la partie dorsale du noyau dorso-médian. D'autres fibres moins nombreuses contournent également le fornix par sa face supérieure avant de rejoindre l'HL, dorsalement (hypothalamus latéro-dorsal) et ventralement. Nos résultats confirment tout à fait ces descriptions en ce qui concerne le trajet emprunté par les fibres marquées originaires du NMD.

Par transport rétrograde de peroxydase, KITA et OOMURA (1982), ainsi que BARONE et al. (1981), décrivent aussi dans la région périfornicale et dans le noyau dorso-médian la présence de corps cellulaires qui établissent des relations directes avec l'aire hypothalamique latérale chez le Rat.

5) Projection vers la région hypothalamique périventriculaire

Un marquage important de la région périventriculaire hypothalamique, homolatérale et controlatérale, a été constaté après injection "in vitro" de peroxydase dans le NMD. Des fibres longeant le 3^e ventricule ont également été observées après des injections "in vivo" de peroxydase dans le NMD. On peut déduire de ces observations que des fibres issues du NMD se dirigent parallèlement au 3^e ventricule en direction de l'hypothalamus médio-basal. Ce résultat est en accord avec les observations de TER HORST et LUITEN (1986) et CHIBA et MURATA (1985) chez le Rat. Ces derniers auteurs soulignent l'existence de fibres marquées atteignant l'aire périventriculaire après des injections de peroxydase effectuées dans l'aire périfornicale.

6) Projection vers l'hypothalamus médio-basal

Imprégnés par la technique de GOLGI, certains axones issus des cellules de type I et III, après avoir traversé l'aire périventriculo-fornicale, présentent un trajet qui, bien que dirigé vers l'hypothalamus médio-basal, évite le noyau ventro-médian. Cette observation est remarquablement identique à celle faite lors des injections "in vivo" de peroxydase dans le NMD après lesquelles on peut suivre des fibres longeant le bord interne du noyau ventro-médian et poursuivant leur trajet

sous le 3^e ventricule. "In vitro", nous n'avons pas décrit de projection entre le NMD et le noyau ventro-médian. Cependant, des fibres originaires du NMD se dirigeant vers le noyau ventro-médian au travers de l'aire périventriculo-fornicale ont été suivies jusqu'à la limite externe de ce noyau. Cette observation rejoint la description de TER HORST et LUITEN (1986) indiquant qu'un très faible contingent de fibres issues de la région comprise entre le NPV et le fornix se termine dans le corps du noyau ventro-médian, alors qu'au contraire de nombreux boutons terminaux sont présents dans la capsule périnucléaire. Pour KITA et OOMURA (1982), quelques neurones appartenant à la région périfornicale sont marqués après transport rétrograde de peroxydase à la suite d'une injection centrée dans le corps du noyau ventro-médian chez le Rat.

De même qu'il apparaît que le NMD n'établit pas de relation clairement identifiable avec le noyau ventro-médian, tout au moins avec le corps de ce noyau, aucune de nos expériences n'a permis de démontrer une relation entre le NMD et le noyau arqué. Seule une région localisée à la base du cerveau mais latérale par rapport à ce noyau a présenté un marquage après transport antérograde de peroxydase "in vitro". Ce marquage n'a été observé que du côté controlatéral à l'injection. Cette absence de relation entre le NMD et le noyau arqué peut être rapprochée des observations rapportées par TER HORST et LUITEN (1986). Les mêmes auteurs, par une injection localisée un peu plus postérieurement (TER HORST et LUITEN, 1987), démontrent clairement que les fibres atteignant la base de l'hypothalamus sont circonscrites à l'étroite région localisée entre le noyau ventro-médian et le noyau arqué et ne sont pas observées au sein même de ce noyau.

La plupart des régions thalamiques et hypothalamiques qui viennent d'être énumérées comme recevant des projections du NMD sont décrites dans diverses espèces comme renfermant des fibres et/ou des terminaisons enképhalinerigiques.

Chez les espèces autres que le Cobaye (principalement le Rat), c'est le cas, en ce qui concerne le thalamus latéral, du noyau réticulaire thalamique (WATSON et al., 1977 ; SAR et al., 1978 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985) et de la zona incerta (SIMANTOV et al., 1977 ; WATSON et al., 1977 ; WAMSLEY et al., 1980 ;

FINLEY et al., 1981 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985), et en ce qui concerne le thalamus médian, du noyau paraventriculaire thalamique (SIMANTOV et al., 1977 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; FINLEY et al., 1981 ; PETRUSZ et al., 1985). Pour l'hypothalamus, des fibres et/ou des terminaisons enképhalinerigiques ont été localisées dans le NPV et le noyau dorso-médian (SAR et al., 1978 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985 ; PALKOVITS, 1986), dans l'aire hypothalamique latérale et l'aire périfornicale (SAR et al., 1978 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985), dans l'aire périventriculo-fornicale et le noyau ventro-médian (SAR et al., 1978 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985), dans l'aire périventriculaire (SIMANTOV et al., 1977 ; PETRUSZ et al., 1985 ; PALKOVITS, 1986), dans l'hypothalamus dorsal (WATSON et al., 1977 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985) et dans l'hypothalamus basal (SIMANTOV et al., 1977 ; SAR et al., 1978 ; STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; PALKOVITS et BROWNSTEIN, 1985 ; PETRUSZ et al., 1985 ; PALKOVITS, 1986).

Chez le Cobaye, la localisation des fibres enképhalinerigiques est beaucoup moins connue. Toutefois, pour le thalamus, STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON (1981) ainsi que TRAMU (communication personnelle) décrivent des fibres enképhalinerigiques dans le thalamus médian, et plus particulièrement dans le noyau paraventriculaire thalamique. D'autres fibres sont aussi observées par ces auteurs dans la zona incerta. Pour l'hypothalamus, l'innervation enképhalinerigique est présente dans toutes les régions (STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981 ; TRAMU, communication personnelle) à l'exception de la partie centrale du noyau ventro-médian (STENGAARD-PEDERSEN et LARSSON, 1981), ce qui semble constituer une différence importante avec le Rat. Les travaux récents de TRAMU (communication personnelle) complétant les observations de TRAMU et al. (1981) indiquent un réseau assez dense de fibres enképhalinerigiques dans le noyau paraventriculaire, une forte concentration de terminaisons dans la capsule du noyau ventro-médian, un marquage moyennement intense dans le NPV et l'aire périfornicale et enfin un marquage plus faible bien qu'indéniablement présent dans l'aire hypothalamique latérale et l'aire périventriculo-fornicale. Sans pouvoir affirmer que toutes ces régions

reçoivent leurs afférences enképhalinergiques du NMD, il faut constater que toutes les observations d'ordre immunocytochimiques réalisées chez le Cobaye corroborent parfaitement les résultats exposés dans ce travail quant aux projections des neurones du NMD.

CONCLUSIONS
GENERALES

Du fait de sa vocation radicalement neuroanatomique, cette étude a suivi deux orientations bien distinctes mais complémentaires par bien des aspects.

Dans un premier temps, les outils statistiques et informatiques nous ont permis de réaliser une partition des cellules contenues dans la région du NMD en fonction de paramètres morphologiques mesurés. Ce type de partition, bien que souvent réalisé par le passé pour de nombreuses régions du système nerveux central, n'était jusqu'à présent obtenu qu'à partir de critères visuels d'observation microscopique dépendant de l'expérimentateur. Le présent travail, outre la description morphologique des types cellulaires constituant le NMD, propose une méthode d'investigation cytoarchitecturale indépendante de l'observateur et applicable aux autres régions du système nerveux central.

La confirmation des résultats analytiques par les observations réalisées grâce à des méthodes d'investigation neuroanatomique classiques (marquage intracellulaire, marquage par transport rétrograde de peroxydase) sont des arguments en faveur de la valeur de cette méthode.

La mise en évidence à l'intérieur de la région du NMD de quatre populations cellulaires morphologiquement différentes est bien entendu liée à la technique d'imprégnation argentique. L'existence d'un (ou de plusieurs) autre(s) type(s) cellulaire(s) totalement réfractaire(s) à ce type de marquage, bien qu'improbable comme semblent le montrer nos expériences, n'est pas à écarter totalement.

Dans un second temps, ce travail a permis de préciser certaines des connexions efférentes du NMD. Là encore, la complémentarité des différentes techniques utilisées permet de démontrer sans ambiguïté possible un certain nombre de trajets de fibres efférentes. Nous pouvons donc affirmer que le NMD n'émet aucune projection efférente vers l'EM,

mais qu'il possède par contre de nombreuses relations avec des régions thalamiques et intra-hypothalamiques. En tout état de cause, il nous est impossible dans l'état actuel de nos travaux d'affirmer si ces régions thalamiques et hypothalamiques sont des zones de transit des fibres issues du NMD et/ou des lieux de terminaisons axoniques de ces mêmes fibres. La démonstration d'un tel point peut être considérée comme un travail aux perspectives intéressantes.

Enfin, nous avons pu avec certitude mettre en évidence une connection directe entre le NMD et le SL. Toutefois, là encore, bien que nous ayons démontré sans ambiguïté la décussation des axones issus du NMD (en particulier par des collatérales axoniques), le trajet emprunté par les fibres reste encore du domaine de l'hypothèse, de même que le rôle fonctionnel de l'axe NMD-SL et que l'identité des neurones du SL recevant l'innervation enképhalinergique issue de ce noyau.

ANNEXES

ANNEXE 1

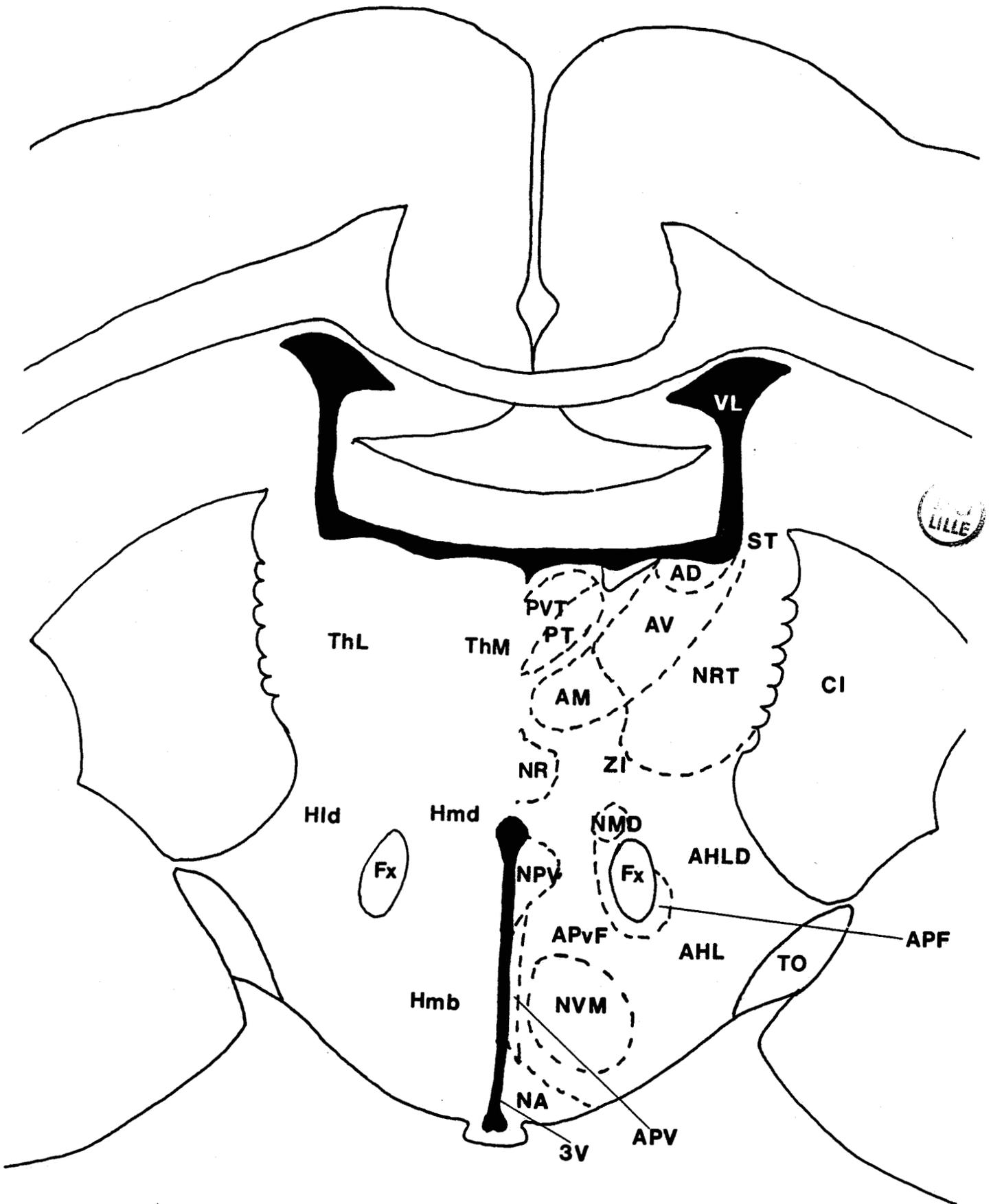
Liste des abréviations utilisées dans les figures.

ABREVIATIONS

AD	: noyau thalamique antéro-dorsal
AHA	: aire hypothalamique antérieure
AHL	: aire hypothalamique latérale
AHLD	: aire hypothalamique latéro-dorsale
AM	: noyau thalamique antéro-médian
AMYG	: amygdale
APF	: aire périfornicale
APO	: aire préoptique
APV	: aire périventriculaire
APvF	: aire périventriculo-fornicale
AV	: noyau thalamique antéro-ventral
CA	: commissure blanche antérieure
CC	: corps calleux
CI	: capsule interne
CO	: chiasma optique
DB	: tractus diagonal de Broca
EM	: éminence médiane
F	: fimbria
FMT	: faisceau médian du télencéphale
Fx	: colonne du fornix
HD	: hypothalamus dorsal
HL	: hypothalamus latéral
Hld	: hypothalamus latéro-dorsal
Hmb	: hypothalamus médio-basal
Hmd	: hypothalamus médio-dorsal
HV	: hypothalamus ventral
Hy	: hypophyse
Hyth	: hypothalamus
NA	: noyau arqué
NLST	: noyau du lit de la strie terminale
NMD	: noyau magnocellulaire dorsal
NPV	: noyau paraventriculaire hypothalamique
NPVa	: noyau paraventriculaire hypothalamique accessoire
NPVm	: noyau paraventriculaire hypothalamique, pars magnocellularis
NPVp	: noyau paraventriculaire hypothalamique, pars parvicellularis
NR	: noyau reuniens
NRT	: noyau réticulaire thalamique
NVM	: noyau ventro-médian
POM	: aire préoptique médiane
PT	: noyau parataenial thalamique
PVT	: noyau paraventriculaire thalamique
rs	: recessus infundibulaire
SLd	: septum latéral dorsal
SLi	: septum latéral intermédiaire
SLv	: septum latéral ventral
SM	: septum médian
ST	: strie terminale
TH	: thalamus
ThL	: thalamus latéral
ThM	: thalamus médian
TO	: tractus optique
3V	: troisième ventricule
VL	: ventricule latéral
ZI	: zona incerta

ANNEXE 2

Subdivisions du thalamus et de l'hypothalamus utilisées dans le texte et les figures.



ANNEXE 3

Limites supérieures de signification de la distribution F de FISCHER
pour $P = 0,01$ (1%)

- $P = P$ (droite) = intégrale entre F et l'infini

- ν_1 = degré de liberté $Np + Nq - n - 1$

- ν_2 = degré de liberté n

d'après VAN DER WAERDEN, B.I., Mathematische Statistik, Springer, Berlin,
1957, p. 340.

ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	22	24	26	28	30	40	50	60	80	100	∞			
98.50	99.0	99.2	99.3	99.3	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5		
34.12	30.8	29.5	28.7	28.2	27.9	27.7	27.5	27.3	27.2	27.1	27.1	27.1	27.0	26.9	26.9	26.8	26.8	26.7	26.7	26.6	26.6	26.6	26.6	26.5	26.5	26.4	26.4	26.3	26.3	26.2	26.1		
21.20	18.0	16.7	16.0	15.5	15.2	15.0	14.8	14.7	14.5	14.4	14.4	14.3	14.3	14.2	14.2	14.2	14.1	14.0	14.0	13.9	13.9	13.9	13.9	13.8	13.7	13.7	13.7	13.6	13.6	13.5	13.5		
16.26	13.3	12.1	11.4	11.0	10.7	10.5	10.3	10.2	10.1	9.9	9.9	9.8	9.8	9.7	9.7	9.6	9.6	9.5	9.5	9.5	9.5	9.4	9.4	9.4	9.3	9.2	9.2	9.2	9.1	9.1	9.0	9.0	
13.75	10.9	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.66	7.60	7.56	7.52	7.48	7.45	7.42	7.40	7.35	7.31	7.28	7.25	7.23	7.14	7.09	7.06	7.01	6.99	6.98	6.88	6.88	
12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.41	6.36	6.31	6.27	6.24	6.21	6.18	6.16	6.11	6.07	6.04	6.02	5.99	5.91	5.86	5.82	5.78	5.75	5.65	5.65	5.65	
11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.61	5.56	5.52	5.48	5.44	5.41	5.38	5.36	5.32	5.28	5.25	5.22	5.20	5.12	5.07	5.03	4.99	4.96	4.86	4.86	4.86	
10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.05	5.00	4.96	4.92	4.89	4.86	4.83	4.81	4.77	4.73	4.70	4.67	4.65	4.57	4.52	4.48	4.44	4.42	4.31	4.31	4.31	
10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.65	4.60	4.56	4.52	4.49	4.46	4.43	4.41	4.36	4.33	4.30	4.27	4.25	4.17	4.12	4.08	4.04	4.01	3.91	3.91	3.91	
9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.34	4.29	4.25	4.21	4.18	4.15	4.12	4.10	4.06	4.02	3.99	3.96	3.94	3.86	3.81	3.78	3.73	3.71	3.60	3.60	3.60	
9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.10	4.05	4.01	3.97	3.94	3.91	3.88	3.86	3.82	3.78	3.75	3.72	3.70	3.62	3.57	3.54	3.49	3.47	3.36	3.36	3.36	
9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.91	3.86	3.82	3.78	3.75	3.72	3.69	3.66	3.62	3.59	3.56	3.53	3.51	3.43	3.38	3.34	3.30	3.27	3.17	3.17	3.17	
8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.75	3.70	3.66	3.62	3.59	3.56	3.53	3.51	3.46	3.43	3.40	3.37	3.35	3.27	3.22	3.18	3.14	3.11	3.00	3.00	3.00	
8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.61	3.56	3.52	3.49	3.45	3.42	3.40	3.37	3.33	3.29	3.26	3.24	3.21	3.13	3.08	3.05	3.00	2.98	2.87	2.87	2.87	
8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.50	3.45	3.41	3.37	3.34	3.31	3.28	3.26	3.22	3.18	3.15	3.12	3.10	3.02	2.97	2.93	2.89	2.86	2.75	2.75	2.75	
8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.40	3.35	3.31	3.27	3.24	3.21	3.18	3.16	3.12	3.08	3.05	3.03	3.00	2.92	2.87	2.83	2.79	2.76	2.65	2.65	2.65	
8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.32	3.27	3.23	3.19	3.16	3.13	3.10	3.08	3.03	3.00	2.97	2.94	2.92	2.84	2.78	2.75	2.70	2.68	2.57	2.57	2.57	
8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.24	3.19	3.15	3.12	3.08	3.05	3.03	3.00	2.96	2.92	2.89	2.87	2.84	2.76	2.71	2.67	2.63	2.60	2.49	2.49	2.49	
8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.18	3.13	3.09	3.05	3.02	2.99	2.96	2.94	2.90	2.86	2.83	2.80	2.78	2.69	2.64	2.61	2.56	2.54	2.42	2.42	2.42	
8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.12	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.88	2.86	2.82	2.78	2.75	2.72	2.70	2.62	2.57	2.54	2.49	2.47	2.36	2.36	2.36	
7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.07	3.02	2.97	2.93	2.89	2.86	2.83	2.80	2.78	2.74	2.70	2.67	2.64	2.56	2.51	2.48	2.43	2.42	2.31	2.31	2.31	
7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	3.02	2.97	2.92	2.88	2.84	2.81	2.78	2.76	2.72	2.68	2.65	2.62	2.54	2.48	2.44	2.40	2.35	2.30	2.26	2.19	2.19	2.19
7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.98	2.93	2.89	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.70	2.66	2.63	2.60	2.58	2.49	2.44	2.40	2.35	2.30	2.26	2.19	2.19	2.19
7.77	5.57	4.68	4.18	3.86	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.94	2.89	2.84	2.80	2.77	2.74	2.71	2.68	2.64	2.60	2.57	2.54	2.52	2.44	2.41	2.33	2.27	2.23	2.19	2.19	2.19	
7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.90	2.85	2.80	2.76	2.73	2.70	2.67	2.64	2.60	2.56	2.53	2.50	2.48	2.40	2.36	2.32	2.29	2.25	2.21	2.17	2.17	2.17
7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.87	2.82	2.78	2.75	2.71	2.68	2.66	2.62	2.58	2.55	2.52	2.49	2.47	2.38	2.33	2.29	2.25	2.22	2.18	2.18	2.18	2.18
7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.84	2.79	2.75	2.72	2.68	2.65	2.63	2.59	2.56	2.52	2.49	2.46	2.44	2.35	2.30	2.26	2.22	2.19	2.16	2.16	2.16	2.16
7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.81	2.77	2.73	2.69	2.66	2.63	2.60	2.57	2.53	2.49	2.46	2.44	2.41	2.33	2.27	2.23	2.19	2.16	2.16	2.16	2.16	
7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.79	2.74	2.70	2.66	2.63	2.60	2.57	2.55	2.51	2.47	2.44	2.41	2.39	2.30	2.25	2.21	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	
7.52	5.34	4.46	3.97	3.65	3.43	3.26	3.13	3.02	2.93	2.86	2.80	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.55	2.52	2.49	2.46	2.42	2.39	2.36	2.34	2.25	2.20	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	2.16	
7.44	5.29	4.42	3.93	3.61	3.39	3.22	3.09	2.98	2.89	2.82	2.76	2.70	2.66	2.62	2.58	2.55	2.51	2.49	2.46	2.42	2.38	2.35	2.32	2.30	2.21	2.16	2.12	2.08	2.03	2.00	1.91	1.91	1.91
7.40	5.25	4.38	3.89	3.57	3.35	3.18	3.05	2.95	2.86	2.79	2.72	2.67	2.62	2.58	2.54	2.51	2.48	2.45	2.43	2.38	2.35	2.32	2.29	2.26	2.17	2.12	2.08	2.03	2.00	1.87	1.87	1.87	
7.35	5.21	4.34	3.86	3.54	3.32	3.15	3.02	2.92	2.83	2.75	2.69	2.64	2.59	2.55	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.35	2.32	2.28	2.26	2.23	2.14	2.09	2.05	2.00	1.97	1.84	1.84	1.84	
7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.61	2.56	2.52	2.48	2.45	2.42	2.39	2.37	2.33	2.29	2.26	2.23	2.20	2.11	2.06	2.02	1.97	1.94	1.80	1.80	1.80	
7.28	5.15	4.29	3.80	3.47	3.25	3.08	2.95	2.86	2.78	2.70	2.64	2.59	2.54	2.50	2.46	2.43	2.40	2.37	2.34	2.30	2.26	2.23	2.20	2.18	2.09	2.03	1.99	1.94	1.91	1.78	1.78	1.78	
7.25	5.12	4.26	3.78	3.47	3.24	3.08	2.95	2.84	2.75	2.68	2.62	2.56	2.52	2.47	2.44	2.40	2.37	2.35	2.32	2.28	2.24	2.21											

ANNEXE 4

Limites supérieures de signification de la distribution F de FISCHER
pour $P = 0,05$ (5%)

- $P = P$ (droite) = intégrale entre F et l'infini

- ν_1 = degré de liberté $Np + Nq - n - 1$

- ν_2 = degré de liberté n

d'après VAN DER WAERDEN, B.I., Mathematische Statistik, Springer, Berlin,
1957, p. 340.

Yr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	26	28	30	30	40	50	60	80	100		
1	161.44	200	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	246	246	246	247	247	248	248	249	249	249	250	250	251	252	252	253	253	254		
2	18.51	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.73	8.71	8.70	8.69	8.68	8.67	8.67	8.66	8.65	8.64	8.63	8.62	8.62	8.59	8.58	8.57	8.56	8.55	8.53	8.53	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.89	5.87	5.86	5.84	5.83	5.82	5.81	5.80	5.79	5.77	5.76	5.75	5.75	5.72	5.70	5.69	5.67	5.66	5.63	5.63	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.66	4.64	4.62	4.60	4.59	4.58	4.57	4.56	4.54	4.53	4.52	4.50	4.50	4.46	4.44	4.43	4.41	4.41	4.36	4.36	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.11	4.06	4.03	4.00	3.98	3.96	3.94	3.92	3.91	3.90	3.88	3.87	3.86	3.84	3.83	3.82	3.81	3.77	3.75	3.74	3.72	3.71	3.67	3.67	3.63
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.55	3.53	3.51	3.49	3.48	3.47	3.46	3.44	3.43	3.41	3.40	3.39	3.38	3.34	3.32	3.30	3.29	3.27	3.23	3.23	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.26	3.24	3.22	3.20	3.19	3.17	3.16	3.15	3.13	3.12	3.10	3.09	3.08	3.04	3.02	3.01	2.99	2.97	2.93	2.93	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.05	3.03	3.01	2.99	2.97	2.96	2.95	2.94	2.92	2.90	2.89	2.87	2.86	2.82	2.80	2.79	2.77	2.76	2.71	2.71	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.89	2.86	2.85	2.83	2.81	2.80	2.78	2.77	2.75	2.74	2.72	2.70	2.69	2.66	2.64	2.62	2.60	2.59	2.54	2.54	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.72	2.70	2.69	2.67	2.66	2.65	2.63	2.61	2.59	2.58	2.57	2.53	2.51	2.49	2.47	2.46	2.40	2.40	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.66	2.64	2.62	2.60	2.58	2.57	2.56	2.54	2.52	2.51	2.49	2.48	2.47	2.43	2.40	2.38	2.36	2.35	2.30	2.30	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.58	2.55	2.53	2.51	2.50	2.48	2.47	2.46	2.44	2.42	2.41	2.39	2.38	2.34	2.31	2.29	2.27	2.26	2.21	2.21	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.48	2.46	2.44	2.43	2.41	2.40	2.39	2.37	2.35	2.33	2.32	2.31	2.27	2.24	2.22	2.20	2.19	2.13	2.13	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.38	2.37	2.35	2.34	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26	2.25	2.21	2.18	2.16	2.14	2.12	2.07	2.07	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.40	2.37	2.35	2.33	2.32	2.30	2.29	2.28	2.26	2.24	2.22	2.21	2.19	2.15	2.12	2.10	2.08	2.07	2.01	2.01	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.35	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26	2.24	2.23	2.21	2.19	2.17	2.16	2.15	2.10	2.08	2.06	2.03	2.02	1.96	1.96	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.31	2.29	2.27	2.25	2.23	2.22	2.20	2.19	2.17	2.15	2.13	2.12	2.11	2.06	2.04	2.02	1.99	1.98	1.92	1.92	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.21	2.19	2.18	2.17	2.16	2.14	2.12	2.11	2.10	2.08	2.07	2.03	2.00	1.98	1.95	1.94	1.88	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.17	2.15	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07	2.05	2.04	1.99	1.97	1.95	1.92	1.91	1.84	1.84	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.16	2.14	2.12	2.11	2.10	2.07	2.05	2.04	2.02	2.01	1.96	1.94	1.92	1.89	1.88	1.81	1.81	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.20	2.17	2.15	2.13	2.11	2.10	2.08	2.07	2.05	2.03	2.01	2.00	1.98	1.94	1.91	1.88	1.87	1.76	1.76	1.76	1.76
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.23	2.20	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.07	2.06	2.05	2.02	2.00	1.99	1.97	1.96	1.91	1.88	1.86	1.84	1.82	1.76	1.76	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.21	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04	2.03	2.00	1.98	1.97	1.95	1.94	1.89	1.87	1.84	1.82	1.80	1.73	1.73	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.14	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04	2.02	2.01	1.98	1.96	1.95	1.93	1.92	1.87	1.84	1.82	1.80	1.78	1.71	1.71	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.12	2.09	2.07	2.05	2.03	2.02	2.00	1.99	1.97	1.95	1.93	1.92	1.87	1.84	1.82	1.80	1.78	1.71	1.71	1.71	1.71
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.30	2.25	2.20	2.17	2.13	2.10	2.08	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97	1.95	1.93	1.91	1.90	1.88	1.84	1.81	1.79	1.76	1.74	1.69	1.69	1.69
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.09	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99	1.97	1.96	1.93	1.91	1.90	1.88	1.87	1.82	1.79	1.77	1.74	1.73	1.65	1.65	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.08	2.05	2.03	2.01	1.99	1.98	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88	1.87	1.85	1.81	1.77	1.75	1.73	1.71	1.64	1.64	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.06	2.04	2.01	1.99	1.98	1.96	1.95	1.93	1.91	1.89	1.87	1.85	1.84	1.79	1.76	1.74	1.71	1.70	1.61	1.61	1.61
31	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14	2.10	2.07	2.04	2.01	1.99	1.97	1.95	1.94	1.92	1.91	1.88	1.86	1.84	1.82	1.80	1.75	1.71	1.69	1.67	1.59	1.59	1.59	
32	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	2.02	1.99	1.97	1.95	1.93	1.92	1.90	1.89	1.86	1.84	1.82	1.80	1.78	1.73	1.69	1.66	1.65	1.57	1.57	1.57	
33	4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.11	2.07	2.03	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	1.90	1.88	1.87	1.85	1.82	1.81	1.79	1.78	1.73	1.69	1.67	1.64	1.62	1.55	1.55	1.55
34	4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09	2.05	2.02	1.99	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88	1.86	1.85	1.83	1.81	1.79	1.77	1.76	1.71	1.68	1.65	1.62	1.61	1.54	1.54	1.54
35	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.97	1.95	1.92	1.90	1.88	1.86	1.84	1.83	1.81	1.79	1.77	1.75	1.74	1.69	1.66	1.63	1.60	1.58	1.54	1.54	1.54
36	4.07	3.22	2.83	2.59	2.44	2.32	2.24																										

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS J.C. 1977. Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as a neuronal marker. Neuroscience, 2:141-145.
- ADAMS J.C., WARR W.B. 1976. Origins of axons in the cat's acoustic striae determined by injection of horseradish peroxidase into severed tracts. J. Comp. Neurol., 170:107-122.
- AHLSSEN G. 1981. Retrograde labeling of retinogeniculate neurones in the cat by HRP uptake from the diffuse injection zone. Brain Res., 223(2):374-380.
- ALHEID G.F., CARLSEN J. 1982. Small injections of fluorescent by iontophoresis or chronic implantation of micropipettes. Brain Res., 235:174-178.
- ALONSO G., ASSENMACHER I. 1978. Electron microscopic study of the orthograde axonal transport of horseradish peroxidase in the supraopticoneurohypophysial tract of the rat. Cell Tissue Res., 194:525-531.
- AMTHOR F.R. 1984. A modified slurry beveler for HRP-filled intracellular micropipettes. J. Electrophysiol. Tech., 11:79-86.
- ANDERSON C.H., SHEN C.L. 1980. Efferents of the medial preoptic area in the guinea-pig. An autoradiographic study. Brain Res. Bull., 5:257-265.
- ANDERSON P.N., MITCHELL J., MAYOR D. 1979. The uptake of horseradish peroxidase by damaged autonomic nerves in vitro. J. Anat., 128:401-406.
- ANSCHER S., ALEXANDER M., PERACHIO A.A. 1982. Multiple connections of medial hypothalamic neurons in the rat. Exp. Brain Res., 46:383-392.
- ARBUTHNOTT G.W., WRIGHT A.K., HAMILTON M.H., BROWN J.R. 1982. Orthograde transport of nuclear yellow: a problem and its solution. J. Neuroscience Methods, 6:365-368.
- ARENDT T., ZVEGINTSEVA H.G., LEONTOVICH T.A. 1986. Dendritic changes in the basal nucleus of Meynert and the diagonal band nucleus in Alzheimer's disease. A quantitative golgi investigation. Neuroscience, 19:1265-1278.
- ARMSTRONG W.E., HATTON G.I. 1980. The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophysial injections of HRP. Brain Res. Bull., 5:473-477.
- ARMSTRONG W.E., WARACH S., HATTON G.I., Mac NEILL T.H. 1980. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. Neuroscience, 5:1931-1958.
- ASCHOFF A., HOLLANDER H. 1982. Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). I: a parametric study in the central visual system of the albino rat. J. Neuroscience Methods, 6:179-197.
- BALIN B.J., BROADWELL R.D., SALCMAN M., EL-KALLINY M. 1986. Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. J. Comp. Neurol., 251:260-280.
- BARONE F.C., WAYNER M.J., SCHAROUN S.L., GUEVARA-AGUILAR R., AGUILAR-BATURONI H.U. 1981. Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat. Brain Res. Bull., 7:75-88.
- BARRET J.N., CRILL W.E. 1974. Specific membrane properties of cat motoneurons. J. Physiol. (Lond.), 239:301-324.

- BARRY J. 1972. Etude neurohistologique des cellules réticulaires de l'hypothalamus de mammifères. C.R. Acad. Sci. Paris, 275:1163-1165.
- BARRY J. 1975. Essai de classification, en technique de Golgi, des diverses catégories de neurones du noyau paraventriculaire chez la souris. C. R. Soc. Biol., 4:978-980.
- BARRY J., DUBOIS M.P., POULAIN P. 1973. LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. Z. Zellforsch Mikrosk Anat., 146:351-366.
- BEAUVILLAIN J.C., MITCHELL V., TRAMU G., MAZZUCA M. 1988. GABA axon terminals in synaptic contact with enkephalin neurons in the hypothalamus of the guinea-pig. Demonstration by double immunocytochemistry. Brain Res., 443:315-320.
- BEAUVILLAIN J.C., POULAIN P., TRAMU G. 1983. Immunocytochemical localization of enkephalin in the lateral septum of the guinea-pig brain. A light- and electron-microscopic study. Cell Tissue Res., 228:265-276.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G., CROIX D. 1980. Electron microscopic localization of enkephalin in the median eminence and the adenohypophysis of the guinea-pig. Neuroscience, 5:1705-1716.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G., GARAUD J.C. 1984. Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence : demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. Brain Res., 301:389-393.
- BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G., POULAIN P. 1982. Enkephalin immunoreactive neurones in the guinea-pig hypothalamus. An ultrastructural study. Cell Tissue Res., 224:1-13.
- BEITZ A.J. 1982. The nuclei of origin of brain stem enkephalin and substance P projections to the rodent nucleus raphe magnus. Neuroscience, 7:2753-2768.
- BENTIVOGLIO M., KUYPERS H.G.J.M., CATSMAN-BERREVOETS C.E. 1980b. Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzimidazole and nuclear yellow (Hoechst S 769121) measures to prevent diffusion of the tracers out of retrograde y labeled neurons. Neurosci. Lett., 18:19-24.
- BENTIVOGLIO M., KUYPERS H.G.J.M., CATSMAN-BERREVOETS C.E., DANN O. 1979a. Fluorescent retrograde neuronal labeling in rat by means of substances binding specifically to adenine-thymine rich DNA. Neurosci. Lett., 12:235-240.
- BENTIVOGLIO M., KUYPERS H.G.J.M., CATSMAN-BERREVOETS C.E., LOEWE H., DANN O. 1980a. A two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances. Neurosci. Lett., 18:25-30.
- BENTIVOGLIO M., VAN DER KOOY D, KUYPERS H.G.J.M. 1979b. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. Brain Res., 174:1-17.
- BENZECRI J.P. et al. 1984. L'Analyse des données ; tome 1 : La Taxinomie. Dunod Ed. Paris.
- BERK M.L., FINKELSTEIN J.A. 1982. Efferent connections of the lateral hypothalamic area of the rat an autoradiographic investigation. Brain Res. Bull., 8:511-526.
- BERNARDIS L.L., BELLINGER L.L. 1987. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited : 1986 update. Brain Res. Rev., 12:321-381.
- BERNARDO K.L., MA P.M., WOOLSEY T.A. 1986. In vitro labeling of axonal projections in the mammalian central nervous system. J. Neuroscience Methods, 16:89-101.
- BERNARDO K.L., WOOLSEY T.A. 1987. Axonal trajectoires between mouse somatosensory thalamus and cortex. J. Comp. Neurol., 258:542-564.

- BLEIER R. 1983. The hypothalamus of the guinea-pig : a cytoarchitectonic atlas. The University of Wisconsin Press.
- BLOOM F.E., BATTENBERG E.L.F., RIVIER J., VALE W. 1982. Corticotropin releasing factor (CRF) : immunoreactive neurons and fibers in rat hypothalamus. Reg. Peptides, 4:43-48.
- BLUME H.W., PITMANN Q.J., LAFONTAINE S., RENAUX L.P. 1982. Lateral septum- medial hypothalamic connections : an electrophysiological study in the rat. Neuroscience, 7:2783-2792.
- BOITARD M. 1978. Applications des méthodes d'analyses multidimensionnelles à l'étude de Populations du complexe Jaera albifrons (Isopodes, Asellotes). Thèse de Doctorat d'Université, Université Paris VI, 116 pp.
- BONNET L. 1964. Le peuplement thécamoebien des sols. Rev. Ecol. Biol. Sol : I,2:123-408.
- BOWKER H.W., STEINBUSCH H.W.M., COULTER J.D. 1981. Serotonergic and peptidergic projections to the spinal cord demonstrated by combined retrograde HRP histochemical and immunocytochemical staining method. Brain Res., 211:412-417.
- BRANN M.R., EMSON P.C. 1980. Microiontophoretic injection of fluorescent tracer combined with simultaneous immunofluorescent histochemistry of the demonstration of efferents from the caudate-putamen projecting to the globus pallidus. Neurosci. Lett., 16:61-65.
- BRAS H., GOGAN P., TYC-DUMONT S. 1987. The dendrites of single brain-stem motoneurons intracellularly labelled with horseradish peroxidase in the cat. Morphological and electrical differences. Neuroscience, 22:947-970.
- BROADWELL R.D., BRIGHTMAN M.W. 1976. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. J. Comp. Neurol., 166:257-284.
- BROADWELL R.D., BRIGHTMAN M.W. 1979. Cytochemistry of undamaged neurons transporting exogenous protein in vivo. J. Comp. Neurol., 185:31-74.
- BROADWELL R.D., BRIGHTMAN M.W. 1983. Horseradish peroxidase : a tool to study the neuroendocrine cell and other peptide secreting cells. Methods Enzymol., 103:187-218.
- BUGNON C., FELLMANN D., GOUGET A., CARDOT J. 1982. Mise en évidence immunocytochimique du système neuroglandulaire à CRF dans l'hypothalamus du Rat. C.R. Acad. Sci., Paris, 294:279-284.
- BUIJS R.M. 1978. Intra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata spinal cord. Cell Tissue Res., 192:423-435.
- CARETTE B. 1978. A new method of manufacturing multi-barelled micropipettes with projecting recording barrel. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 44:248-250.
- CARETTE B., POULAIN P. 1982. Postsynaptic inhibitory effects of met- and leu-enkephalin on endocrine and adjacent neurones in the preoptic-septal region of the guinea-pig. Regul. Peptides, 3:125-133.
- CASTEL M., MORRIS J.F. 1988. The neurophysin-containing innervation of the forebrain of the mouse. Neuroscience, 24:937-966.
- CAVADA C., HUISMAN A.M., KUYPERS H.G.J.M. 1984. Retrograde double labeling of neurons : the combined use of horseradish peroxidase and diamidino yellow dihydrochloride (DY:2HCl) compared with true blue and DY:2HCl in rat descending brainstem pathways. Brain Res., 308:123-136.
- CESARO P., NGUYEN-LEGROS J., BERGER B., ALVAREZ C., ALBE-FESSARD D. 1979. Double labeling of branched neurons in the central nervous system of the rat by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and iron dextran complex. Neurosci. Lett., 15:1-7.

- CHANDON J.L., PINSON S. 1981. Analyse typologique. Théories et applications. Masson Ed. Paris.
- CHIBA T., MURATA Y. 1985. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. Brain Res. Bull., 14:264-272.
- COLMAN D.R., SCALIA F., CABRALES E. 1976. Light and electron microscopic observations on the anterograde transport of horseradish peroxidase in the optic pathway in the mouse and rat. Brain Res., 102:156-163.
- CONDE F. 1987. Further studies on the use of the fluorescent tracers fast blues and diaminidino yellow effective uptake area and cellular storage sites. J. Neuroscience Methods, 21:31-43.
- CONRAD L.C.A., PFAFF D.W. 1976a. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat: I An autoradiographic study of the medial preoptic area. J. Comp. Neur., 169:185-220.
- CONRAD L.C.A., PFAFF W.W. 1976b. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat: II An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. J. Comp. Neur., 169:221-262.
- COOKE C.T., CAMERON P.U., JONES D.G. 1975. Stimulation-induced uptake of horseradish peroxidase by rat cortical synapses. Neurosci. Lett., 1:15-18.
- COOLEY V.W., LOHNES P.R. 1971. Multivariable data analysis. John Wiley Ed. London.
- COONS A.H. 1978. Fluorescent antibody methods. In "General Cytochemical Methods", Danielli J.F. Ed. Academic, New-York, 399-422.
- CROSS B.A., DYER R.G. 1971. Unit activity in rat diencephalic islands: the effect of anesthetics. J. Physiol. (Lond.), 212:467-481.
- CRUTCHER K.A., MADISON R., DAVIS J.N. 1981 A study of the rat septo-hippocampal pathway using anterograde transport of horseradish peroxidase. Neuroscience, 6:1961-1973.
- DAIKOKU S., OKAMURA Y., KAWANO H., TSURUO Y., MAEGAWA M., SHIBASAKI T. 1985. CRF-containing neurons of the rat hypothalamus. Cell Tissue Res., 240:575-584.
- DALSGAARD C.J., HOKFELT T., ELFVIN L.G., TERENIUS L. 1982. Enkephalin-containing sympathetic preganglionic neurons projecting to the inferior mesenteric ganglion: evidence from combined retrograde tracing and immunohistochemistry. Neuroscience, 7:2039-2050.
- DEOLMOS J.S., HARDY H., HEIMER L. 1978. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP study. J. Comp. Neurol., 181:213-244.
- EISENMAN L.M. 1985. Uptake of the retrograde fluorescent tracer fast blue from the cerebrospinal fluid of the rat. Neurosci. Lett., 60:241-246.
- EKSTROM P. 1985. Anterograde and retrograde filling of central neuronal systems with horseradish peroxidase under in vitro conditions. J. Neuroscience Methods, 15:21-35.
- FABRE A., GUERRIER G. 1980. Analyse factorielle en composantes principales de données climatologiques dans les Pyrénées Orientales. Vie Milieu, 30:105-111.
- FINLEY J.C.W., MADERDRUT J.L., PETRUSZ P. 1981. The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. J. Comp. Neurol., 198:541-565.
- FISHER R.A. 1938. The statistical utilization of multiple measurements. Ann. Engen., London, 8:376.
- FOUCART T. 1982. Analyse factorielle. Programmation sur micro-ordinateurs. Masson Ed. Paris.

- FRASSONI C., SPREAFICO R., BATTAGLIA G. 1984. Afferent and efferent connections of the nucleus reticularis thalami of the rat : an HRP study. Neurosci. Lett., suppl. 18,S 51.
- FUJII S., SENBA E., KIYAMA H., UEDA Y., TOHYAMA M. 1987. Mammillothalamic enkephalinergic pathway in the rat : an immunocytochemical analysis. Brain Res., 401:1-8.
- FULLER J.H., SCHLAG J.D. 1976. Determination of antidromic excitation by the collision test : problems of interpretation. Brain Res., 112:283-298.
- GABE M. 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie Eds. Paris.
- GALL C., MOORE R.Y. 1984. Distribution of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase, and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. J. Comp. Neurol., 225:215-227.
- GARRIS D.R. 1979. Direct septo-hypothalamic projections in the rat. Neurosci. Lett., 13:83-90.
- GERFEN C.R., SAWCHENKO P.E. 1984. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals : immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). Brain Res., 290:219-238.
- GERHARD L. 1966. Atlas des Mittel- und Zwischenhirns des Kaninchens. Springer Ed. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- GOLGI C. 1873. Sulla struttura delle sostanza grigia del cervello. Gazz. Med. ital. Lombarda, 33:244-246.
- GRACE A.A., LLINAS R. 1985. Morphological artefacts induced in intracellularly stained neurons by dehydration : circumvention using rapid dimethyl sulfoxide cleaning. Neuroscience, 2:461-475.
- 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 J.A., MAC NAUGHTON N. 1983. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesion : a review. Neurosci. Behav. Rev., 7:119-188.
- GRIFFIN G., WATKINS L.R., MAYER D.J. 1979. HRP pellets and slow-release gels : two new techniques for greater localization and sensitivity. Brain Res., 168:595-601.
- GUILLERY R.W. 1957. Degeneration in the hypothalamic connexions of the albino rat. J. Anat., 91:91-115.
- GUTNICK M.J., LOBEL-YAAKOV R., RIMON G. 1985. Incidence of neuronal dye-coupling in neocortical slices depends on the plane of section. Neuroscience, 15:659-666.
- HAGINO N., KOSARAS B., FLERKO B. 1977. Septal projection to the arcuate nucleus of the hypothalamus. Acta. Biol. Acad. Sci. Hung., 28:235-238.
- HAGINO N., YAMAOKA S. 1976. A neuroendocrinological approach to the investigation of septum. In "The Septal Nuclei", De France J.F. Ed., Plenum Press. New-York, London, 283-334.
- HARDY M., HEIMER L. 1977. A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde and anterograde axonal transport of HRP. Neurosci. Lett., 5:235-240.
- HISANO S., DAIKOKU S., YANAIHARA N., SHIBASAKI T. 1986. Intragranular colocalization of CRF and Med-Enk-8 in nerve terminals in the rat median eminence. Brain Res., 370:321-326.

- HOKFELT T., ELDE R., JOHANSSON O., TERENIUS L., STEIN L. 1977. The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. Neurosci. Lett., 5:25-31.
- HOKFELT F., FAHRENKRUG J., TATEMOTO K., MUTT V., WERNER S., HULTING A.L., TERENIUS L., CHANG K.J. 1983a. 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., SKAGERBERG G., SKIRBOLL L., BJORKLUND A. 1983b. Combination of retrograde tracing and neurotransmitter histochemistry. In "Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 1 : Methods in Chemical Neuroanatomy", Björklund A., Hökfelt T. Eds., Elsevier, Amsterdam, New-York, Oxford, 228-285.
- HOKFELT T., TERENIUS L., KUYPERS H.G.J.M., DANN O. 1979. Evidence for enkephalin immunoreactive neurons in the medulla oblongata projecting to the spinal cord. Neurosci. Lett., 14:55-60.
- HOSOYA Y. 1985. Hypothalamic projections to the ventral medulla oblongata in the rat, with special reference to the nucleus raphe pallidus : a study using autoradiographic and HRP techniques. Brain Res., 344:338-350.
- HOTELLING H. 1933. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. J. Educ. Psychol., 24:417-441 et 498-520.
- HOUSER C.R., VAUGHN J.E., BARBER R.P., ROBERTS E. 1980. GABA neurons are the major cell type of the nucleus reticularis thalami. Brain Res., 200 2:351-354.
- HUGHES J., SMITH T.W., KOSTERLITZ H.W., FOTHERGILL L.A., MORGAN B.A., MORRIS H.R. 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature, 258:577-579.
- HUMBERTSON A.O.Jr, KIRK W.T. 1983. A method for injecting small amounts of dry fluorescent tracers into the nervous system. Anat. Rec., 205:87 A.
- IBANEZ F. 1973. Méthode d'analyse spatio-temporelle du processus d'échantillonnage en planctonologie, son influence dans l'interprétation des données par l'analyse en composantes principales. Ann. Inst. Oceanogr., 49:83-111.
- IBANEZ F. 1975. Contribution à l'analyse mathématique des événements en écologie planctonique : optimisation méthodologique, étude expérimentale en continu à petite échelle de l'hétérogénéité du plancton côtier. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles. Université de Paris VI, 176pp.
- ILLERT M., FRITZ N., ASCHOFF A., HOLLANDER H. 1982. Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). II. a parametric study in the peripheral motor system of the cat. J. Neuroscience Methods, 6:199-218.
- IVERSEN L.L., IVERSEN S.D., BLOOM F.E. 1980. Opiate receptors influence vasopressin release from nerve terminals in rat neurohypophysis. Nature, 284:350-351.
- JAMBU M. 1978. Classification automatique pour l'analyse des données, tome 1 : Méthodes et algorithmes. Dunod Ed., Paris.
- JAMBU M. LEBEAUX M.O. 1978. Classification automatique pour l'analyse des données, tome 2 : logiciels. Dunod Ed., Paris.
- JENNES L., STUMPF W.E. 1986. Gonadotropin-releasing hormone immunoreactive neurons with access to fenestrated capillaries in mouse brain. Neuroscience, 18:403-416.
- KATAN S., GOTTSCHALL J., NEUHUBER W. 1982. Simultaneous visualization of horseradish peroxidase and nuclear yellow in tissue sections for neuronal double labeling. Neurosci. Lett., 28:121-126.

- KEEFER D.A. 1978. Horseradish peroxidase as a retrogradely-transported, detailed dendritic marker. Brain Res., 140:15-32.
- KEEFER D.A., CHUNG J.W., HEIMER L. 1980. Morphology and ultrastructure of anterior thalamic neurons solidly labeled with horseradish peroxidase. Brain Res., 191:301-311.
- KENDRICK K.M. 1983. Effect of testosterone on medial preoptic/anterior hypothalamic neurone responses to stimulation of the lateral septum. Brain Res., 262:136-142.
- KERSHAW K.A. 1973. Quantitative and dynamic plant ecology. Arnold Ed., London.
- KEY B., GIORGI P.P. 1987. Uptake and axonal transport of horseradish peroxidase isoenzymes by different neuronal types. Neuroscience, 22:1135-1144.
- KHACHATURIAN H., LEWIS M.E., SCHAFER M.K.H., WATSON S.J. 1985. Anatomy of the CNS opioid systems. Trends in Neurosci., Mars 1985:111-119.
- KING L.J. 1969. Statistical analysis in geography. Prentice-Hall Ed., London.
- KITA H., OOMURA Y. (1982) An HRP study of the afferent connections to rat lateral hypothalamic region. Brain Res. Bull., 8:63-71.
- KRISTENSSON K., OLSSON Y. 1971. Retrograde axonal transport of protein. Brain Res., 29:363-365.
- KRISTENSSON K., OLSSON Y. 1976. Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. 3. Entry into injured axons and subsequent localization in perikaryon. Brain Res., 115:201-213.
- KRISTENSSON K., OLSSON Y., SJOSTRAND J. 1971. Axonal uptake and retrograde transport of exogenous protein in the hypoglossal nerve. Brain Res., 32:399-406.
- KRUKOFF T.L., CALARESU F.R. 1984. A group of neurons highly reactive for enkephalins in the rat hypothalamus. Peptides, 5:931-936.
- KUYPERS H.G.J.M., BENTIVOGLIO M., CATSMAN-BERREVOETS C.E., BHAROS A.T. 1980. Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cell. Exp. Brain Res., 40:383-392.
- KUYPERS H.G.J.M., BENTIVOGLIO M., VAN DER KOY D., CATSMAN-BERREVOETS C.E. 1979. Retrograde transport of bisbenzimidazole and propidium iodide through axons to their parent cell bodies. Neurosci. Lett., 12:1-7.
- KUYPERS H.G.J.M., CATSMAN-BERREVOETS C.E., PADT R.E. 1977. Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain. Neurosci. Lett., 6:127-135.
- LAVAIL J.H., LAVAIL M.M. 1972. Retrograde axonal transport in the central nervous system. Science, 176:1416-1417.
- LA VAIL J.H., LA VAIL M.M. 1974. The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: a light and electron microscopic study. J. Comp. Neurol., 157:303-358.
- LEBART L., MORINEAU A., FENELON J.P. 1982. Traitement des données statistiques. Méthodes et programmes. Dunod Ed., Paris.
- LECHAN R.M., NESTLER J.L., JACOBSON S. 1982. The tuberoinfundibular system of the rat demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. Brain Res., 245:1-15.

- LECHAN R.M., NESTLER J.L., JACOBSON S., REICHLIN S. 1980. The hypothalamic "tuberoinfundibular" system of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase (HPR) microiontophoresis. Brain Res., 195:13-27.
- LEFEBVRE J. 1980. Introduction aux analyses statistiques multidimensionnelles. Masson Ed., Paris.
- LEFRANC G. 1966. Etude neurohistologique des noyaux supra optique et paraventriculaire chez le cobaye et le chat par la technique de triple imprégnation de Golgi. C.R. Acad. Sci. Paris, 263:976-979.
- LEGENDRE L., LEGENDRE P. 1984. Ecologie numérique. tome 2 : La structure des données écologiques. Masson Ed., Paris, et les presses de l'Université Laval, Quebec.
- LEONHARDT H., EBERHARDT H.G. 1972. Dye transport from the median eminence to the hypothalamic wall. In "Brain Endocrine Interaction - Median Eminence : Structure and Function" K.M. Knigge, D.E. Scott and A. Weindl Eds. Karger, New-York, 335-341.
- LEONTOVICH T.A., ZHUKOVA G.P. 1963. The specificity of the neuronal structure and topography of the reticular formation in the brain and spinal cord of carnivora. J. Comp. Neurol., 121:347-379.
- LERMAN I.C. 1970. Les bases de la classification automatique. Gauthier-Villard.
- LEVIN M.C., SAWCHENKO P.E., HOWE P.R.C., BLOOM S.R., POLAK J.M. 1987. Organization of galanin-immunoreactive inputs to the paraventricular nucleus with special reference to their relationship to catecholaminergic afferents. J. Comp. Neurol., 261:563-582.
- LIND R.W. 1986. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. Brain Res., 384:250-261.
- LITCHY W.J. 1973. Uptake and retrograde transport of horseradish peroxidase of frog sartorius nerve *in vitro*. Brain Res., 56:377-381.
- LUITEN P.G.M., TER HORST G.J., KARST H., STEFFENS A.B. 1985. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. Brain Res., 329:374-378.
- LUITEN P.G.M., KUIPERS F., SCHUITMAKER H. 1982. Organization of diencephalic and brain stem afferent projections to the lateral septum in the rat. Neurosci. Lett., 30:211-216.
- MAC MULLEN N.T., ALMLI C.R. 1981. Cell types within the medial forebrain bundle : a Golgi study of preoptic and hypothalamic neurons in the rat. Amer. J. Anat., 161:323-340.
- MAHALANOBIS P.C. 1927. Analysis of race mixture in Bengal. J. Asiat. Soc. Bengal., 23:301-333.
- MAHALANOBIS P.C. 1930. On text and measures of groupe divergence. J. Asiat. Soc. Bengal., 26:541-588.
- MAHALANOBIS P.C. 1936. On the generalized distance in statistics. Proc. Nat. Int. Sci. India, 12:49-55.
- MALMGREN L.T., OLSSON Y. 1979. Early influx of horseradish peroxidase into axons of the hypoglossal nerve during Wallerian degeneration. Neurosci. Lett., 13:13-18.
- MARTIN R., VOIGT K.H. 1981. Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. Nature, 289:502-504.
- MARTIN S., DE SAINTIGNON M.F. 1974. Application de l'analyse en composantes principales à l'étude de la variabilité régionale et inter-annuelle des précipitations ardéchoises. Rech. Geogr. Lyon, 1:75-92.

- MASON W.T., HO Y.W., HATTON G.I. 1984. Axon collaterals of supraoptic neurones : anatomical and electrophysiological evidence for their existence in the lateral hypothalamus. Neuroscience, 11:169-182.
- MEIBACH R.C., SIEGEL A. 1977. Efferent connections of the septal area in the rat : an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. Brain Res., 119:1-20.
- MESULAM M.M. 1978. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry : a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferent and efferents. J. Histochem. Cytochem., 26:106-117.
- MESULAM M.M. 1982. Principles of horseradish peroxidase neurohistochemistry and their applications for tracing neural pathways-axonal transport, enzyme histochemistry and light microscopic analysis. In "Tracing neural connections with horseradish peroxidase", Mesulam M.M. Ed., John Wiley and sons Ltd. Chichester. New-York. Brisbane. Toronto. Singapore. 1-151.
- MESULAM M.M., BRUSHART T.M. 1979. Transganglionic and anterograde transport of horseradish peroxidase across dorsal root ganglia : a tetramethyl benzidine method for tracing central sensory connections of muscles and peripheral nerves. Neuroscience, 4:1107-1117.
- MESULAM M.M., HEGARTY E., BARBAS H., CARSON K.A., GOWER E.C., KNAPP A.G., MOSS M.B., MUFSON E.J. 1980. Additional factors influencing sensitivity in the tetramethyl benzidine method for horseradish peroxidase neurohistochemistry. J. Histochem. Cytochem., 28:1255-1259.
- MESULAM M.M., MUFSON E.J. 1980. The rapid anterograde transport of horseradish peroxidase. Neuroscience, 5:1277-1286.
- MESULAM M.M., ROSENE D.L. 1977. Differential sensitivity between blue and brown reaction procedures for HRP neurohistochemistry. Neurosci. Lett., 5:7-14.
- MESULAM M.M., ROSENE D.L. 1979. Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry : a comparative and quantitative analysis of nine methods. J. Histochem. Cytochem., 27:763-773.
- MICEVYCH P., ELDE R. 1980. Relationship between enkephalinergic neurons and the vasopressin-oxytocin neuroendocrine system of the cat : an immunohistochemical study. J. Comp. Neurol., 190:135-146.
- MILLER R.J., PICKEL V.M. 1980. The distribution and functions of the enkephalins. J. Histochem. Cytochem., 28:903-917.
- MILLHOUSE O.E. 1969. A golgi study of the descending medial forebrain bundle. Brain Res., 15:341-363.
- MILLHOUSE O.E. 1981. The golgi methods. In "Neuroanatomical Tract-Tracing Methods". Heimer L. Roberts M.J. Eds., New-York, 311-344.
- MINAMI T., OOMURA Y., SUGIMORI M. 1986. Ionic basis for the electroresponsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurons in vitro. J. Physiol. (Lond.), 380:145-156.
- MITCHELL V., BEAUVILLAIN J.C., POULAIN P., MAZZUCA M. 1988. Catecholamine innervation of enkephalinergic neurons in guinea-pig hypothalamus : demonstration by an in vitro autoradiographic technique combined with a post-embedding immunogold method. J. Histochem. Cytochem., 36:533-542.
- MOORE R.Y. 1978. Catecholamine innervation of the basal forebrain. I : the septal area. J. Comp. Neurol., 177:665-684.
- MORRELL J.I., GREENBERGER L.M., PFAFF D.W. 1981. Comparison of horseradish peroxidase visualization methods : quantitative results and further technical specifics. J. Histochem. Cytochem., 29:903-916.

- MUHLEN K. 1966. The hypothalamus of the guinea-pig. S. Kargel Ed., Basel, New-York.
- NANCE D.M. 1983. Psychoneuroendocrine effects of neurotoxic lesions in the septum and striatum of rats. Pharmac. Biochem. Behav., 18:605-609.
- NASSEL D.R. 1983. Horseradish peroxidase and other heme proteins as neuronal tracers. In: N.J. Strausfeld" (Ed) Functional Neuroanatomy, Springer, Berlin, pp 44-91.
- NAYAR R., SIRETT N.E., HUBBARD J.I. 1987. Neuron responses to substance P and enkephalin in rat dorso-lateral septum in vitro. Brain Res. Bull., 19:507-509.
- NEGORO H., VISESSUWAN S., HOLLAND R.C. 1973. Inhibition and excitation of units in paraventricular nucleus after stimulation of the septum, amygdala and neurohypophysis. Brain Res., 57:479-483.
- NIEUWENHUYNS R. 1985. Chemoarchitecture of the brain. Springer-Verlag Ed., Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo.
- NORTH R.A., KATAYAMA Y., WILLIAMS J.T. 1979. On the mechanism and site of action of enkephalin on single myenteric neurons. Brain Res., 165:67-77.
- OERTEL W.H., GRAYBIEL A.M., MUGNAINI E., ELDE R.P., SCHMECHEL D.E., KOFIN I.J. 1983. Coexistence of glutamic acid decarboxylase and somatostatin like immunoreactivity in neurons of the feline nucleus reticularis thalami. J. Neurosci., 3:1322-1332.
- ONTENIENTE-KAH B. 1987. Etude cytofonctionnelle de trois systèmes neuronaux - A methionine-enkephaline, dopamine et GABA - et de leurs interrelations dans la région septale chez le rat. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Université de Bordeaux I, 126pp.
- ONTENIENTE B., DE POMMERY J., MENETREY D. 1986. Origine des afferences Met- enkephalinergiques du septum latéral chez le rat. Colloque National des Neurosciences. Bordeaux, 22-26 Avril 1986. A 58.
- ONTENIENTE B., KIMURA H., MAEDA T. 1982. Electron microscopic study of met- enkephalin-like immunoreactivity in the rat brain. J. Histochem. Cytochem., 30:596.
- PALKOVITS M. 1986. Afferents onto Neuroendocrine Cells. In "Morphology of hypothalamus and its connections" Ganten D. et Pfaff D. (Eds) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo, 197-222.
- PALKOVITS M., BROWNSTEIN M.J. 1985. Distribution of neuropeptides in the central nervous system using biochemical micromethods. In "Handbook of Chemical Neuroanatomy, Volume 4 : GABA and neuropeptides in the CNS, part 1" Björklund A., Hokfelt T. Eds., Elsevier, Amsterdam, New-York, Oxford, 1-71.
- PALKOVITS M., ZABORSZKY L., AMBACH G. 1974. Accessory neurosecretory cell groups in the rat hypothalamus. Acta Morphol. Hung., 22:21-33.
- PASTERNAK J.F., WOOLSEY T.A. 1975. On the "selectivity" of the Golgi-Cox method. J. Comp. Neurol., 160:307-312.
- PAYNE J.N. 1987. Comparisons between the use of true blue and diamidino yellow as retrograde fluorescent tracers. Exp. Brain Res., 68:631-642.
- PEARSON J.C., NORRIS J.R., PHELPS. C.H. 1985. Subclassification of neurons in the subthalamic nucleus lesser bushbaby (*Galago senegalensis*): a quantitative Golgi study using Principal Components Analysis. J. Comp. Neurol., 238:323-339.
- PEARSON K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Phil. Mag., 2:559-572.
- PETERSON R. 1966. Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. J. Comp. Neurol., 128:181-190.

- PETROVICKY P. 1967. Hypothalamo-reticular connections in the rat. Acta. Univ. Carol. Med., 13:385-396.
- PETRUSZ P., MERCHENTHALER I., MADERDRUT J.L. 1985. Distribution of enkephalin containing neurons in the central nervous system. In "Handbook of chemical neuroanatomy, Volume 4 : GABA and Neuropeptides in the CNS, part 1" Björklund A., Hokfelt T. Eds. Elsevier, Amsterdam, New-York, Oxford, 273-334.
- PHILIPPEAU G. Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales ? Service des études statistiques. Institut Technique des Céréales et des Fourrages.
- PITMANN Q.J., BLUME H.W., RENAUD L.P. 1981. Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray : an electrophysiological study in the rat. Brain Res., 215:15-28.
- POULAIN P. 1974. L'hypothalamus et le septum du cobaye de 400 g en coordonnées stéréotaxiques. Arch. Acta. Microsc. Morphol. Exp., 63:37-50.
- POULAIN P. 1977. Septal afferents to the arcuate median eminence region in the guinea-pig correlative electrophysiological and horseradish peroxidase study. Brain Res., 137:150-153.
- POULAIN P. 1979. Etude descriptive et fonctionnelle de l'aire septopréoptique et de ses relations avec la région infundibulaire chez le cobaye. Thèse d'Etat Doctorat ès Sciences naturelles, Université Sciences et Techniques de Lille, 166 pp.
- POULAIN P. 1983. Hypothalamic projection to the lateral septum in the guinea-pig. An HRP study. Brain Res. Bull., 10:309-313.
- POULAIN P. 1986. Properties of antidromically identified neurons in the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus of the guinea-pig hypothalamus. Brain Res., 362:74-82.
- POULAIN P., BARRY J. 1971. Les techniques d'analyse neuronique individuelle du système nerveux central. Lille Médical, 16/4:498-506.
- POULAIN P., CARETTE B. 1986. Effects of GRF on paraventricular neurons in slices of guinea-pig hypothalamus. Brain Res., 371:355-359.
- POULAIN P., CARETTE B. 1987. Low-threshold calcium spikes in hypothalamic neurons recorded near the paraventricular nucleus in vitro. Brain Res. Bull., 19:453-460.
- POULAIN P., MARTIN-BOUYER L., BEAUVILLAIN J.C., TRAMU G. 1984. Study of the efferent connections of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea-pig hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunohistochemistry : evidence for a projection to the lateral septum. Neuroscience, 11:331-343.
- PUGH V.W., STERN W.C. 1984. Horseradish peroxidase labeling of extracellular single unit recording sites. Brain Res. Bull., 12:419-423.
- RAISMAN G. 1966. The connection of the septum. Brain, 39:317-348.
- RAMON-MOLINER E. 1957. A chlorate-formaldehyde modification of the Golgi Method. Stain Technol., 32:105-116.
- RAMON-MOLINER E. 1961. The histology of the posteruciate gyrus in the cat : II. A statistical analysis of the dendritic distribution. J. Comp. Neurol., 117:63-76.
- RAMON-MOLINER E., NAUTA W.J.H. 1966. The isodendritic core of the brain stem. J. Comp. Neurol., 126:311-336.
- RAO C.R. 1952. Advanced statistical methods in biometric research. John Wiley Ed., London, New York.

- RAO C.R. 1964. The use and interpretation of principal component analysis in applied research. Sankhya, 26:329-358.
- REPERANT J. 1975. The orthograde transport of horseradish peroxidase in the visual system. Brain Res., 85:307-312.
- ROGERS R.C., BUTCHER L.L., NOVIN D. 1980. Effects of urethane and pentobarbital anesthesia on the demonstration of retrograde and anterograde transport of horseradish peroxidase. Brain Res., 187:197-200.
- ROMAGNANO M.A., CHAFEL T.L., PILCHER W.H., JOSEPH S.A. 1982. The distribution of enkephalin in the mediobasal hypothalamus of the mouse brain: effects of neonatal administration of MSG. Brain Res., 236:497-504.
- ROMANE F. 1972. Application à la phyto écologie de quelques méthodes d'analyse multivariée. Thèse de Doctorat d'Ingénieur, Université de Montpellier : 124 pp.
- ROMEDER J.M. 1973. Méthodes et programmes d'analyse discriminante. Dunod Ed., Paris, Bruxelles, Montréal.
- ROSSIER J., BATTENBERG E., PITTMAN Q., BAYON A., KODA L., MILLER R., GUILLEMIN R., BLOOM F.E. 1979. Hypothalamic enkephalin neurons may regulate the neurohypophysis. Nature, 277:653-655.
- ROUX M. 1985. Algorithmes de classification. Masson Ed., Paris.
- SAKANAKA M., MAGARI S., SHIBASAKI T., LEDERIS K. 1988. Corticotropin releasing factor-containing efferents to the lateral septum of the rat brain. J. Comp. Neurol., 270:404-415.
- SAKANAKA M., SENBA E., SHIOSAKA S., TAKATSUKI K., INAGAKI S., TAKAGI H., KAWAI Y., HARA Y., TOHYAMA M. 1982. Evidence for the existence of an enkephalin-containing pathway from the area just ventrolateral to the anterior hypothalamic nucleus to the lateral septal area of the rat. Brain Res., 239:240-244.
- SAPER C.P., SWANSON L.W., COWAN W.M. 1979. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. J. Comp. Neurol., 183:689-706.
- SAR M., STUMPF W.E., MILLER R.J., CHANG K.J., CUATRECASAS P. 1978. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J. Comp. Neurol., 182:17-38.
- SCHADE J.P., CAVENESS W.F. 1968. IV Alteration in dendritic organisation. Brain Res., 7:59-86.
- SCHADE J.P., VAN BACKER H., COLON E. 1964. Quantitative analysis of neuronal parameters in the maturing cerebral cortex. In "Growth and maturation of the brain". Purpura D.P., Schade J.P. Eds., Amsterdam, Elsevier, 150-175.
- SCHERRER B. 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin Ed., Chicoutimi, Quebec, Canada.
- SCHMUED L.C., FALLON J.H. 1986. Fluoro-gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res., 377:147-154.
- SCHWARTZKROIN P.A. 1975. Characteristics of C.A. neurons recorded intracellularly in the hippocampal "in vitro" slice preparation. Brain Res., 85:423-436.
- SHEN C.L. 1983. Efferent projections from the lateral hypothalamus with the guinea-pig: an autoradiographic study. Brain Res. Bull., 11:335-347.
- SHEN C.L., ANDERSON C.H. 1980. Efferents from the medial anterior hypothalamic area in the guinea-pig. Brain Res. Bull., 5:693-701.
- SHERLOCK D.A., FIELD P.M., RAISMAN G. 1975. Retrograde transport of horseradish peroxidase in the magnocellular neurosecretory system of the rat. Brain Res., 88:403-414.

- SHIMONO M., TSUJI N. 1987. Study of the selectivity of the impregnation of neurons by the Golgi method. J. Comp. Neurol., 259:122-130.
- SHINODA K., TOHYAMA M. 1987. Analysis of the habenulopetal enkephalinergic system in the rat brain : an immunohistochemical study. J. Comp. Neurol., 255:483-496.
- SHOLL D.A. 1955. The organisation of the visual cortex in the cat. J. Anat., 89:33-46.
- SILVERMAN A.J., JHAMANDAS J., RENAUD L.P. 1987. Localization of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) neurons that project to the median eminence. J. Neurosci., 7:2312-2319.
- SIMANTOV R., KUJAR M.J., UHL G.R., SNYDER S.H. 1977. Opioid peptide enkephalin : immunohistochemical mapping in rat central nervous system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA : 74:2167-2171.
- SMIT G.J., COLON E.J. 1969. Quantitative analysis of the central cortex. I. A selectivity of the Golgi-Cox staining technique. Brain Res., 13:485-510.
- SMITH Y., SEQUELA P., PARENT A. 1987. Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the thalamus of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). Neuroscience, 22:579-591.
- SNEATH P.H.A., SOKAL R.R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman W.M. Ed., San Francisco.
- SOFRONIEW M.V., GLASMANN W. 1981. Golgi-like immunoperoxidase staining of hypothalamic magnocellular neurons that contain vasopressin, oxytocin or neurophysin in the rat. Neuroscience, 6:619-643.
- SOKAL R.R., SNEATH P.H.A. 1963. Principles of numerical taxonomy. Freeman W.M. Ed., San Francisco, London.
- SOTELO C., RICHE D. 1974. The smooth endoplasmic reticulum and the retrograde and fast orthograde transport of horseradish peroxidase in the nigro-striato-nigral loop. Anat. Embryol., 146:209-218.
- SRETAVAN D., SHATZ C.J. 1984. Prenatal development of individual retinogeniculate axons during the period of segregation. Nature, 308:845-848.
- STAINES W.A., MEISTER B., MELANDER T., NAGY J.I., HOKFELT T. 1988. Three-color immunofluorescence histochemistry allowing triple labeling within a single section. J. Histochem. Cytochem., 36:145-151.
- STEFANINI M., DE MARTINO C., ZAMBONI L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature, 216:173.
- STENGAARD-PEDERSEN K., LARSSON L.I. 1981. Comparative immunocytochemical localization of putative opioids ligands in the central nervous system. Histochemistry, 73:89-114.
- STENGAARD-PEDERSEN K., LARSSON L.I. 1983. Met- and Leu-enkephalinergic innervation of the lateral septal nucleus. Brain Res., 264:152-156.
- STERIADE M., DESCHENES M. 1984. The thalamus as a neuronal oscillator. Brain Res. Rev., 8:1-63.
- STERIADE M., PARENT A., PARE D., SMITH Y. 1987. Cholinergic and non-cholinergic neurons of cat basal forebrain project to reticular and mediodorsal thalamic nuclei. Brain Res., 408:372-376.
- STEWART O. 1981. Horseradish peroxidase and fluorescent substances and their combination with other techniques. In "Neuroanatomical Tract-tracing methods" Heimer L., Robards M.J. Eds. Plenum Press, New-York, London, 279- 310 pp.

- STEWART O., SCOVILLE S.A. 1976. Retrograde labeling of central nervous pathways with tritiated or Evans blue-labeled bovine serum albumin. Neurosci. Lett., 3:191-196.
- STEWART W.W. 1978. Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. Cell, 14:741-759.
- STUMPF W.E., SAR M. 1975. Anatomical distribution of corticosterone-concentrating neurons in the rat brain. In "Anatomical neuroendocrinology" Stumpf W.E. and Grant L.D. Eds., Karger, Basel, 243-268.
- SUNDSTEN J.W. 1971. Septal inhibition of antidromically activated hypothalamic paraventricular neurons in the monkey. Anat. Rec., 169:439.
- SWANSON L.W., COWAN W.H. 1979. The connections of the septal region in the rat. J. Comp. Neurol., 186:621-656.
- SWANSON L.W., SAWCHENKO P.E., RIVIER J., VALE W.W. 1983. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology, 36:165-186.
- TER HORST G.J., LUITEN P.G.M. 1986. The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. Brain Res. Bull., 16:231-248.
- TER HORST G.J., LUITEN P.G.M. 1987. Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. Brain Res. Bull., 18:191-203.
- THEODOSIS D.T. 1982. Secretion-related accumulation of horseradish peroxidase in magnocellular cell bodies of the rat supraoptic nucleus. Brain Res., 233:3-16.
- THEODOSIS D.T., DREIFUSS J.J., HARRIS M.C., ORCI L. 1976. Secretion related uptake of horseradish peroxidase in neurohypophysial axons. J. Cell. Biol., 70:294-303.
- TOMASSONNE R. 1967. Une méthode d'investigation : la régression orthogonale. Ann. Sci. for (Paris), 24:233-258.
- TOMASSONE R. 1975. L'analyse en composantes principales. Laboratoire de Biométrie du C.N.R.S.
- TORRENS-IBERN J. 1972. Modèles et méthodes de l'analyse factorielle. Dunod Ed., Paris.
- 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., LEONARDELLI J. 1979. Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. Brain Res., 168:457-471.
- TRANCHEFORT J. 1974. La régression. Application à l'agronomie. Bureau d'études statistiques I.T.C.F..
- TURNER P.T., HARRIS A.B. 1974. Ultrastructure of exogenous peroxidase in cerebral cortex. Brain Res., 74:305-326.
- 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.
- VAN DER KRANS A., HOOGLAND P.V. 1983. Labeling of neurons following intravenous injections of fluorescent tracers in mice. J. Neuroscience Methods, 9:95-103.
- VANDERKOOY D., KUYPERS H.G.J.M., CATSMAN-BERREVOETS C.E. 1978. Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple fluorescent retrograde double labeling technique in the rat. Brain Res., 158:189-196.

- VEENING J.C., TE LIE S., POSTHUMA P., GEERAEDTS L.M.G., NIEUWENHUYNS R. 1987. A topographical analysis of the origin of some efferent projections from the lateral hypothalamic area in the rat. Neuroscience, 22:537-551.
- WAHREN W. 1957. Das Zwischenhirn des Kaninchens. J. Hirnforsch, 3:143-242.
- WAMSLEY J.K., YOUNG W.S., KUCHAR M.J. 1980. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. Brain Res., 190:153-174.
- WAREMBOURG M. 1977. Radioautographic localization of estrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea-pig. Brain Res., 123:357-362.
- WARR W.B., DEOLMOS J.S., HEIMER L. 1981. Horseradish peroxidase: the basic procedure. In "Neuroanatomical tract tracing methods", Heimer L. Robards M.J. Eds., Plenum Press, New-York, London, 207-262.
- WATSON S.J., AKIL H., SULLIVAN S., BARCHAS J.D. 1977. Immunocytochemical localization of methionine enkephalin: preliminary observations. Life Sci., 21:733-738.
- WELLER K.L., SMITH D.A. 1981. An improved method for the injection of crystalline horseradish peroxidase in neuroanatomical studies. Stain Technol., 56:311-316.
- WEST J.R., BLACK A.C.Jr 1979. Enhancing the anterograde movement of HRP to label sparse neuronal connections. Neurosci. Lett., 12:35-40.
- WIEGAND S.J., PRICE J.L. 1980. Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. J. Comp. Neurol., 192:1-19.
- WOLF G., SUTIN J. 1966. Fiber degeneration after lateral hypothalamic lesions in the rat. J. Comp. Neurol., 127:137-156.
- WOUTERLOOD F.G., GROENEWEGEN H.J. 1985. Neuroanatomical tracing by use of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L): electron microscopy of PHA-L-filled neuronal somata, dendrites, axons and axon terminals. Brain Res., 326:188-192.
- YAMAMOTO C. 1973. Propagation of after discharges elicited in thin brain sections in artificial media. Exp. Neurol., 40:183-188.
- YAMANO M., INAGAKI S., KITO S., MATSUZAKI T., SHINOHARA Y., TOHYAMA M. 1986. Enkephalinergic projection from the ventromedial hypothalamic nucleus to the midbrain central gray matter in the rat: an immunocytochemical analysis. Brain Res., 398:337-346.
- YAMANO M., INAGAKI S., KITO S., TOHYAMA M. 1985a. An enkephalinergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the hypothalamic ventromedial nucleus of the rat: an experimental immunohistochemical study. Brain Res., 331:25-33.
- YAMANO M., TOHYAMA M. 1987. Afferent and efferent enkephalinergic systems of the tegmental nuclei of Gudden in the rat: an immunocytochemical study. Brain Res., 408:22-30.
- YAMANO M., TOHYAMA M., SHIOSAKA S., SHIOTANI Y., INAGAKI S., KITO S. 1985b. Leucine-enkephalin-like immunoreactive fibers in the medial preoptic area of the rat: their distribution and origin. Exp. Brain Res., 60:535-541.
- YANG Q.Z., HATTON G.I. 1987. Dye coupling among supraoptic nucleus neurons without dendritic damage: differential incidence in nursing mother and virgin rats. Brain Res. Bull., 19:559-567.
- YELNIK J., PERCHERON G., FRANCOIS C., BURNOD Y. 1983. Principal component analysis: a suitable method for the 3-dimensional study of the shape, dimensions and orientation of dendritic arborizations. J. Neuroscience Methods, 9:115-125.

- YEZIERSKI R.P., BOWKER R.M. 1981. A retrograde double label tracing technique using horseradish peroxidase and the fluorescent dye 4',6-Diamidino-2-phenylindole 2HCl (DAPI). J. Neuroscience Methods, 4:53-62.
- YOUNGSTROM T.G., NUMEZ A.A. 1987. Neurons in the suprachiasmatic area are labelled after intravenous injections of horseradish peroxidase. Exp. Brain Res., 67:127-130.
- ZIEGLANGSBERGER W. 1982. Actions of amino acids, amines, and neuropeptides on target cells in the mammalian central nervous system. In "Chemical Transmission in the Brain: The role of Amines, Amino Acids, and Peptides" Buijs R.M., Pevet P., Swaab D.F., Eds., Elsevier Biomedical Press, New-York, 297-320.

