

Année Universitaire 1992-1993

N° d'ordre 1227

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

DE L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Mention : NEUROSCIENCES

par

Odile DOUTRELANT-VILTART



ÉTUDE MORPHOFONCTIONNELLE DES NEURONES DU SEPTUM LATÉRAL CHEZ LE COBAYE : ASSOCIATION DES TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES ET DES TECHNIQUES D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE ET DE MARQUAGE INTRACELLULAIRES.

Soutenue le 10 décembre 1993, devant la Commission d'Examen :

JURY

Président : Monsieur M. Porchet
Rapporteurs : Monsieur J.M. Israel
Monsieur G. Tramu
Examineurs : Monsieur M. Mazzuca
Monsieur P. Poulain

A mes parents,

A tous mes proches qui m'ont soutenue durant ce travail.

J'aimerais adresser mes plus vifs remerciements,

A Monsieur le Professeur M. Mazzuca,

qui, en acceptant de m'intégrer dans son laboratoire, a permis la réalisation de ce travail. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. Porchet,

qui a aimablement accepté de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur G. Tramu,

dont les compétences en neuroendocrinologie sont telles que je suis particulièrement honorée de le compter parmi mes juges. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude pour avoir bien voulu assumer cette responsabilité supplémentaire.

A Monsieur J.M. Israel,

pour l'honneur qu'il me fait de s'intéresser à mes recherches et d'en juger les résultats. Je tiens à lui exprimer ma sincère gratitude.

A Monsieur P. Poulain,

qui a dirigé mes travaux de DEA et de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa patience, ses commentaires durant l'évolution de ce travail, ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils lors de la réalisation de ce mémoire. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur B. Carette,

qui m'a fait bénéficier de son expérience en électrophysiologie et m'a prodigué de nombreux conseils. Qu'il trouve ici toute mon amitié.

A Messieurs J.C. Beauvillain et P. Ciofi,

qui m'ont initiée aux techniques d'immunocytochimie à l'échelle du microscope électronique et optique. Leur expérience et leur disponibilité m'ont été précieuses tout au long de ce travail.

A C. Bel, D. Deneux, A. Pillez,

pour leur aide amicale et leur compétence, ainsi qu'à S. Dutoit pour son aide efficace lors de la préparation des illustrations de ce mémoire.

A toutes les personnes qui m'ont encouragée et qui ont participé à l'élaboration de ce travail et tout particulièrement aux membres de l'unité 156 INSERM, chercheurs, étudiants et personnel administratif qui, par leur sympathie, ont contribué à mon intégration dans le laboratoire.

Sommaire

INTRODUCTION	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	2
I. Le septum latéral : subdivisions et connexions	2
1 - Subdivisions du SL	2
2 - Connexions du SL	3
2.1) Afférences au SL	3
2.2) Efférences du SL	5
II. Rôles du septum latéral	7
1 - Rôle du SL dans les processus de mémorisation et d'apprentissage	8
1.1) Rythme thêta	8
1.2) Potentialisation à long terme	8
2 - Rôle du SL dans l'émotivité et l'agressivité	10
3 - Rôle du SL dans les processus psychoneuroendocrines	11
3.1) Comportement de lordose	11
3.2) Comportement alimentaire	12
4 - Rôle du SL dans la régulation des fonctions antéhypophysaires	12
5 - Rôle du SL dans la régulation des fonctions posthypophysaires	13
6 - Rôle du SL dans le contrôle d'autres fonctions	14
OBJECTIFS	16
MATERIEL ET METHODES	19
I. Sujets expérimentaux	19
II. Techniques immunocytochimiques et histochimiques	19
1 - Techniques histologiques	19
1.1) Anesthésie et fixation	19
1.2) Inclusion et congélation	20
1.3) Confection et conservation des coupes	20
2 - Réactions immunocytochimiques	21
2.1) Principe	21
2.2) Protocole expérimental	22
3 - Mise en évidence de la NADPH-diaphorase	24
4 - Réactions multiples	24
4.1) Détection simultanée de la calbindin-D28K et de la met-enképhaline	25
4.2) Détection simultanée de la NADPH-diaphorase, de la calbindin-D28K et de la met-enképhaline	25
4.3) Spécificité des réactions immunocytochimiques	25
III. Techniques d'imprégnation argentique	26
1 - Technique de Mac Mullen et Almlı (1981)	26
2 - Technique de Tokuno (1990)	27
IV. Techniques électrophysiologiques	27
1 - Réalisation des tranches de septum	27
2 - Enregistrements intracellulaires	28
2.1) Fabrication des microélectrodes	28
2.2) Appareillage électrophysiologique	28
2.3) Application de substances	29
3 - Injections intracellulaires de marqueurs	29
3.1) Peroxydase	30
3.2) Lucifer Yellow	30
3.3) Biocytine	30
V. Traitement histologique des tranches	31
1 - Cellules injectées par la peroxydase	31
1.1) Préparation des tranches pour la microscopie optique	31
1.1.1) Révélation avec la DAB	31
1.1.2) Révélation avec le réactif d'Hanker-Yates	32
1.1.3) Montage des coupes	33
1.2) Préparation des tranches pour la microscopie électronique	33

1.2.1) Révélation des cellules injectées	33
1.2.2) Osmification et inclusion des tranches dans l'Araldite	34
1.2.3) Traitement des coupes semi-fines	34
1.2.4) Traitement des coupes ultra-fines	34
2 - Cellules injectées par le Lucifer Yellow	35
2.1) Observation des cellules marquées par le LY	35
2.2) Couplage avec la réaction immunocytochimique	35
3 - Cellules injectées par la biocytine	35
3.1) Observation des cellules marquées par la biocytine	35
3.2) Couplage avec la réaction immunocytochimique	36
3.2.1) Détection de la met-enképhaline	36
3.2.2) Détection simultanée de la CaBP et de la met-enképhaline	37
Chapitre I : ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE DU SEPTUM LATERAL CHEZ LE COBAYE	38
Introduction	38
Résultats	41
I. Description immunocytochimique des afférences au septum latéral chez le cobaye	41
1 - Distribution des fibres immunoréactives pour la somatostatine (IR-SOM)	41
2 - Distribution des fibres immunoréactives pour la neurotensine (IR-NT)	42
3 - Distribution des fibres immunoréactives pour la tyrosine-hydroxylase (IR-TH)	43
4 - Distribution des fibres immunoréactives pour la vasopressine (IR-VP)	43
5 - Distribution des fibres immunoréactives pour la met-enképhaline (IR-Enk)	44
II. Répartition des populations cellulaires du septum latéral contenant la parvalbumine, la calbindin-D28K, le GABA et la NADPH-diaphorase	44
1 - Distribution des neurones immunoréactifs pour la parvalbumine (IR-PV)	44
2 - Distribution des neurones immunoréactifs pour la calbindin-D28K (IR-CaBP), comparaison avec la distribution des neurones immunoréactifs pour le GABA (IR-GABA), innervation enképhalinergique	45
2.1) Distribution des neurones IR-CaBP	45
2.2) Comparaison avec les neurones IR-GABA	45
2.3) Innervation enképhalinergique des neurones IR-CaBP	46
3 - Distribution des neurones à activité NADPH-diaphorase (ND+), colocalisation avec la calbindin-D28K, innervation enképhalinergique	47
3.1) Distribution des neurones ND+	47
3.2) Colocalisation ND/CaBP	47
3.2.1) Répartition des deux populations	47
3.2.2) Double marquage	48
3.3) Innervation enképhalinergique des neurones ND+ et des neurones ND+/IR-CaBP	48
Discussion	50
I. Distribution des afférences au septum latéral	50
1 - Remarques générales	50
2 - Implications fonctionnelles	55
II. Neurones à GABA	57
III. Neurones contenant la parvalbumine, la calbindin-D28K et la NADPH-diaphorase, innervation enképhalinergique	58
Chapitre II : ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE ET MORPHOLOGIQUE DES NEURONES DU SEPTUM LATÉRAL MEDIO-LATERAL	60
Introduction	60
Résultats	62
I. Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du septum latéral médio-latéral	62
1 - Généralités	62
2 - Neurones de classe A et de classe B	62
2.1) Propriétés communes aux deux classes	62

2.2) Différences entre les deux classes	63
2.3) Décharges répétitives des neurones de classe A	64
2.3.1) Observations en milieu normal	64
2.3.2) Observations en milieu cobalt	64
2.4) Intervention de l'AHP dans les décharges répétitives des neurones de classe A	66
2.5) Décharges répétitives des neurones de classe B	67
2.6) Rectification entrante (anormale)	67
2.7) Rectification sortante transitoire	68
3 - Neurones de classe C	69
3.1) Propriétés générales	69
3.2) Décharges répétitives des neurones de classe C	69
3.2.1) Observations en milieu normal	69
3.2.2) Spécificité ionique	70
3.3) Rectification entrante (anormale)	70
3.4) Potentiels post-synaptiques	71
II. Caractéristiques morphologiques des neurones du septum latéral médio-latéral	71
1 - Analyse à l'échelle du microscope optique	71
1.1) Généralités	71
1.2) Caractéristiques somato-dendritiques	74
1.2.1) Neurones de grande taille	74
1.2.2) Neurones de petite taille	77
1.3) Analyse du champ axonal	79
2 - Analyse à l'échelle ultrastructurale	80
2.1) Caractéristiques somato-dendritiques	80
2.2) Caractéristiques des terminaisons nerveuses	80
3 - Imprégnation argentique de Golgi	81
III. Caractéristiques immunocytochimiques des neurones du septum latéral médio-latéral après enregistrement et injection intracellulaires	82
1 - Détection de terminaisons enképhalinerigiques au contact des neurones de classe A et C	82
1.1) Neurones injectés par le LY	82
1.2) Neurones injectés par la biocytine	83
2 - Détection de la CaBP dans des neurones de classe A et C, couplée à celle des terminaisons enképhalinerigiques	84
Discussion	85
I. Propriétés électrophysiologiques des neurones du septum latéral médio-latéral	85
1 - Neurones de classe A et de classe B	85
2 - Neurones de classe C	87
II. Caractéristiques morphologiques des neurones du septum latéral médio-latéral	89
1 - Considérations méthodologiques	89
1.1) Injections intracellulaires	89
1.2) Imprégnations argentiques	90
2 - Caractéristiques somatodendritiques	90
3 - Caractéristiques de l'axone	92
4 - Neurones à épines somatiques	93
5 - Observations ultrastructurales	94
6 - Corrélation entre propriétés électrophysiologiques et caractéristiques morphologiques	95
III. Caractérisation immunocytochimique de neurones du septum latéral médio-latéral après identification électrophysiologique et injection intracellulaire	96
DISCUSSION GENERALE	98
BIBLIOGRAPHIE	105
RESUME	121

Abréviations

AHP : potentiel tardif hyperpolarisant
AHL : aire hypothalamique latérale
4-AP : 4-aminopyridine
AVT : aire ventrale tegmentale
bdB : bandelettes diagonales de Broca
BSA : sérum albumine bovine
ca : commissure blanche antérieure
CaBP : calbindin-D28K
cc : corps calleux
DAB : 3, 3'-diaminobenzidine tétra-HCl
Enk : met-enképhaline
FITC : isothiocyanate de fluorescéine
fmt : faisceau médian du télencéphale
fx : fornix
HI : hippocampe
LC : locus coeruleus
LY : Lucifer Yellow
ND : NADPH-diaphorase
NLST : noyau du lit de la strie terminale
NMM : noyau médian de l'amygdale
NT : neurotensine
PAF : paraformaldehyde picric acid
PFA : paraformaldéhyde
PO : aire préoptique
PV : parvalbumine
R : noyau du raphé
SF : noyau septo-fimbrial
SH : noyau septo-hippocampique
SL : septum latéral
SLd : partie dorsale du septum latéral
SLi : partie intermédiaire du septum latéral
SLml : septum latéral médio-latéral
SLv : partie ventrale du septum latéral
SOM : somatostatine
SM : septum médian
TEA : tétraéthylammonium
TH : tyrosine hydroxylase
Th : thalamus
TP : tampon phosphate
TPS : tampon phosphate salin
TRITC : tétraméthyl rhodamine isothiocyanate
TTX : tétrodotoxine
VL : ventricule latéral
VP : vasopressine

Introduction

La compréhension des mécanismes de communication entre les cellules nerveuses s'est améliorée grâce au développement de nouvelles technologies et à des approches de plus en plus multidisciplinaires.

La morphologie et la neurophysiologie sont deux disciplines qui s'appliquent à la description des cellules nerveuses dans leur environnement. La morphologie favorise la description, au niveau régional, des types cellulaires et de l'articulation de groupes de neurones distincts. La neurophysiologie permet d'appréhender, au niveau cellulaire, le comportement de la cellule nerveuse vis à vis des influences synaptiques et humorales qu'elle reçoit. Lorsqu'elles sont couplées à l'étude d'un neurone individuel, la morphologie et la neurophysiologie s'associent pour faire comprendre les rapports existant entre la structure et la fonction neuronales.

Le présent travail utilise les techniques issues de ces deux disciplines pour étudier une région clé du cerveau, située à l'interface entre les centres télencéphaliques supérieurs et le diencephale, **le septum latéral (SL)** et plus particulièrement une de ces subdivisions qui est impliquée, par ses connexions vers l'hypothalamus, dans les fonctions neuroendocrines : **la partie médiolatérale du septum latéral (SLml)**.

Rappels Bibliographiques

I. Le septum latéral : subdivisions et connexions

1 - Subdivisions du SL

Le septum se situe entre les cornes antérieures des ventricules latéraux. Il est limité antérieurement par l'hippocampe précommissural, dorsalement par le corps calleux, postérieurement et ventralement par la décussation de la commissure blanche antérieure (figure 1).

Les subdivisions du septum furent décrites pour la première fois chez le boeuf par Meynert (1867). Cette nomenclature fût précisée par Andy et Stephan (1959) chez les primates, puis par Swanson et Cowan (1979) chez le rat. Le septum est divisé en plusieurs noyaux : le SL, le septum médian (SM), le noyau septo-hippocampique, les bandelettes diagonales de Broca (bdB), le noyau septo-fimbrial et le noyau triangulaire. Sont adjoints aux deux derniers noyaux, le noyau du lit de la strie terminale (NLST) et le noyau septo-hypothalamique (figure 1).

Swanson et Cowan (1979) ont subdivisé le SL du rat en trois régions : dorsale (SLd), intermédiaire (SLi), et ventrale (SLv), en fonction de la taille et de la densité des cellules les constituant. Les régions dorsale et ventrale sont adjacentes au ventricule latéral, alors que le SLi est situé plus médialement. Il n'existe cependant pas de frontières bien définies entre ces différents noyaux.

Le SLd forme une aire triangulaire, localisée dans l'angle formé par le corps calleux et le ventricule latéral. Il constitue la plus petite des trois subdivisions, mais il comprend un nombre élevé de neurones.

Le SLi forme l'aire la plus large et la plus hétérogène du SL. Il est limité rostralement par l'hippocampe précommissural et caudalement, est remplacé par le SF. Les neurones qui le constituent sont relativement dispersés sur toute la surface.

Le SLv est une région apparaissant plus dense par rapport au reste du SL, limitée ventrolatéralement par le NLST. Cet aspect compact est lié à un nombre élevé de neurones très regroupés.

Ces subdivisions ont été adoptées par la grande majorité des auteurs s'intéressant au SL. Il n'existe pas de différences notables entre le SL du rat et celui du cobaye (Bleier, 1983 ; Staiger et Nürnberger, 1989).

Récemment, chez le rat, Jakab et Leranthy (1990a) ont défini une nouvelle zone, dénommée partie médiolatérale du SL (SLml). Cette région

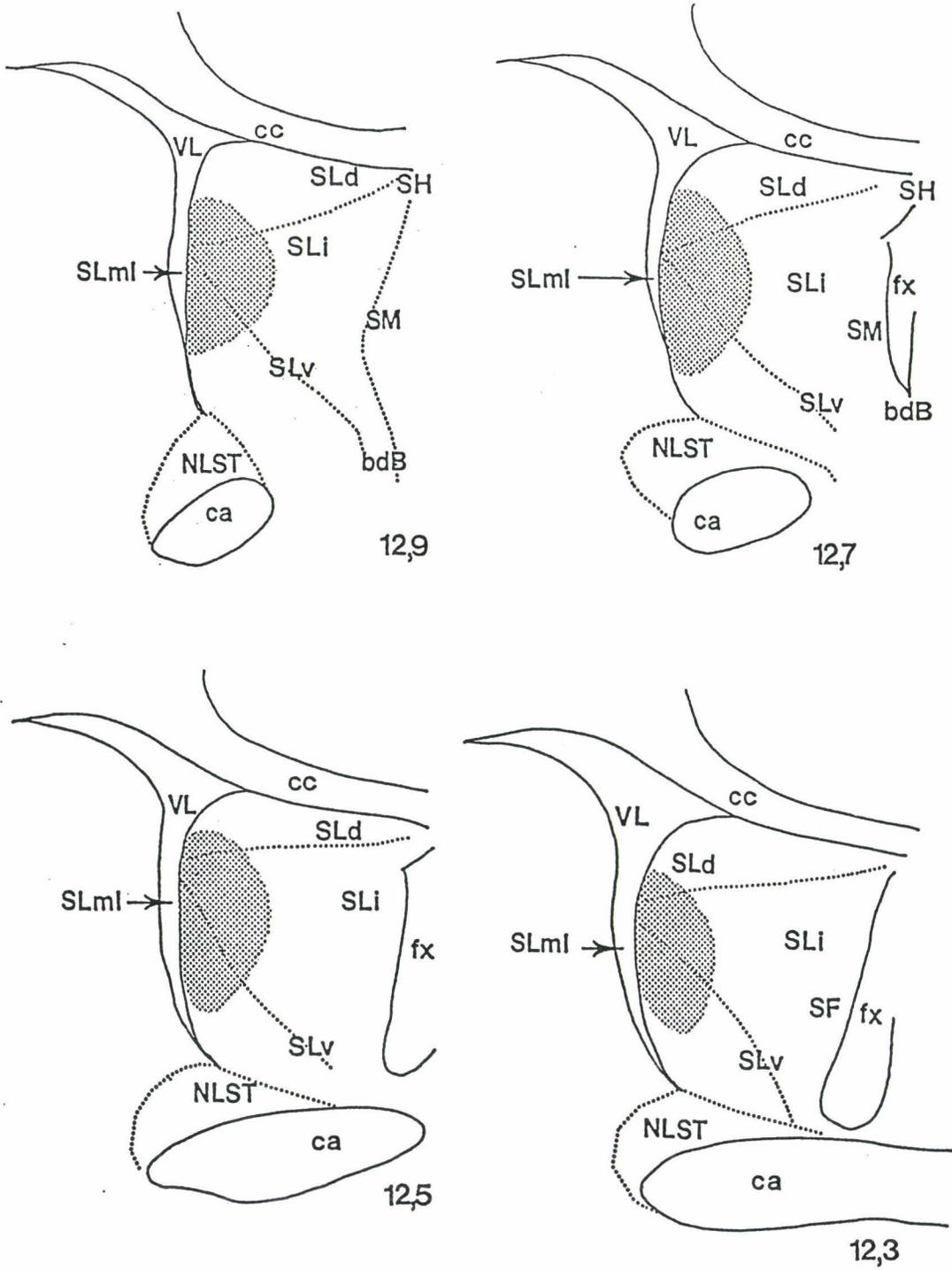


Figure 1 : Représentation schématique des subdivisions anatomiques de la région septale du cobaye. D'après Poulain (1974) et Bleier (1983). Le niveau de chaque coupe frontale correspond à la distance, en mm, qui le sépare du plan vertical passant par l'axe interauriculaire. La région grisée représente le SLml.

correspond aux parties latérales de la portion ventrale du SLd, du SLi et de la partie dorsale du SLv (figure 1). La principale caractéristique de cette région par rapport aux subdivisions classiquement établies, concerne l'abondance de neurones pourvus d'épines somatiques.

2 - Connexions du SL

Les connexions du SL furent examinées pour la première fois par Raisman (1966), qui utilisa des techniques de dégénérescence axonale. Elles furent complétées par l'utilisation de techniques radioautographiques, basées sur l'injection d'acides aminés tritiés et permettant la visualisation des afférences du SL (Meibach et Siegel, 1977 ; Garris, 1979 ; Swanson et Cowan, 1979). L'utilisation de la peroxydase du Raifort, traceur axonal rétrograde, a permis de décrire les afférences au SL (Segal et Landis, 1974 ; Meibach et Siegel, 1977 ; Staiger et Nürnberger, 1989). Enfin, la lectine de *Phaseolus vulgaris*, traceur axonal antérograde utilisé depuis 1984 (Gerfen et Sawchenko, 1984), a permis une description plus précise des afférences du SL (Staiger et Wouterlood, 1990 ; Staiger et Nürnberger, 1991a, b ; Canteras et Swanson, 1992 ; Canteras et coll, 1992a, b ; Leranth et coll, 1992 ; Witter et coll, 1992). Ces différentes études ont conduit à l'établissement du concept selon lequel le SL constitue une aire d'interactions et de relais entre les structures limbiques et le diencephale. Il entretient, en particulier, des relations privilégiées et réciproques avec l'hippocampe et l'hypothalamus et forme un centre régulateur dans le complexe hippocampo-septo-hypothalamique.

2.1) Afférences au SL

Les neurones du SL sont la cible de fibres provenant du télencéphale, du diencephale, du mésencéphale et du rhombencéphale (figure 2A). Toutes les références citées ci-après concernent des études réalisées chez le rat, hormis les travaux de Staiger et Nürnberger (1989) et de Kalsbeek et coll (1993), réalisés respectivement chez le cobaye et le hamster doré.

Télencéphale : le SL est richement innervé par l'hippocampe (Raisman, 1966 ; Meibach et Siegel, 1977 ; Swanson et Cowan, 1977). L'innervation hippocampique a une distribution topographique bien déterminée. Les neurones pyramidaux des cornes d'Ammon (champs CA1, CA2 et CA3) et du subiculum empruntent le fornix dorsal et la fimbria avant

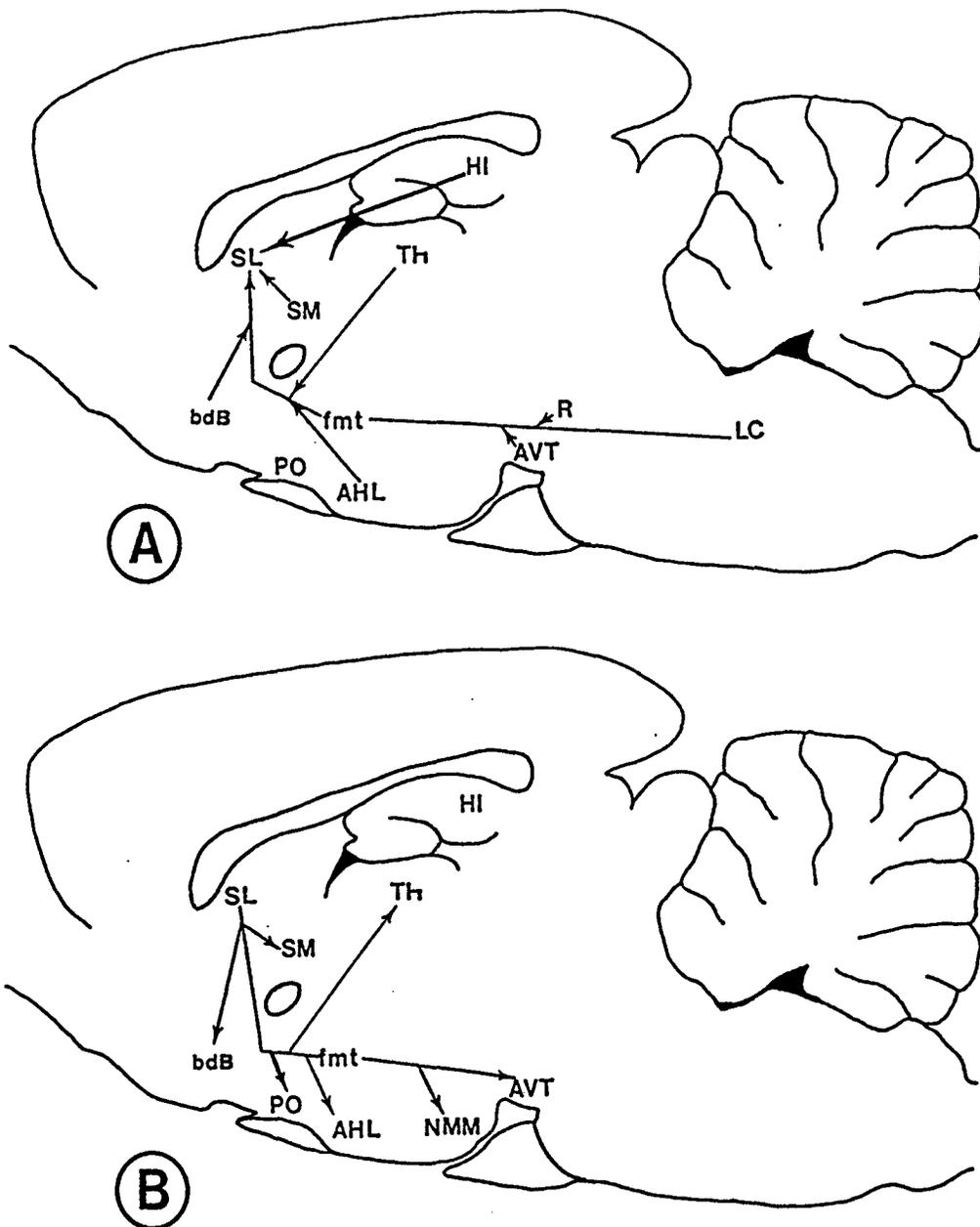


Figure 2 : Représentation schématique sur des coupes sagittales de cerveau des principales connexions du septum latéral. (A) Projections afférentes au SL. (B) Projections efférentes du SL.

de se terminer sur les neurones du SL et en particulier sur les neurones du SLd (Raisman, 1966 ; Swanson et Cowan, 1977, 1979 ; Malthe-Sorensen et coll, 1980). Les fibres issues des champs CA2, CA3 innervent, de façon bilatérale, les deux tiers du SL caudal, alors que les fibres issues des champs CA1 et du subiculum contactent plutôt, de manière ipsilatérale, les neurones du SL rostral (Swanson et Cowan, 1979). Ces afférences intéressent les corps cellulaires et les dendrites de neurones GABAergiques (Leranth et Frotscher, 1989), ou de neurones non identifiés (Swanson et Cowan, 1979). Les neurones du SLv ne reçoivent que peu d'afférences hippocampiques (Raisman, 1966 ; Swanson et Cowan, 1979). Canteras et Swanson (1992) ont récemment démontré la connexion directe du subiculum ventral avec le SLv, les parties adjacentes du SLi et le SF, via le fornix précommissural.

Dans le SLmi, les afférences hippocampiques, particulièrement importantes, sont préférentiellement dirigées sur les neurones pourvus d'épines somatiques, dont certains sont GABAergiques (Jakab et Leranth, 1990b).

Le SL reçoit des afférences provenant du SM, des bdB (parties horizontale et verticale), du NLST (région intermédiaire) et du noyau de l'amygdale médiane (Staiger et Nürnberger, 1989). Plus particulièrement, Canteras et coll (1992a) ont mis en évidence une relation entre le noyau postérieur de l'amygdale et le SLv.

Diencéphale : le SL est la cible d'afférences provenant de l'hypothalamus et du thalamus. Les relations hypothalamo-septales et thalamo-septales ont été décrites par différents auteurs (Raisman, 1966 ; Saper et coll, 1976, 1979 ; Buijs, 1978 ; Swanson et Cowan, 1979 ; Luiten et coll, 1982 ; Staiger et Nürnberger, 1989 ; Cullinan et Zaborszky, 1991 ; Kalsbeek et coll, 1993).

Les fibres d'origine hypothalamique parviennent au SL par le faisceau médian du télencéphale (Raisman, 1966). Elles sont issues de neurones localisés dans la région préoptique, le noyau suprachiasmatique, le noyau paraventriculaire (région parvocellulaire antérieure), le noyau périventriculaire, l'aire hypothalamique antérieure dorsale, l'aire hypothalamique postérieure et de quelques neurones du noyau ventromédian et du noyau arqué. Chez le cobaye, une innervation particulièrement importante, bilatérale, provient du noyau magnocellulaire dorsal (NMD ; Poulain, 1974 ; Poulain, 1983 ; Poulain et coll, 1984 ; Staiger et Nürnberger, 1989). Ce noyau est situé dans la région périfornicale, entre le faisceau du fornix et le noyau paraventriculaire. Il est exclusivement constitué de cellules enképhalinergiques

(Tramu et coll, 1981 ; Beauvillain et coll, 1982). Le tractus enképhalinergique hypothalamo-septal a son équivalent chez le rat (Onteniente et coll, 1989 ; Sakanaka et Magari, 1989), mais les neurones d'origine ne sont pas regroupés en un noyau distinct, ils sont disséminés dans la région périfornicale.

De nombreux neurones de la région prémammillaire se projettent également vers le SL (Staiger et Nürnberger, 1989). La dense innervation provenant de l'aire prémammillaire et se terminant sur les deux tiers des neurones du SLv caudal, mais également sur des neurones du SLi, a été récemment redéfinie par Canteras et coll (1992b).

Les fibres d'origine thalamique gagnent le SL via le faisceau médian du télencéphale. L'innervation du SL par le thalamus est faible. Quelques fibres provenant des noyaux reuniens, paraténial et paraventriculaire se terminent dans le SL (Raisman, 1966 ; Swanson et Cowan, 1979 ; Luiten et coll, 1982 ; Staiger et Nürnberger, 1989).

Mésencéphale : les neurones du SL sont également contactés par des fibres provenant de plusieurs régions du mésencéphale, et en particulier de l'aire ventrale tegmentale (Lindvall, 1975 ; Moore, 1978 ; Costa et coll, 1983 ; Staiger et Nürnberger, 1989).

Rhombencéphale : des connexions entre les fibres provenant du noyau du raphé (dorsal et médian) et du locus coeruleus et les neurones du SL ont été décrites par Fuxe (1965), Conrad et coll (1974), Lindvall (1975), Lindvall et Stenevi (1978), Moore (1978), Costa et coll (1983), Staiger et Nürnberger (1989).

2.2) Efférences du SL

Le SL établit des connexions directes avec le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale et le métencéphale (figure 2B). Les références citées ci-après concernent également des études réalisées chez le rat, sauf celles de Staiger et Nürnberger (1991a, b), réalisées chez le cobaye.

Les fibres efférentes quittent le SL par trois voies différentes : un groupe de fibres traverse les parties horizontale et verticale des bdB pour atteindre le faisceau médian du télencéphale; un autre groupe contourne le fornix précommissural au niveau du septum caudal pour se terminer dans les corps mammillaires ; enfin le dernier groupe de fibres, dont la distribution est

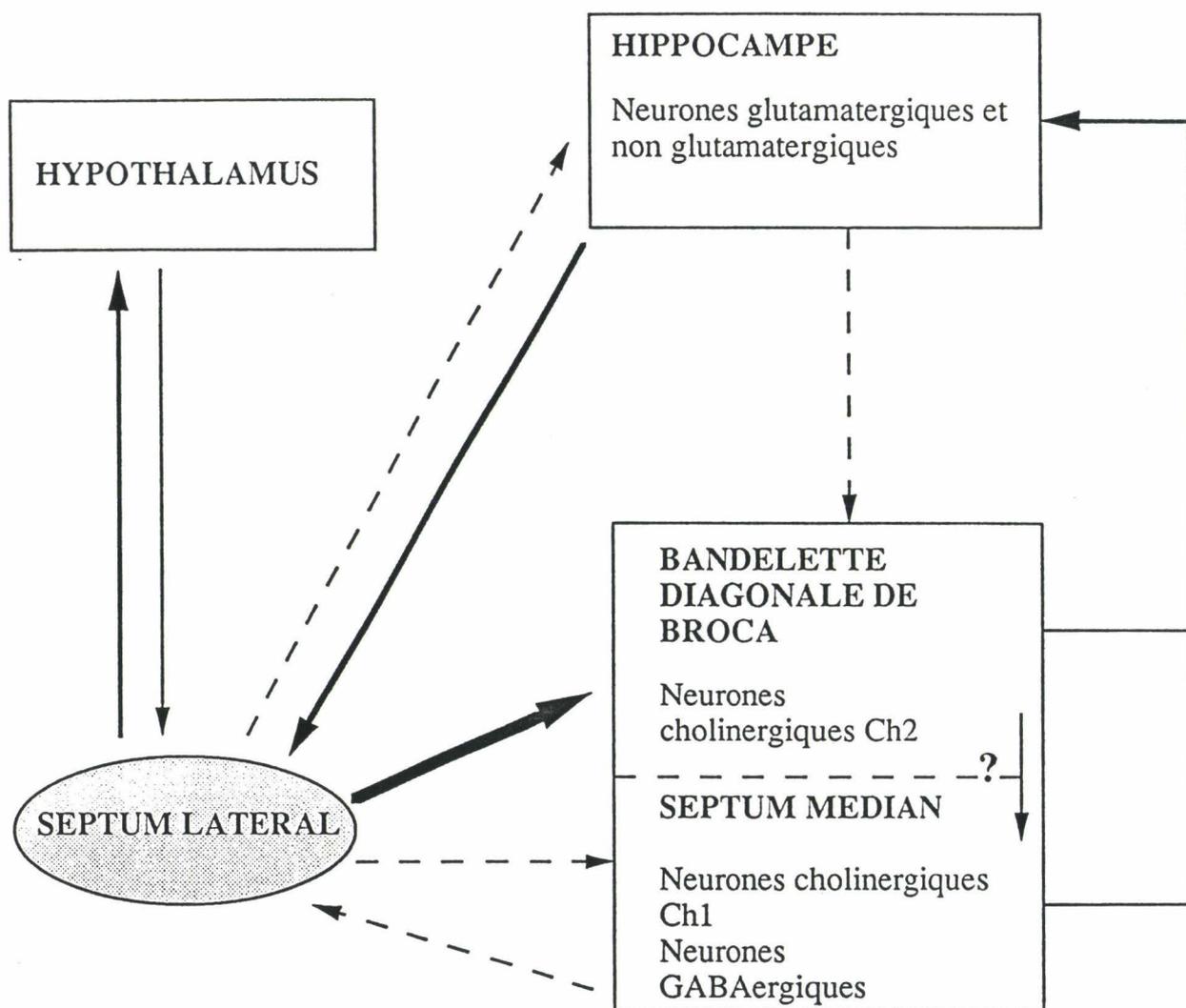


Figure 3 : Connexions du septum, de l'hippocampe et de l'hypothalamus.

un peu plus diffuse, s'arrange dans l'aire périventriculaire (Staiger et Nürnbergger, 1991a).

Téleencéphale : le SL entretient de nombreuses relations avec diverses régions du téleencéphale. La plus importante est sans conteste la relation septo-hippocampique, bien décrite par Raisman (1966) et Swanson et Cowan (1977, 1979). Ces auteurs soulignent le fait que le SLd et la partie dorsale du SLi se projettent vers le complexe SM/bdB, tandis que la partie ventrale du SLi et le SLv se projettent plutôt vers l'hypothalamus antérieur et médian. Comme le SL, nous l'avons vu, reçoit les projections de l'hippocampe et qu'en retour, les neurones du complexe SM/bdB se projettent vers l'hippocampe, le SL serait de la sorte impliqué dans une boucle septo-hippocampo-septale. Du fait de sa relation privilégiée avec l'hippocampe, comme l'ont détaillé Swanson et Cowan (1977, 1979), le SLd a fait l'objet de nombreuses études visant à déterminer précisément ses relations avec le complexe SM/bdB. Des études neuroanatomiques récentes (Staiger et Nürnbergger, 1991b ; Leranthe et coll, 1992 ; Witter et coll, 1992) ont montré que les neurones du SLd se projettent massivement vers la partie verticale des bdB, alors qu'ils n'innervent que faiblement les neurones du SM. De plus, Staiger et Nürnbergger (1991b) ont souligné l'existence d'une connexion directe entre le SL et certaines régions de l'hippocampe (champs CA1, CA3, subiculum).

En résumé, le circuit septo-hippocampo-septal peut être défini comme suit (figure 3) :

Les neurones pyramidaux de l'hippocampe, situés dans les cornes d'Ammon, se terminent sur des neurones GABAergiques et des neurones non identifiés du SL. Les neurones du SL, plus particulièrement du SLd, se projettent principalement vers la partie verticale des bdB et accessoirement vers le SM. Le retour vers l'hippocampe est assuré par des neurones cholinergiques et GABAergiques du complexe SM/bdB : ces neurones se projettent sur des cellules pyramidales et des interneurones localisés dans les champs CA2, CA3, CA4 de l'hippocampe (Hagino et Yamaoka, 1976 ; Swanson et Cowan, 1979 ; Amaral et Kurz, 1985 ; Freund et Antal, 1988 ; Leranthe et Frotcher, 1989 ; Kiss et coll, 1990 ; Stewart et Fox, 1990a b).

Le SL est également connecté avec d'autres régions du téleencéphale telles que le cortex cingulaire, le cortex infralimbique, le tubercule olfactif, l'amygdale, en particulier le noyau médian de l'amygdale (Leranthe et coll, 1992), le NLST (Raisman, 1966, Staiger et Nürnbergger, 1991b).

Diencéphale : les relations entre le SL et l'hypothalamus sont bien décrites et ont également fait l'objet de nombreuses études (Meibach et Siegel, 1977 ; Saper et coll, 1978 ; Garris, 1979 ; Berk et Finkelstein, 1981 ; Simerly et Swanson, 1986 ; Staiger et Nürnberger, 1991a ; Leranth et coll, 1992). Les neurones du SL se projettent massivement vers l'aire préoptique. Leranth et coll (1992) ont récemment souligné l'orientation préférentielle des fibres issues du SLi et du SLv vers les aires préoptiques latérale et médiale. Les neurones du SL innervent également le noyau périventriculaire hypothalamique, l'hypothalamus latéral, antérieur et dorsal. Quelques fibres sont également observées à proximité des noyaux paraventriculaire, supraoptique (Tribollet et Dreifuss, 1981 ; Sawchenko et Swanson, 1983 ; Oldfield et Silverman, 1985 ; Oldfield et coll, 1985 ; Tribollet et coll, 1985 ; Anderson et coll, 1990 ; Roland et Sawchenko, 1993) et suprachiasmatique (Watts et Swanson, 1987 ; Staiger et Nürnberger, 1991a) ; d'autres entourent le noyau ventromédian. Enfin, le SL se projette de manière dense vers la région mammillaire (Wouterlood et coll, 1988) et la région du noyau tubéromammillaire (Ericson et coll, 1991).

Quelques fibres en provenance du SL sont également observées dans des noyaux du thalamus (noyau paraventriculaire, noyau paratoénial, noyau reuniens) via le faisceau médian du télencéphale (Raisman, 1966).

Mésencéphale-Métencéphale : par rapport à l'abondance des fibres issues du SL qui se projettent vers l'hypothalamus, les fibres destinées au mésencéphale et au métencéphale sont beaucoup plus rares. Quelques fibres sont observées dans la substance grise périaqueducule (Staiger et Nürnberger, 1991b). D'autres sont également trouvées dans l'aire ventrale tegmentale, dans la substance noire, le noyau linéaire réticulé, le noyau interfasciculaire, et le noyau entopédonculaire. Les noyaux du raphé ne sont innervés que par de rares fibres (Marcinkiewicz et coll, 1989 ; Staiger et Nürnberger, 1991b).

II. Rôles du septum latéral

Comme cela a été rapporté dans le paragraphe précédent, le SL fait office de relais dans deux réseaux neuronaux fondamentaux. D'une part, le SL est intégré dans un circuit de rétroaction septo-hippocampo-septal. D'autre part, il relie l'hippocampe et l'axe préoptico-hypothalamo-mésencéphalique. Les relations qu'entretient le SL avec les centres télencéphaliques supérieurs et

le diencephale le placent à l'interface des processus comportementaux et motivationnels et des mécanismes de contrôle endocriniens.

Les rôles du SL, détaillés ci-après, ont été appréhendés, sauf indication contraire, chez le rat.

1 - Rôle du SL dans les processus de mémorisation et d'apprentissage

Alors que les données neuroanatomiques montrent bien l'existence d'un circuit septo-hippocampo-septal, il n'existe pas de données précises suggérant un rôle effectif de cette boucle de régulation. Cependant, il est supposé que cette boucle est impliquée dans les processus de mémorisation et d'apprentissage.

1.1) Rythme théta

Plusieurs hypothèses suggèrent l'intervention du septum dans la maintenance et/ou la régulation de la fréquence du rythme théta. L'hippocampe est considéré comme le générateur du rythme théta, qui est l'un des signaux de forte amplitude observé sur l'électroencéphalogramme lors de certains types de comportements. Le rythme théta est à associer aux processus de mémorisation et à la fonction d'apprentissage. Il semblerait que les neurones cholinergiques et GABAergiques du complexe SM/bdB, par leur activité rythmique (Bland et Bland, 1986), entraîneraient le rythme théta grâce aux connexions des neurones cholinergiques du complexe SM/bdB avec les cellules pyramidales et aux connexions des neurones cholinergiques et GABAergiques du complexe SM/bdB avec les interneurons de l'hippocampe (Stewart et Fox, 1990b). Le complexe SM/bdB serait en quelque sorte le "pace-maker" du rythme théta (Stewart et Fox, 1990b), bien que ce concept tende à être remis en cause et impliquerait la région prémammillaire (Krik et Naughton, 1991). Tout comme les cellules du SM/bdB, certaines cellules du SL ont des décharges en phase avec le rythme théta ; la signification fonctionnelle de ce rythme de décharge lent reste cependant à démontrer (Stewart et Fox, 1990a).

1.2) Potentialisation à long terme

Les neurones du SL présentent certaines particularités électrophysiologiques renforçant l'hypothèse de leur participation dans les

processus complexes de mémorisation. Diverses équipes (Racine et coll, 1983 ; Van den Hoof et coll, 1989a ; Stevens et Cotman, 1991 ; Garcia et Jaffard, 1992 ; Zheng et Gallagher, 1992) ont montré qu'une potentialisation à long terme peut être induite dans le SLd. La potentialisation à long terme est un phénomène bien décrit consistant en une augmentation soutenue de l'efficacité synaptique induite par des stimulations électriques de haute fréquence (Bliss et Lomo, 1973). Ce phénomène, qui est considéré comme le meilleur corrélat neurobiologique de la mémoire (Malinow et Tsien, 1990), est particulièrement bien étudié dans l'hippocampe, l'enjeu étant la détermination de sa nature pré- ou post-synaptique. Les travaux se concentrent surtout sur les courants membranaires associés aux récepteurs glutamatergiques (NMDA et non NMDA), lors d'une activation synaptique normale ou après potentialisation à long terme, ainsi qu'aux canaux calciques voltage-dépendants. Les récents travaux de Zheng et Gallagher (1992) indiquent que l'activation des récepteurs post-synaptiques du glutamate est nécessaire et suffisante pour induire la potentialisation à long terme dans le SLd.

Comme nous l'avons détaillé précédemment, les neurones du SL reçoivent une innervation hippocampique provenant de neurones localisés dans la corne d'Ammon (champs CA1, CA2, CA3) et dans le subiculum, via la fimbria-fornix. La majorité des neurones hippocampiques qui fournissent l'innervation du SL proviennent en majorité du champ CA3. Cette projection prend son origine dans les collatérales axoniques des neurones CA3, qui contribuent également à la projection de Schaffer, reliant les champs CA3-CA1 (Lorente de No, 1934 ; Andersen et coll; 1966 ; Swanson et coll, 1980). Comme la transmission de l'information dans ce système de collatérales de Schaffer s'effectue par un acide aminé excitateur (Storm-Mathisen, 1977 ; Nadler et coll, 1978 ; Collingridge et coll, 1983), il est proposé que le même acide aminé excitateur soit responsable de la transmission monosynaptique de l'information de l'hippocampe vers le SL (De France et coll, 1976 ; Storm-Mathisen et Woxen-Opsahl, 1978 ; Joëls et Urban, 1984a, b ; Storm-Mathisen et Ottersen, 1984). Le neurotransmetteur impliqué dans la relation hippocampo-septale est le glutamate (Storm-Mathisen et Woxen-Opsahl, 1978 ; Zaczek et coll, 1979 ; Walaas et Fonnum, 1980 ; Joëls et Urban, 1984a, b ; Stevens et Cotman, 1986 ; Jaskiw et coll, 1991) et il agit sur des récepteurs NMDA et des récepteurs non-NMDA présents sur des neurones et des interneurones inhibiteurs du SL (Gallagher et Hasuo, 1989a, b ; Van den Hoof et coll, 1989a ; Rogers et coll, 1991 ; Garcia et Jaffard, 1992 ; Zheng et Gallagher, 1992).

Donc, par ses afférences glutamatergiques en provenance de l'hippocampe et une transmission synaptique capable de potentialisation à long terme, le SL pourrait jouer un rôle crucial dans les processus de mémorisation et dans les fonctions comportementales impliquant ce processus (Numan et Quaranta, 1990).

2 - Rôle du SL dans l'émotivité et l'agressivité

La réalisation de lésions dans la région septale a permis de mettre en évidence les nombreuses implications de cette structure dans divers comportements d'ordre émotionnel (Grossman, 1976). En raison de la réciprocité étroite entre le SL et l'hippocampe, il apparaît difficile de distinguer laquelle de ces structures est à l'origine d'un comportement particulier. La revue de Gray et Mc Naughton (1983) montre toutefois qu'en plus d'un syndrome "septo-hippocampique", qui se manifeste indifféremment lors de la lésion du SL ou de l'hippocampe, il existe des syndromes spécifiques propres à chacune des régions. Alors que l'hippocampe, par l'existence du rythme thêta, est directement impliqué dans les fonctions de mémorisation et d'apprentissage, le SL pourrait intervenir en leur attribuant une composante émotionnelle (Thomas, 1988). La théorie de Gray (1982) indique que la boucle septo-hippocampique comporte un système inhibiteur du comportement, dont l'activité régule l'anxiété. Diverses approches expérimentales ont mis en évidence le rôle propre du SL dans l'émotion et plus particulièrement dans les états anxieux (revue dans Yadin et coll, 1993). Ainsi, les enregistrements d'activités cellulaires unitaires ou multiples de neurones du SL, obtenus pendant l'étape de conditionnement de l'animal, sont étroitement corrélés à son état émotionnel (Thomas et Yadin, 1987 ; Yadin et Thomas, 1981). De plus, des substances ayant une action anxiolytique peuvent moduler l'activité des neurones du SL via des récepteurs aux benzodiazépines, particulièrement nombreux dans cette région (Squirres, 1977). L'effet des anxiolytiques dans le SL est semblable à celui provoqué par une stimulation électrique ; il entraîne une réduction, voire une suppression des états de peur, de crainte et d'anxiété (Yadin et coll, 1993 ; Thomas et coll, 1991 ; Thomas, 1988). La régulation des états émotionnels liés à l'anxiété peut avoir des conséquences majeures car elle participe directement ou indirectement à l'acquisition d'autres comportements. Ainsi, le SL intervient dans des comportements liés à la reproduction, où l'influence des états émotionnels est prépondérante.

Par ailleurs, l'influence du SL dans les comportements affectifs et agressifs est connue depuis longtemps et a été étudiée chez différentes espèces. Il est bien établi que des lésions du SL mènent à un état d'hyperactivité (Albert et Richmond, 1976 ; Brutus et coll, 1984, chez le chat) associé aux comportements agressifs et défensifs (Miczek et Grossman, 1972 ; Blanchard et coll, 1977). Pour ces types de comportement, les relations entre le SL et l'hypothalamus semblent essentielles (Stoddard-Apter et Mc Donnel, 1983 ; Ferris et coll, 1990). Des travaux récents (Koolhaas et coll, 1991 ; Compaan et coll, 1993) ont souligné l'importance de l'innervation vasopressinergique du SL sur le comportement agressif du rat et de la souris. Chez le hamster mâle, un comportement particulier, mettant en jeu une forme de communication olfactive par des sécrétions des glandes du flanc, est commandé par le SL (Ferris et coll, 1990). Ce comportement apparaît plus particulièrement lors d'échanges agressifs entre congénères et est exacerbé lors de microinjections de vasopressine dans le NLST/SL.

3 - Rôle du SL dans les processus psychoneuroendocrines

Les destructions sélectives de populations cellulaires du SL, à l'aide de différentes neurotoxines (travaux réalisés par l'équipe de Nance), ont permis de mieux appréhender son rôle dans la modulation de certains processus psychoneuroendocrines. Ces processus complexes demandent la synergie de systèmes endocrines et autonomes. Ils sont le résultat d'interactions entre les événements endocrines et les situations environnementales, sociales et psychologiques. Parmi les processus psychoneuroendocrines dans lesquels le SL est directement impliqué, il faut citer ceux liés au comportement de lordose et au comportement alimentaire. Ces deux comportements sont dépendants des hormones stéroïdes sexuelles.

3.1) Comportement de lordose

Il est classiquement établi que des lésions électrolytiques du SL chez des rattes engendrent une facilitation du comportement de lordose (Nance et coll, 1974, 1977). En effet, la destruction du SL, ou l'interruption de ses voies descendantes, réduisent la quantité d'oestradiol nécessaire pour une réponse maximale du comportement de lordose (Nance et coll, 1975 ; Nance, 1983, Yamanouchi et Arai, 1990 ; Sakuma, 1992). Le SL est donc à l'origine de la plus forte influence inhibitrice qui s'exerce sur ce comportement. Cependant,

les travaux de Nance (1983) et de King et Nance (1985, 1986a) ont clairement montré que l'influence du SL est plus complexe. Il serait à la fois impliqué dans un contrôle inhibiteur et dans un contrôle facilitateur du comportement sexuel de la femelle. Il est donc probable que le comportement de lordose soit régulé par au moins deux systèmes de contrôle localisés dans le SL, dont l'action est indépendante et dont les substrats neuroanatomiques ne sont pas encore totalement définis.

3.2) Comportement alimentaire

Bien que l'hypothalamus ventromédian soit l'un des sites majeurs de la régulation sexuellement dimorphique du comportement de prise de nourriture, certains aspects du contrôle neuronal de ce comportement sont également régulés par le SL (Nance, 1976 ; King et Nance, 1986b). En effet, la destruction du SL par l'acide kaïnique conduit à une augmentation de la prise alimentaire et donc à une augmentation du poids (Wetmore et Nance, 1991) et de plus, atténue l'effet anorexique des oestrogènes (King et Nance, 1986b). Le SL, et plus particulièrement le SLi et le SLv, pourrait réguler les effets des oestrogènes sur le comportement de prise de nourriture par des connexions directes ou indirectes avec l'hypothalamus médiobasal (King et Nance, 1985).

4 - Rôle du SL dans la régulation des fonctions antéhypophysaires

Les sécrétions antéhypophysaires sont régies par l'intervention de facteurs stimulants ou inhibiteurs, de nature principalement peptidergique, qui sont libérés dans les capillaires perméables de l'éminence médiane. Ces facteurs sont sécrétés par des neurones parvicellulaires dispersés dans le complexe SM/bdB, l'aire préoptique et l'hypothalamus. Ces neurones peuvent subir l'influence du SL par l'intermédiaire de relations neuroanatomiques directes ou indirectes, qui ne sont pas encore parfaitement élucidées.

Les relations que le SL entretient avec les neurones localisés dans les noyaux paraventriculaires hypothalamiques, ainsi qu'avec les neurones du noyau périventriculaire hypothalamique (Staiger et Nürnberger, 1991a), l'impliquent dans la régulation de la libération de CRF et de somatostatine (Saphier et Fellman, 1987 ; Herman et coll, 1992). Cela expliquerait le rôle modulateur joué par le SL dans la sécrétion d'ACTH et sur le stress (Seggie et Brown, 1971, 1976 ; Seggie et coll, 1973).

Par ses relations avec l'hypothalamus médiobasal, le SL interviendrait dans la régulation de la sécrétion de GHRH et donc dans celle de GH (Borer et coll, 1977), fait qui peut être mis en rapport avec son rôle déjà signalé dans la prise de poids.

Il est établi (Flerko, 1966) que les structures limbiques, amygdale et hippocampe, exercent des actions contraires de stimulation et d'inhibition sur la sécrétion des hormones gonadotropes. Le SL, par ses relations privilégiées avec l'hippocampe et par ses projections descendantes, constitue un relais pour recevoir et amplifier les influences hippocampiques inhibitrices et pour les transférer au complexe SM/bdB et à l'aire préoptique (Hagino et Yamaoka, 1976). Or, ces deux régions renferment les neurones synthétisant la LHRH, chez le cobaye (Barry et coll, 1973) et chez le rat (Merchenthaler et coll, 1984). De plus, l'aire préoptique est le siège de la rétroaction des hormones gonadiques. Il y a été montré, chez le cobaye, une colocalisation des récepteurs à la progestérone et aux oestrogènes (Warembourg, 1989). Cette région contient les structures à l'origine des mécanismes assurant le déclenchement du pic ovulatoire de LH (Everett, 1965). Le SL, à côté de l'aire préoptique et de l'hippocampe, est également une structure sensible à la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques agissant en synergie au moment de l'ovulation (Kawakami et coll, 1978). Bien que l'ovulation ne soit pas supprimée si l'aire préoptique est privée de ses afférences septales (Taleisnik et coll, 1970), le rôle du SL dans la fonction LH est reconnu depuis longtemps (Hagino et coll, 1977 ; Kalra, 1986 ; Halaz et coll, 1989). En particulier, la lésion du SL altère la cyclicité vaginale et augmente l'hypertrophie compensatoire ovarienne chez la ratte (Nance, 1983 ; King et Nance, 1986a).

5 - Rôle du SL dans la régulation des fonctions posthypophysaires

Les sécrétions posthypophysaires, vasopressine et ocytocine, sont issues de neurones magnocellulaires hypothalamiques localisés dans les limites des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Bien que les connexions neuroanatomiques entre le SL et les neurones synthétisant la vasopressine et l'ocytocine ne sont pas encore clairement identifiés - le SL innerve principalement la périphérie des noyaux magnocellulaires - des arguments électrophysiologiques montrent l'intervention du SL dans l'activité électrique de ces neurones (Poulain et coll, 1980, 1981 ; Cirino et Renaud, 1985). D'autre part, certains neurones du SL_{ml}, sensibles à l'ocytocine, montrent une activité électrique en relation avec celle des neurones à ocytocine (Moos et

coll, 1991 ; Lambert et coll, 1993). Ces résultats suggèrent fortement l'intervention du SL dans les mécanismes dépendants de l'ocytocine, en particulier au cours du réflexe d'éjection du lait lors de la tétée (Lebrun et Poulain, 1982 ; Neuman et Landgraf, 1989). Bien qu'une telle intervention soit indéniable, il est acquis que le SL n'est pas une structure essentielle pour le déclenchement et le maintien du réflexe d'éjection du lait (Lebrun et coll, 1983).

6 - Rôle du SL dans le contrôle d'autres fonctions

Le SL contribue également au contrôle central du système immunitaire (Wetmore et Nance, 1991). En effet, les lésions du SL par l'acide kainique provoquent une suppression de l'immunité humorale chez des rattes (Wetmore et Nance, 1991). Ces altérations de la fonction immunitaire sont souvent accompagnées de variations dans les taux d'hormones stéroïdes sexuelles (Grossman, 1984 ; Visilakis et coll, 1974). Les mécanismes selon lesquels les hormones sexuelles influencent l'immunité ne sont pas encore parfaitement élucidés.

Enfin, le SL contrôle des fonctions autonomes telles que la fièvre (Stuart et coll, 1961 ; Brück et Zeisberger, 1987 ; Cooper, 1987), les processus thermophysologiques impliqués dans l'hibernation (Lee et coll, 1989) et la réponse cardiovasculaire (Calaresu et coll, 1976).

En conclusion, cette brève analyse des fonctions du SL révèle que :

- le SL est directement relié à l'expérience émotionnelle par ses rapports avec l'hippocampe;

- le SL est étroitement corrélé à l'état fonctionnel de l'hypothalamus ;

- le SL intervient comme un élément d'intercommunications entre plusieurs systèmes :

- en apportant une dominante émotionnelle et/ou agressive dans différents comportements,

- en jouant un rôle pivot dans l'interdépendance d'événements internes, environnementaux, psychologiques et neuroendocrines,

- en intervenant à la fois dans les processus psychoneuroendocrines et dans les mécanismes immunitaires, deux systèmes en très forte interaction ;

-la plupart des systèmes placés sous l'influence du SL sont modulés par les stéroïdes sexuels.

Objectifs

Les implications du SL dans diverses fonctions sont étroitement dépendantes de la nature de ses **afférences**, des **propriétés électriques** de ses neurones ainsi que de leur **nature chimique**.

Au sein du SL, la subdivision apportée par Jakab et Leranath (1990a), le **SLml**, doit retenir toute l'attention. Chez le rat, le **SLml** est défini par la présence d'une population neuronale, représentant 20% de la population totale, caractérisée par la présence d'épines somatiques. Ces neurones sont la cible privilégiée des afférences glutamatergiques provenant de l'hippocampe (Jakab et Leranath, 1990a). Ces mêmes neurones reçoivent la convergence de multiples afférences de nature chimique définie (Jakab et Leranath, 1990b ; Jakab et Leranath, 1991; Jakab et coll, 1991a ; Jakab et Leranath, 1993). En plus de ces afférences, le **SLml**, chez le rat et le cobaye, fait partie des régions du SL qui sont richement innervées par le tractus enképhalinergique hypothalamo-septal. Chez le rat, la plupart des neurones à épines somatiques sont GABAergiques (Jakab et Leranath, 1990b) et sont immunoréactifs pour la calbindin-D28K (CaBP : Jakab et coll, 1991b). Parmi les études neuroanatomiques précédemment citées, concernant les projections efférentes du SL chez le rat et le cobaye, celles qui intéressent précisément le **SLml**, ainsi que des études réalisées récemment au laboratoire chez le cobaye (Varoqueaux, 1991), montrent que le **SLml** établit des relations privilégiées directes avec les régions hypothalamiques impliquées dans le contrôle des fonctions neuroendocrines.

Il apparaît donc (figure 4) que le SLml constitue une région déterminante par :

- 1) ses afférences glutamatergiques provenant de l'hippocampe ;**
- 2) ses afférences de nature diverse convergeant vers les neurones innervés par les fibres hippocampiques ;**
- 3) ses afférences enképhalinergiques provenant de l'hypothalamus ;**
- 4) ses afférences principalement dirigées vers l'hypothalamus, l'impliquant dans de probables régulations neuroendocrines.**

L'ensemble de ces données suggère fortement le rôle intégrateur que peuvent jouer les neurones du **SLml** au sein du complexe hippocampo-septo-hypothalamique. Ils sont au premier plan pour jouer un rôle de modulation des informations provenant de l'hippocampe et d'autres régions du cerveau et un

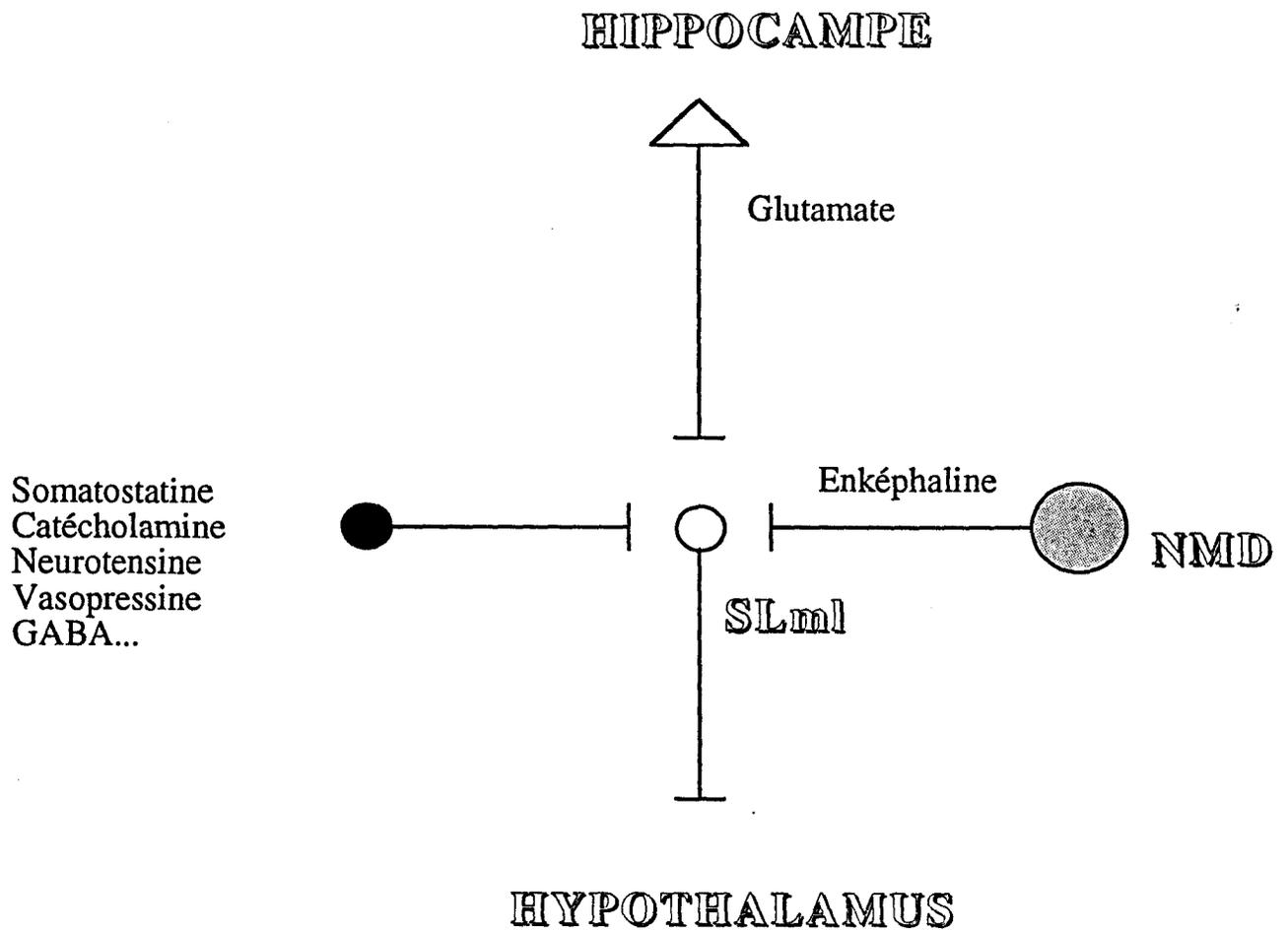


Figure 4 : Principales connexions du SLml soulignant son rôle intégrateur dans le complexe hippocampo-septo-hypothalamique.

rôle de transfert de ces informations vers les aires à potentialité neuroendocrines.

Le but principal de ce travail est d'étudier les neurones du SLml chez le cobaye. Le choix de l'espèce répond à deux exigences. D'abord et surtout, le cobaye est l'animal choisi au laboratoire pour étudier le fonctionnement et le rôle du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal. Dans cette espèce, le NMD, qui est à l'origine du tractus, présente un aspect compact qui se prête à des recherches de tous ordres. Ensuite, l'expérience acquise au laboratoire a prouvé que les enregistrements électrophysiologiques in vitro sur tranches de cerveau, qui sont à la base d'une partie du travail, étaient facilités par l'utilisation de cette espèce.

Les questions posées allaient dans deux directions :

Sur le plan morphologique, il n'existait pas de description immunocytochimique détaillée permettant de vérifier si le SL du cobaye recevait les mêmes afférences que celles décrites chez le rat. D'autre part, il était intéressant de préciser, chez le cobaye, la distribution de la CaBP et d'autres substances telles que la parvalbumine (PV) et la NADPH-diaphorase (ND), dont l'étude dans le système nerveux central se développe depuis peu, étant donné l'action neuroprotectrice qu'elles exercent.

Sur le plan électrophysiologique, les données concernant les propriétés membranaires de base et les types de décharge des neurones du SLml étaient quasiment inexistantes. Il n'existait pas d'études qui permettent de relier la physiologie du neurone à sa morphologie, à son innervation préférentielle, à son contenu immunocytochimique.

Pour cela, les buts du présent travail ont été de réaliser chez le cobaye :

1) une étude descriptive de la nature chimique des afférences du SLml et du contenu en substances neuroprotectrices de ses neurones. Pour cela, des techniques de simple et double marquages immunocytochimiques et histochimiques ont été réalisées. **Les résultats de cette étude sont rapportés et discutés dans le chapitre I.**

2) une étude morpho-fonctionnelle associant l'étude détaillée des propriétés électrophysiologiques des neurones du **SLml** et l'étude de leurs caractéristiques morphologiques. Pour répondre à ce deuxième point, la technique des tranches de SL maintenues in vitro a été utilisée. L'accessibilité et la stabilité des préparations a permis d'effectuer des enregistrements des neurones en intracellulaire, suivis d'injections intracellulaires de marqueurs, avant de soumettre les neurones à divers protocoles immunocytochimiques. **Les résultats de ce travail sont présentés et discutés dans le chapitre II.**

Matériel et Méthodes

I. Sujets expérimentaux

Les expériences ont été menées sur des cobayes femelles tricolores (*Cavia porcellus* L.) provenant de l'élevage Cob Labo Cap (Yffiniac, FRANCE). Dans l'animalerie, les animaux sont soumis à un rythme d'éclairage de 12h/12h, à une température de 18°-20° C et ont libre accès à la nourriture et à la boisson.

II. Techniques immunocytochimiques et histochimiques

1 - Techniques histologiques

1.1) Anesthésie et fixation

Des cobayes adultes de 350 à 400 g ont été utilisés. Après une anesthésie avec un mélange de Rompun/Xylazine (Bayer, 0,2 ml/kg) et de Kétamine (Kétalar 50, Parke Davis, 20 mg/kg), le cerveau est fixé par injection intracardiaque d'une solution de fixateur.

L'animal est placé en décubitus dorsal. Après avoir ouvert la cage thoracique, le coeur est délicatement dégagé du péricarde. Une incision est effectuée à la pointe du ventricule gauche ainsi qu'à l'oreillette droite pour permettre l'évacuation du sang. Puis une canule est enfoncée profondément dans le ventricule, jusqu'à ce que son extrémité atteigne la lumière aortique. Avant le passage du fixateur, le système circulatoire de l'animal est lavé par 200 ml de solution physiologique (NaCl 0,9%) contenant de l'héparine. Ce lavage élimine le sang des vaisseaux irriguant le cerveau. Cinq cents ml de fixateur sont ensuite injectés pendant 30 min. Le fixateur utilisé est le PAF (Paraformaldehyde Picric Acid, Stefanini et coll, 1967) préparé comme suit :

* 20 g de paraformaldéhyde : PFA (Merck) sont ajoutés à 150 ml d'acide picrique saturé à 60°C et le précipité est dissous par l'adjonction de NaOH 1N.

* le mélange est complété à 1 litre par du tampon phosphate 0,1M, pH 7,4 (TP). La concentration finale de PFA est de 2%.

Dès que la perfusion est terminée, l'animal est décapité et le cerveau délicatement disséqué. La région septale est isolée par deux sections transversales effectuées à main levée, éliminant ainsi les bulbes olfactifs, le cervelet et le tronc cérébral.

Les blocs de cerveau sont ensuite post-fixés 2 h par immersion dans le même fixateur à 4°C, puis lavés pendant 24 h dans plusieurs bains de tampon Coons contenant 20% de saccharose.

Le tampon Coons (pH 7,2) est composé de Véronal sodique (4g), NaCl (17g), HCl 1N (70 ml), azide de sodium (1,25g), dissous dans 1 l d'eau distillée. La solution est diluée de moitié au moment de l'emploi.

1.2) Inclusion et congélation

Les blocs de cerveau sont ensuite déposés dans une petite boîte confectionnée par pliage d'une feuille d'aluminium, puis enrobés dans du Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, Illinois). L'ensemble est plongé dans du méthyl-2-butane (Merck, Darmstadt, Allemagne) refroidi à -160°C par l'azote liquide. Les blocs congelés sont ensuite stockés à -80°C.

1.3) Confection et conservation des coupes

Les blocs de tissu sont débités en coupes de 12 µm à l'aide d'un cryostat (Reichert-Jung, 2800 Frigocut). Ces coupes sont collées sur des lames traitées à la gélatine-alun de chrome.

La réalisation des lames gélatinées s'effectue selon le protocole suivant :

* les lames sont trempées dans de l'eau tiède contenant un détergent tel que le RBS (2%) pendant une nuit.

* après un lavage à l'eau courante pendant 2 à 4 h, les lames sont trempées 2 à 3 min dans le milieu gélatiné. Ce milieu est formé d'un litre d'eau distillée portée à 90°C dans laquelle 2g d'alun chrome et 6g de gélatine sont dissous. Le mélange est porté à ébullition sous agitation, puis filtré et refroidi jusqu'à 60-70°C avant utilisation.

* les lames sont mises à sécher à l'étuve (37°C), puis sont conservées en chambre froide.

Des coupes adjacentes sont récupérées sur des lames réparties en 10 séries. Comme toutes les séries ne sont pas traitées le même jour, les différentes séries sont emballées dans du papier aluminium et stockées à -80°C.

Ce procédé permet de conserver les coupes pendant plusieurs mois sans altérer l'immunoréactivité.

Des coupes de 25 µm ont été également réalisées au cryotome (microtome Leitz 1300 et Kryomat Leitz 1700)

2 - Réactions immunocytochimiques

2.1) Principe

Les anticorps utilisés sont soit des anticorps du commerce, soit des anticorps fabriqués par le Dr G. Tramu (tableau 1). Les immunosérums spécifiques utilisés sont soit polyclonaux et ont été préparés chez le lapin, soit monoclonaux et ont été préparés chez la souris.

La technique indirecte a été utilisée dans notre étude. Cette technique se déroule en deux étapes :

- 1) application de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène tissulaire, produit chez le lapin ou la souris;
- 2) application en excès de l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin ou chèvre anti-souris).

Tableau 1 : Origine et dilution des anticorps primaires : (P) Anticorps Polyclonaux , (M) Anticorps Monoclonaux.

Anticorps primaires	Origine	Dilution
Somatostatine (P)	Dr Tramu	1/300ème
Neurotensine (P)	Dr Tramu	1/800ème
Tyrosine hydroxylase (P)	Institut J. Roy	1/800ème
Vasopressine (P)	Dr Czernichow	1/400ème
Met-enképhaline (P)	Dr Tramu	1/600ème
Parvalbumine (M)	Sigma	1/200ème
Calbindin-D28K (M)	Sigma	1/100ème
GABA (P)	Dr Tramu	1/1000ème

Les anticorps secondaires utilisés (tableau 2), sont des fragments Fab d'immunoglobulines dirigés contre le fragment Fc de l'anticorps primaire. Les anticorps secondaires sont couplés soit à la peroxydase du raifort (peroxydase), soit à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), soit à la tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (TRITC). Le FITC produit une

fluorescence dans les verts alors que le TRITC produit une fluorescence dans les rouges (tableau 3).

Tableau 2 : Marqueurs, origine et dilution des anticorps secondaires

Anticorps secondaires	Marqueurs utilisés	Origine	Dilution
F(ab) chèvre anti IgG (H+L) de lapin	peroxydase	Biosys	1/100ème
F(ab') ₂ chèvre anti IgG de souris	peroxydase	Jackson	1/100ème
F(ab') ₂ chèvre anti IgG de lapin	TRITC	Jackson	1/100ème
F(ab) chèvre anti IgG (H+L) de souris	TRITC	Pierce	1/100ème
F(ab) chèvre anti IgG (H+L) de lapin	FITC	Jackson	1/100ème
F(ab') ₂ chèvre anti IgG (H+L) de souris	FITC	Jackson	1/100ème

Tableau 3 : Caractéristiques des filtres utilisés avec l'Axiophot pour les observations en fluorescence.

Fluorochrome	FITC	TRITC
Filtre d'excitation	BP 450-490	BP 546
Division chromatique	FT 510	FT 560
Filtre d'arrêt	BP 515-565	BP 575 640

2.2) Protocole expérimental

* Rinçage des coupes de 12 µm réalisées au cryostat et collées sur lames gélatinées dans du tampon Coons pendant 10 à 15 min à température ambiante.

* Application de l'anticorps primaire pendant 12 h à température ambiante, dans une atmosphère saturée en eau afin d'éviter toute évaporation.

Les dilutions utilisées diffèrent selon les anticorps primaires et sont indiquées dans le tableau 1.

Les dilutions sont réalisées dans du tampon Coons contenant 0,1% de sérum albumine bovine : BSA (Sigma) et 0,25% de Triton X-100 (Sigma).

* Rinçages des lames dans 3 bains de tampon Coons pendant 10 min.

* Application de l'anticorps secondaire à température ambiante pendant 90 min. L'anticorps secondaire est dilué au 1/100e dans du tampon Coons.

* Rinçages des lames dans le même tampon.

* Révélation de l'anticorps secondaire et montage des lames. Différents anticorps secondaires ont été utilisés en fonction des réactions immunocytochimiques réalisées (tableau 2).

Lors de l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à la FITC ou au TRITC, les lames sont montées dans un mélange constitué de 90 ml de glycérine, de 10 ml de TP contenant 0,9% de NaCl (TPS) et de 100 mg de p-phénylènediamine (Sigma, St Louis, MO, USA) selon le protocole de Platt et Michael (1983). Ce milieu empêche la rapide extinction de la fluorescence qui est observée lorsque la glycérine est employée seule comme milieu de montage.

L'emploi d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase nécessite l'utilisation d'un tampon Coons modifié pour les rinçages et les dilutions. Le tampon Coons normalement utilisé est remplacé par du tampon Coons dépourvu d'azide de sodium et contenant 0,05% de Triton X-100. L'azide de sodium, utilisé comme antifongique, provoque en effet une baisse considérable du marquage peroxydasique.

Afin de révéler l'activité peroxydasique, trois chromogènes différents sont utilisés : la 3, 3'-diaminobenzidine tétra-HCl (DAB), le 4-chloro-1-naphtol et la 3-amino-9-éthylcarbazole donnant respectivement des précipités brun, bleu profond et rouge vif. Le substrat est l'H₂O₂.

- Utilisation de la DAB (Graham et Karnovsky, 1966) -

Cinq mg de DAB (Sigma) sont dissous dans 10 ml de tampon TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,6 et 10 µl d'H₂O₂ (30%) sont ajoutés au milieu. Après filtration, cette solution est appliquée sur les lames pendant 1 min environ et l'apparition du précipité brun est suivie au microscope. La réaction est stoppée dans de l'eau distillée. Après déshydratation, les lames sont éclaircies dans le toluène et montées dans l'Eukitt (Kinder, Allemagne).

- Utilisation du 4-chloro-1-naphtol (Nakane, 1968) -

Quatre mg de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) sont dissous dans 100 µl de N, N-diméthylformamide (Merck), ajoutés à 10 ml de tampon TRIS-HCl, 0,1 M,

pH 7,6. Le précipité floconneux qui se forme est éliminé par filtration. L'addition de 10 µl d'H₂O₂ (30%) fait apparaître un précipité bleu-violet en quelques minutes. Les lames sont ensuite montées dans le mélange glycérine-p-phénylènediamine.

- Utilisation du 3-amino-9-éthylcarbazole (Boorsma, 1984) -

Quatre mg de 3-amino-9-éthylcarbazole (Sigma) sont dissous dans 100 µl de N, N-diméthylformamide et ajoutés à 10 ml de tampon acétate de sodium 0,05 M, pH 5. La solution est filtrée et additionnée de 10 µl d'H₂O₂ (30%). Après rinçage, les lames sont montées dans le mélange glycérine-p-phénylènediamine.

Les coupes sont observées à l'aide d'un photomicroscope (Zeiss Axiophot) équipé pour l'épifluorescence, puis photographiées (Agfapan 25 ; Fujichrome Velvia 50). Les caractéristiques des filtres utilisés pour la fluorescence sont reportées dans le tableau 3.

3 - Mise en évidence de la NADPH-diaphorase

Les coupes de 25 µm réalisées au cryotome sont préincubées 1 h dans une solution de TRIS-HCl, 0,1M, pH 8 contenant 0,1% de Triton X-100. Elles sont ensuite incubées 1 à 2 h dans une solution de TRIS-HCl, 0,1M, pH 8 contenant 0,3% de Triton X-100, 2,2 mM de ND (Sigma) et 0,6 mM de nitrobleu tetrazolium (Sigma) à température ambiante. La ND réduit le nitrobleu tetrazolium en un produit de réaction bleu. L'apparition de ce précipité sur la coupe est contrôlée sous microscope. Dès que la réaction est terminée, les coupes sont rinçées 3 fois 5 min dans du tampon Coons puis montées sur lames dans le mélange glycérine-p-phénylènediamine.

Les coupes sont observées à l'aide de l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25 ; Fujichrome Velvia 50).

4 - Réactions multiples

Des doubles et des triples marquages immunocytochimiques ont été obtenus sur des coupes de 12 µm réalisées au cryostat. Le protocole de base ne diffère pas de celui qui a été décrit précédemment (paragraphe II, 2.2)

4.1) Détection simultanée de la calbindin-D28 K et de la met-enképhaline

La solution d'anticorps primaires est constituée d'un cocktail d'anticorps dirigés contre la CaBP et contre la met-enképhaline (tableau 1). Après plusieurs rinçages, les coupes sont incubées avec le cocktail d'anticorps secondaires suivant : des anticorps secondaires couplés avec le FITC pour révéler la CaBP et des anticorps secondaires couplés à la TRITC pour révéler la met-enképhaline (tableau 2).

4.2) Détection simultanée de la NADPH-diaphorase, de la calbindin-D28 K et de la met-enképhaline

Dans un premier temps, l'activité ND est révélée en utilisant la technique décrite dans le paragraphe II, 3. Puis, après plusieurs rinçages dans du tampon Coons, les coupes sont incubées avec le cocktail d'anticorps primaires décrit ci-dessus. Après plusieurs rinçages, les coupes sont incubées avec le cocktail d'anticorps secondaires suivant : des anticorps secondaires couplés à la peroxydase pour mettre en évidence la CaBP (révélation avec la DAB ou avec la 3-amino-9 éthylcarbazole) et des anticorps secondaires couplés à la FITC pour visualiser la met-enképhaline.

4.3) Spécificité des réactions immunocytochimiques

La spécificité des réactions de double ou triple marquage est vérifiée par la réalisation de certains contrôles immunocytochimiques. Ces contrôles consistent en :

- l'omission d'un des anticorps primaires ;
- l'omission d'un des anticorps secondaires ;
- l'omission de tous les anticorps primaires ;
- l'omission de tous les anticorps secondaires ;
- le remplacement de l'anticorps primaire par du sérum non immun ;
- la suppression du chromogène lors de la révélation histochimique.

Ces contrôles sont essentiels pour évaluer la spécificité des anticorps primaires utilisés et la qualité du marquage immunocytochimique. Ils permettent également d'évaluer la qualité des préparations (présence d'autofluorescence, activité enzymatique endogène) et d'évaluer la

performance des systèmes de détection (détection de marqueurs fluorescents libres, de réactions croisées).

III. Techniques d'imprégnation argentique

L'imprégnation argentique de neurones du SL a été réalisée sur des cerveaux de cobayes femelles adultes (380-400g). Deux techniques d'imprégnation ont été choisies.

1 - Technique de Mac Mullen et Almli (1981)

C'est une modification de la technique décrite par Ramon Moliner (1957).

Fixation : les animaux anesthésiés sont perfusés en intracardiaque par une solution de nitrate de sodium à 1% afin de vidanger le sang et d'induire une vasodilatation. Après le passage de 500 ml du fixateur de Golgi, préparé extemporanément et décrit ci-après, les cerveaux sont disséqués, la région septale est délimitée en un bloc de 10 mm³ environ.

Les 500 ml du fixateur de Golgi sont constitués du mélange de :

- * 12 g de bichromate de potassium dissous dans 200 ml d'eau distillée,
- * 5 g de chlorate de potassium dissous dans 100 ml d'eau distillée,
- * 30 g d'hydrate de chloral dissous dans 150 ml d'eau distillée,
- * 50 ml de formol du commerce (Merck) contenant 37% de PFA.

Postfixation : les blocs sont immergés dans le fixateur de Golgi pendant 24 h, puis transférés, 2 fois 24 h, dans une solution de fixateur de Golgi dans laquelle le formol a été remplacé par de l'eau distillée. Le remplacement du formol par de l'eau améliore l'imprégnation et réduit le bruit de fond (Frontera, 1964). Enfin, les blocs sont transférés dans des bains successifs de bichromate de potassium, 6 fois 12 h.

Imprégnation : les blocs sont placés dans une solution de nitrate d'argent 1% pendant 14 jours. Puis, les blocs sont débités en coupes de 100 à 150 µm à l'aide d'un Vibratome (Oxford). Les coupes sont récupérées dans de l'eau distillée puis déshydratées dans des bains d'alcool croissant : 70° (30min) ; 95° (30min) ; 100° (2 fois 30min). Les coupes sont alors éclaircies dans du toluène avant d'être déposées sur lames gélatinées. Elles sont séchées et montées à

l'Eukitt. Elles sont observées à l'aide de l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25).

2 - Technique de Tokuno (1990)

Fixation : après anesthésie, les animaux sont perfusés en intracardiaque par une solution de TP contenant 10% de formol du commerce. Des blocs de cerveaux contenant le SL sont immergés dans le même fixateur pendant 5 jours minimum. Le bloc est de nouveau délimité en petits fragments de 3 à 5 mm d'épaisseur qui sont plongés dans une solution contenant 4 volumes de $K_2Cr_2O_7$ (3,5%) pour 1 volume de formol du commerce et du Triton X-100 (0,15%) pendant une journée. Les fragments sont ensuite transférés dans une solution ne contenant cette fois que du $K_2Cr_2O_7$ (3,5%) et du Triton X-100 (0,15%) pendant 3 jours, puis dans une solution de $K_2Cr_2O_7$ (3,5%) pendant 3 jours également.

Imprégnation : après 3 à 4 rinçages dans du nitrate d'argent à 0,75% (ces rinçages permettent d'éliminer le dépôt rouge brique qui se forme), les fragments sont incubés 2 jours dans une solution identique. Les fragments sont alors rinçés dans 6 bains d'alcool à 40° pendant 15 min, puis coupés au Vibratome en sections de 100 μm . Les sections sont déshydratées dans une série d'alcools croissants, éclaircies dans du toluène, déposées sur lames gélatinées et montées à l'Eukitt. Les lames sont ensuite observées à l'aide de l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25).

IV. Techniques électrophysiologiques

1 - Réalisation des tranches de septum

Des cobayes femelles de 200 g environ sont décapités sans anesthésie préalable. Le cerveau est rapidement disséqué, délimité en un parallélepède contenant le septum, puis immergé quelques minutes dans une solution physiologique (Yamamoto, 1973) maintenue à 4°C. La composition de la solution est la suivante (en mM) : NaCl, 124 ; KCl, 5 ; $CaCl_2$, 2,4 ; $NaHCO_3$, 26 ; KH_2PO_4 , 1,24 ; $MgSO_4$, 1,3 ; glucose, 10. La solution est saturée par un mélange gazeux 95% O_2 , 5% CO_2 , son pH est alors de 7,2. Le bloc de tissu est collé par une goutte de cyanoacrilate sur le support d'un Vibroslice (Campden). Des tranches frontales de septum d'une épaisseur de 400 μm sont

obtenues et transférées dans une cuve d'enregistrement de type "interface" (Schwartzkroin et Mathers, 1978). Les tranches y sont maintenues sur un morceau de papier filtre entre la solution physiologique qui est perfusée grâce à une pompe péristaltique (débit : 2ml/min) et un mélange gazeux (95% O₂, 5% CO₂), chauffé à 34°C et humidifié dans la partie inférieure de la cuve. Les enregistrements intracellulaires débutent 3 h après la mise en place des tranches, temps nécessaire pour obtenir des réponses électrophysiologiques satisfaisantes.

2 - Enregistrements intracellulaires

2.1) Fabrication des microélectrodes

Les microélectrodes destinées aux enregistrements intracellulaires sont étirées par une étireuse horizontale (Flaming-Brown Micropipette Puller Model P-87) à partir de tubes de verre à paroi épaisse (1 mm de diamètre extérieur et 0,58 mm de diamètre intérieur) contenant une fibre de verre pour faciliter le remplissage (Clark Electromedical). Lorsqu'elles sont remplies de KCl 3M ou d'acétate de potassium 3M, la résistance de ces microélectrodes est de 60-80 MΩ.

2.2) Appareillage électrophysiologique

L'activité électrique des cellules du SL a été examinée selon les techniques standard de dérivation intracellulaire en courant imposé. La région de la tranche à étudier est repérée sous loupe binoculaire, puis les microélectrodes sont approchées à l'aide d'un micromanipulateur manuel (La précision Cinématographique) et sont descendues dans la tranche par pas successifs de 2 μm à l'aide d'un micromanipulateur électronique (Heidelberg Nano-stepper). Les microélectrodes sont reliées à un amplificateur Axoclamp 2A (Axon Instruments). Au moment où une microélectrode pénètre dans une cellule, la valeur du potentiel de membrane est appréciée sur l'oscilloscope (Gould 1602). La résistance de la microélectrode est mesurée puis annulée grâce au pont de Wheastone de l'amplificateur, pendant l'application d'impulsions rectangulaires de courant à travers la microélectrode (programmateur Digitimer et stimulateurs isolés Devices). Le potentiel de membrane est ensuite enregistré en permanence sur le papier d'un enregistreur Gould 1600. Sa valeur est vérifiée sur le même enregistreur au

moment où l'électrode est retirée de la cellule. Les réponses évoquées par l'application intracellulaire d'impulsions rectangulaires de courant sont observées sur l'oscilloscope et enregistrées sur bande magnétique grâce à un enregistreur analogique (Ampex 2200) ou digital (Digidata Biologic).

2.3) Application de substances

Afin d'étudier la spécificité des canaux ioniques mis en jeu lors de la réponse cellulaire à des chocs dépolarisants ou hyperpolarisants, plusieurs substances pharmacologiques ont été essayées. Ces substances sont dissoutes dans le milieu de perfusion. L'effet de la substance n'est pas immédiat, il est couramment observé avec un délai de 10 min environ. Ce délai correspond d'une part au volume mort du dispositif de perfusion des tranches (6ml) et d'autre part au temps nécessaire pour que la substance atteigne la cellule enregistrée.

Les substances suivantes, obtenues chez Sigma, sont directement additionnées au milieu de perfusion au cours de l'expérience :

- Tétródotoxine : TTX, 10^{-6} M. Des aliquots de 50 μ l contenant la quantité suffisante pour une dilution finale de 10^{-6} M sont préparées d'avance dans l'eau distillée et stockées à -80°C .
- Tétraéthylammonium : TEA, 5 à 30 mM.
- 4 amino-pyridine : 4-AP, 0,1 à 1 mM.
- Chlorure de Césium : CsCl, 10 mM.

Il a parfois été nécessaire de remplacer les ions calcium (Ca^{++}) du milieu de perfusion par des ions Co^{++} ou des ions Ba^{++} . Pour cela, lors de sa confection, le milieu de perfusion est modifié par le remplacement du MgSO_4 par le MgCl_2 et par la suppression du KH_2PO_4 . Le CaCl_2 est remplacé par 2,4 mM de CoCl_2 ou par 2,4 mM de BaCl_2 .

Pour certaines expériences, la bicuculline, antagoniste sélectif des récepteurs GABAA, a été ajoutée au milieu de perfusion à une concentration de 0,1 mM.

3 - Injections intracellulaires de marqueurs

Des injections intracellulaires ont été réalisées avec la peroxydase, le jaune Lucifer (Lucifer Yellow : LY) et la biocytine.

Afin de remédier à l'augmentation de la résistance des microélectrodes observée lorsqu'elles sont remplies par la peroxydase ou le LY, des tubes de

verre à paroi mince (1 mm de diamètre extérieur et 0,78 mm de diamètre intérieur) sont utilisés. L'utilisation de ces tubes de verre et le choix judicieux des paramètres d'étirement sur l'étireuse Brown-Flaming ne rend plus nécessaire le biseautage des microélectrodes (Doutrelant, 1988), car leurs résistances sont suffisamment basses.

3.1) Peroxydase

Les microélectrodes sont remplies d'une solution de 5% de peroxydase (Boehringer Mannheim, Grade I, Meylan, FRANCE) dissoute dans un tampon TRIS-HCl, 0,5M, pH 7,6. Leur résistance s'échelonne entre 40 et 80 M Ω . La peroxydase est éjectée par des impulsions rectangulaires de courant dépolarisant de 2 nA, de 10 ms, à une fréquence de 50 Hz, pendant 10 min.

3.2) Lucifer Yellow

Les microélectrodes sont remplies d'une solution de LY (LY-CH, Fluka, Buchs, Suisse) à 2% dans du chlorure de lithium 0,5 M. Leur résistance s'échelonne entre 80 et 150 M Ω . Le LY est expulsé par des impulsions de courant hyperpolarisant de 1 à 2 nA, de 700 ms, à une fréquence de 1 Hz, pendant 5 à 20 min.

3.3) Biocytine

Les microélectrodes sont remplies par une solution de 2% de biocytine (Sigma) dissoute dans 1,75 M de KCl et 0,025 M de TRIS-HCl. Leur résistance est d'environ 50 M Ω . La biocytine est éjectée par des impulsions de courant dépolarisant de 1,5 nA (200 ms on, 200 ms off) pendant 10 min.

Lors de l'injection, le maintien d'une bonne activité électrique de la cellule est vérifié régulièrement en stoppant le courant d'injection et en vérifiant la valeur du potentiel et de la résistance membranaires. Le pont de Wheastone est balancé, pour remédier à l'augmentation de la résistance de la microélectrode, si nécessaire. L'injection est immédiatement stoppée si les valeurs du potentiel de membrane et de la résistance membranaire sont trop fortement altérées. Généralement après l'injection, l'amplitude du potentiel d'action est réduite et sa largeur s'est accrue. Les tranches peuvent être

retirées pour fixation immédiatement après l'injection. Couramment, un délai de 30 min environ est respecté.

V. Traitement histologique des tranches

Les tranches contenant une ou plusieurs cellule(s) injectée(s) par l'un des traceurs décrits précédemment sont soumises à un traitement histologique approprié.

1 - Cellules injectées par la peroxydase

1.1) Préparation des tranches pour la microscopie optique

Après avoir été retirées de la chambre de survie, les tranches sont conservées une nuit à 4°C dans une solution de fixateur composé de 2% de glutaraldéhyde et 1,25% de PFA dissous dans du TP. Le choix du fixateur répond à un compromis réalisé entre le pourcentage de glutaraldéhyde et celui de PFA. En effet, la glutaraldéhyde stabilise la peroxydase alors que le PFA, tout en permettant une bonne conservation du tissu, réduit son activité. Les tranches sont ensuite plongées dans une solution de TP contenant 20% de saccharose pendant une heure. Après un rapide rinçage dans du TP, les tranches sont débitées en coupes frontales de 40 µm au cryotome et récupérées dans du TP. La révélation de la peroxydase s'effectue à la température ambiante en présence d'H₂O₂. Afin d'obtenir la meilleure image possible, plusieurs techniques de révélation, utilisant des chromogènes différents, ont été testées.

1.1.1) Révélation avec la DAB

Ce chromogène a été le premier utilisé pour la révélation de la peroxydase (Graham et Karnovsky, 1966). Plusieurs protocoles visant à donner un produit de réaction plus intense ont été mis au point par différents auteurs. Au cours de notre étude, nous avons utilisé trois protocoles différents:

- technique de révélation selon Adams (1977) -

Les coupes sont transférées dans une solution de TP contenant 5% de CoCl₂ (Prolabo), pendant 10 min. Ce traitement permet d'intensifier le produit de réaction. Après 3 rinçages de 5 min chacun dans le TP, les coupes sont

immergées sous agitation pendant 20 min dans une solution de TP contenant 0,05% de DAB. Puis elles sont de nouveau immergées sous agitation dans une solution identique de DAB contenant en plus 0,003% d'H₂O₂, pendant 20 min. Les coupes subissent alors 3 rinçages de 5 min dans du TP. Le produit de réaction obtenu colore les cellules en brun clair.

- technique de révélation selon Metz et coll (1989) -

Lors de la révélation histochimique de la peroxydase des cellules injectées, l'activité peroxydasique des hémoprotéines érythrocytaires s'exprime également. Le protocole proposé par Metz et coll (1989) permet de supprimer sélectivement le marquage des hématies. Ce protocole est basé sur un prétraitement à l'alcool. Les coupes sont incubées pendant 10 min dans de l'éthanol à 50°, puis transférées dans de l'éthanol à 70° pendant 15 min et reviennent dans l'éthanol à 50° pendant 10 min. Après un rinçage de 10 min dans le TP, les coupes sont révélées et intensifiées pendant 30 min dans la solution suivante : 0,02% de DAB, 0,03% de nickel ammonium sulfate (Fluka, Buchs, Suisse) et 0,003% d'H₂O₂ dissous dans du tampon TRIS-HCl, 0,05M, pH 7,6. Les coupes sont ensuite rincées dans le même tampon pendant 10 min. Le produit de réaction obtenu colore les cellules en violet Tprofond-noir.

Le mécanisme d'action de l'éthanol dans la suppression de l'activité peroxydasique des hématies est encore mal compris. L'éthanol pourrait agir soit en lysant les hématies, soit en se fixant sur les hémoprotéines. Dans ce dernier cas, il cliverait les groupes hèmes ou induirait des changements conformationnels.

- technique au déoxyglucose selon Itoh et coll (1979) -

La particularité de cette technique est d'utiliser la glucose oxidase comme accepteur d'hydrogène à la place d'H₂O₂. Le protocole utilisé est le suivant. Après deux lavages rapides dans du tampon TRIS-HCl, 0,1M, pH 7,6, les coupes sont préincubées dans le même tampon contenant 0,5% de CoCl₂, pendant 10 min à température ambiante. Elles sont ensuite rincées dans du tampon TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,6, puis dans du TP. La révélation de la peroxydase s'effectue à 37°C pendant 60 min dans la solution suivante, préparée extemporanément : 0,05% de DAB, 0,2% β-D-glucose (Sigma), 0,04% de NH₄Cl (Sigma), 0,003% de glucose-oxidase (Sigma) dans 100 ml de TP. Le produit de réaction obtenu colore les cellules en brun. Les coupes sont ensuite rincées plusieurs fois dans du TP.

1.1.2) Révélation avec le réactif d'Hanker-Yates

Face au caractère carcinogène de la DAB, d'autres chromogènes ont été proposés, tel celui de Hanker et coll. (1977) qui est composé de p-phénylènediamine dihydrochloride et de pyrocatechol (Sigma). Le principe de la réaction est une oxydation d'amines aromatiques en présence de phénols. En fait, la peroxydation du p-phénylènediamine dihydrochloride est fortement accélérée par la présence de pyrocatechol et forme un co-polymère osmiophile de couleur bleue. Les sections sont incubées sous agitation pendant 15 min dans la solution suivante : 75 mg de réactif d'Hanker Yates (Sigma), 0,5 ml d'H₂O₂ 1% dissous dans 50 ml de tampon TRIS-HCl, 0,1M, pH 7,6. Selon Bell (1981) 0,1M d'imidazole est ajouté pour intensifier la réaction et 1% de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour favoriser la pénétration des substances. Les coupes subissent ensuite 3 rinçages de 5 min dans du TP.

1.1.3) Montage des coupes

Après la révélation, les coupes sont montées sur lames gélatinées et séchées à température ambiante. Elles sont ensuite rapidement déshydratées dans des bains d'alcools de degré croissant, éclaircies dans le toluène, puis montées à l'Eukitt. Les cellules sont dessinées à la chambre claire au grossissement 40 avec un microscope Zeiss. Afin d'être contrecolorées, les préparations sont démontées après immersion dans le toluène et réhydratées dans des bains d'alcools de degré décroissant. Elles sont colorées par la thionine (0,1%), déshydratées, éclaircies par le toluène et montées à l'Eukitt. Les coupes sont alors observées en détail à l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25, Ektachrome 64) .

1.2) Préparation des tranches pour la microscopie électronique

1.2.1) Révélation des cellules injectées

Les tranches, retirées de la chambre de survie, sont incubées dans le fixateur pendant une nuit à 4°C. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un fixateur contenant 1% de glutaraldéhyde et 1,25% de PFA dissous dans du TP. Après un rinçage dans du TP, les tranches sont sectionnées en coupes de 40 µm au Vibratome et sont récupérées dans du TP. Pour révéler la peroxydase, la technique de Metz et coll (1989), avec suppression du traitement à l'alcool en raison de la forte altération du tissu qu'il provoque, ou la technique au déoxyglucose d'Itoh et coll (1979) ont été utilisées. Les coupes sont rincées et

éventuellement conservées 1 à 2 h à 4°C dans du TP avant leur osmification et leur inclusion dans l'Araldite (Fluka, Buchs, Suisse).

1.2.2) Osmification et inclusion des tranches dans l'Araldite

Afin d'observer dans un premier temps au microscope optique la ou les cellules(s) injectée(s), il a été nécessaire d'effectuer des inclusions fines de 0,5 mm d'épaisseur, selon la technique suivante :

- * Traitement des coupes au tétr oxyde d'osmium (Bio-Lyon) 1% dilué dans du TP pendant 20 min.

- * Rinçages dans l'eau bidistillée pendant 2 min.

- * Déshydratation dans une série d'alcools croissants: 1 x 50°, 3 min ; 1 x 70°, 5 min; 1 x 80°, 5 min; 2 x 95°, 2 x 10 min ; 1 x 100°, 10 min.

- * Incubation dans de l'oxyde de propylène (Merck) pendant 20 min. Ce produit favorise la pénétration de l'Araldite.

- * Incubation pendant quelques minutes dans un mélange 1/2-1/2 d'oxyde de propylène/Araldite.

- * Les coupes sont alors incluses dans de l'Araldite entre une lame et une lamelle recouvertes de papier aluminium, permettant ainsi d'obtenir des inclusions très fines. La polymérisation de la résine se fait en étuve à 60°C pendant 24 h, puis les inclusions sont démoulées. L'obtention d'inclusions fines permet l'observation de ces préparations aux grossissements 40 et 100 du microscope optique et la reconstruction de la morphologie des neurones injectés à la chambre claire. Dès que les cellules sont dessinées, les inclusions sont de nouveau incluses dans l'Araldite sur des fragments de résine polymérisée, puis sectionnées en coupes semi-fines et ultra-fines à l'ultramicrotome (Reichert Ultracut).

1.2.3) Traitement des coupes semi-fines

Les coupes semi-fines ont une épaisseur de 2 µm. Elles sont recueillies sur des lames de verre, séchées, puis observées au microscope. Dès qu'un fragment de cellule injectée est repéré sur la semi-fine, des coupes ultra-fines sont réalisées.

1.2.4) Traitement des coupes ultra-fines

Les coupes ultra-fines ont une épaisseur de 0,1 µm. Elles sont recueillies sur des grilles de 200 mesh recouvertes d'une membrane de parlodion (Mallinckrodt, St Louis). Une coupe ultra-fine sur deux est colorée par la

double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb pour être observée au microscope électronique (Zeiss 902) et photographiée (Kodak, 4489).

2 - Cellules injectées par le Lucifer Yellow

2.1) Observation des cellules marquées par le LY

Trente min après l'injection intracellulaire, la tranche est plongée dans une solution de PAF pendant une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages dans des bains de tampon Coons à 20% de saccharose, la tranche est débitée en coupes de 30 µm au cryotome puis récupérées dans du tampon Coons. La cellule injectée est repérée sous l'Axiophot (filtre identique à celui utilisé pour la FITC) et photographiée (Agfapan 25 ; Fuji Velvia 50, Kodakrome 400).

2.2) Couplage avec la réaction immunocytochimique

La coupe contenant la cellule injectée est ensuite incubée avec l'anticorps anti met-enképhaline dilué au 1/400e pendant une nuit à température ambiante. Après plusieurs rinçages dans du tampon Coons, la coupe est incubée avec l'anticorps secondaire couplé au TRITC pendant 90 min à température ambiante. Après plusieurs rinçages, cette coupe ainsi que les coupes voisines sont disposées sur des lames gélatinées et montées avec le mélange glycérine-p-phénylènediamine. Elles sont observées à l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25 ; Fuji Velvia 50, Kodakrome 400).

3 - Cellules injectées par la biocytine

3.1) Observation des cellules marquées par la biocytine

Les tranches contenant les cellules injectées par la biocytine sont immergées dans une solution de TPS contenant 4% de PFA et 0,15% de glutaraldéhyde, pendant une nuit à 4°C. La glutaraldéhyde n'est pas indispensable, mais permet d'obtenir davantage de détails morphologiques que la PFA seule (Kita et Armstrong, 1991). La tranche est ensuite transférée dans une solution de TPS à 20% de saccharose pendant 30 à 60 min, rincée dans une solution de TPS, puis débitée en coupes de 30 µm au cryotome. Le protocole utilisé pour visualiser le complexe biocytine-avidine correspond à ceux décrits

par Horikawa et Armstrong (1988) et Tseng et coll (1991) et il est détaillé ci-après.

* Préincubation des coupes dans une solution de TPS contenant 2% de BSA et 0,25% de Triton X-100 pendant 20 min.

* Incubation des coupes dans une solution de TPS contenant 2% de BSA et de l'avidine-peroxydase (Vector Burlingame, USA) au 1/300e pendant 2 à 3 h.

* Rinçages dans du TPS contenant 2% de BSA, puis dans du TPS seul.

* Révélation de la peroxydase dans une solution de TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,6 contenant 0,05% de DAB et 0,003% d'H₂O₂.

* Rinçages dans du tampon TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,6.

* Montage des coupes à l'Eukitt après déshydratation et éclaircissement dans le toluène avec ou sans contrecoloration à la thionine.

Les cellules sont ensuite observées, dessinées à la chambre claire (microscope Zeiss) au grossissement 40 et photographiées à l'Axiophot (Agfapan 25 ; Fuji Velvia 50, Fujichrome 400).

3.2) Couplage avec la réaction immunocytochimique

La détection de la biocytine peut être associée à un double marquage immunocytochimique. Deux types de réactions immunocytochimiques ont été effectuées.

3.2.1) Détection de la met-enképhaline

Les cellules injectées par la biocytine sont identifiées soit par de l'avidine-peroxydase, soit par de l'avidine-FITC (Molecular Probes, Eugene, USA).

Après la révélation de l'avidine-peroxydase (DAB), les tranches contenant la cellule injectée sont soumises à un traitement immunocytochimique pour mettre en évidence les fibres enképhalinerigiques. Le protocole est semblable à celui décrit dans le paragraphe II, 2.2 et la met-enképhaline est détectée par des anticorps secondaires couplés à la FITC.

Le protocole utilisé pour visualiser l'avidine-FITC est basé celui décrit précédemment (paragraphe V, 3.1) : après l'étape de préincubation, les coupes sont incubées dans une solution de TPS contenant 2% de BSA et de l'avidine-FITC au 1/200e, pendant 2 à 3 h. Après rinçages dans le TPS, la met-enképhaline est détectée par immunocytochimie avec des anticorps secondaires couplés à la TRITC ou à la peroxydase (révélation par le chloro-naphtol).

Les coupes sont ensuite montées dans le mélange glycérine-p-phénylènediamine, puis observées à l'Axiophot et photographiées (Agfapan 25, Fujichrome Velvia 50, Fujichrome 400).

3.2.2) Détection simultanée de la CaBP et de la met-enképhaline

La détection immunocytochimique simultanée de la CaBP et de la met-enképhaline sur des coupes contenant des cellules injectées par la biocytine se déroule selon les protocoles décrits en détail dans les paragraphes précédents. Les principales étapes sont mentionnées ci-après:

- * Détection de la biocytine par l'avidine-FITC.
- * Rinçages dans du TPS.
- * Incubation des coupes une nuit dans un cocktail d'anticorps primaires contenant des anticorps anti met-enképhaline (1/600e) et des anticorps anti CaBP (1/100e).
- * Rinçages dans du TPS.
- * Incubation des coupes dans un cocktail d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase (1/100e) pour détecter la met-enképhaline et d'anticorps secondaires couplés au le TRITC (1/50e) pour détecter la CaBP. L'activité peroxydasique est détectée par le 4-chloro-1-naphtol.
- * Rinçages dans du tampon TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7,6.
- * Montage des coupes dans le mélange glycérine-p-phénylènediamine.
- * Observation à l'Axiophot en épifluorescence et photographie (Agfapan 25, Fujichrome Velvia 50, Fujichrome 400).

Chapitre I

**ETUDE IMMUNOCYTOCHIMIQUE
DU SEPTUM LATERAL
CHEZ LE COBAYE**

Introduction

Les fibres afférentes au SL, provenant des centres télencéphaliques supérieurs, de l'hypothalamus, du mésencéphale et du tronc cérébral, se différencient par leur contenu neurochimique. L'utilisation de techniques immunocytochimiques chez le rat a permis de déterminer la nature des fibres innervant le SL et de constater leur extrême variété. Ces travaux sont fondamentaux car ils posent les bases d'une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques des populations neuronales constituant la structure.

Les substances identifiées dans les fibres et terminaisons septales comprennent des neurotransmetteurs tels que :

- l'*acétylcholine* (Amaral et Kurz, 1985 ; Bialowas et Frotscher, 1987),
- les *monoamines* (Fuxe, 1965 ; Jacobowitz et Palkovits, 1974 ; Lindvall et Stenevi, 1978 ; Moore, 1978 ; Köhler et coll, 1982 ; Gall et Moore, 1984 ; Gaspar et coll, 1985 ; Verney et coll, 1987 ; Jakab et Leranth, 1990b ; Dinopoulos et coll, 1993),
- le *GABA* (Köhler et Chan-Palay, 1983 ; Panula et coll, 1984 ; Mugnaini et Oertel, 1985 ; Onteniente et coll, 1986, 1987 ; Leranth et Frotscher, 1989 ; Jakab et Leranth, 1990b).

Des neuropeptides sont également détectés dans les fibres et terminaisons septales tels que :

- la *substance P* (Ljungdahl et coll, 1978 ; Sakanaka et coll, 1981, 1982 ; Woodhams et coll, 1983 ; Gall et Moore, 1984),
- les *enképhalines* (Wamsley et coll, 1980 ; Finley et coll, 1981 ; Woodhams et coll, 1983 ; Gall et Moore, 1984 ; Onteniente et coll, 1989 ; Sakanaka et Magari, 1989),
- l'*ACTH* (Joseph, 1980),
- la *cholecystokinine* (Hökfelt et coll, 1980 ; Greenwood et coll, 1981 ; Woodhams et coll, 1983),
- la *vasopressine* (Buijs et coll, 1978 ; De Vries et coll, 1981 ; Caffé et coll, 1987 ; Jakab et coll, 1991a),
- la *calcitonine gene related peptide* (Rosenfeld et coll, 1983 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985),
- le *CRF* (Olshowka et coll, 1982 ; Sakanaka et coll, 1987, 1988),
- la *somatostatine* (Woodhams et coll, 1983 ; Köhler et Eriksson, 1984 ; Jakab et Leranth, 1991, 1993),

- la *neurotensine* (Woodhams et coll, 1983 ; Köhler et Eriksson, 1984 ; Jakab et Leranath, 1993),
- le *TRH* (Ishikawa et coll, 1986).

En ce qui concerne le **SLml** chez le rat, les travaux récents de l'équipe de Jakab ont montré, par des techniques immunocytochimiques à l'échelle du microscope optique et du microscope électronique, la nature chimique des afférences convergeant vers les neurones à épines somatiques. Les neurones sont contactés par des terminaisons nerveuses contenant de la somatostatine (Jakab et Leranath, 1991 ; Jakab et Leranath, 1993), de la neurotensine (Jakab et Leranath, 1993), des catécholamines (Jakab et Leranath, 1990b, 1993), de la vasopressine (Jakab et coll, 1991a), du GABA (Jakab et Leranath, 1990b).

Chez le cobaye, il n'existe que très peu de données sur la nature chimique des afférences innervant les neurones du SL et plus particulièrement ceux du **SLml**, hormis l'innervation enképhalinergique provenant du NMD (Tramu et coll, 1981 ; Beauvillain et coll, 1983 ; Stengaard-Pedersen et Larsson, 1983), une innervation cholecystokinergique assez faible (Ciofi et Tramu, 1990) et une innervation vasopressinergique (Dubois-Dauphin et coll, 1989).

Dans la première partie de notre étude, nous avons recherché, chez le cobaye, si les neurones du SL étaient la cible d'afférences immunoréactives pour la somatostatine (SOM), la neurotensine (NT), la tyrosine hydroxylase (TH) et la vasopressine (VP). Le choix de ces substances répond à la nécessité de connaître si, chez le cobaye, les neurones du **SLml** sont la cibles des mêmes substances que celles décrites chez le rat par l'équipe de Jakab. Nous avons également redéfini la distribution des fibres à enképhaline (Enk) sur l'ensemble du SL, pour mieux cibler le site d'intervention du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal.

La présence de corps cellulaires immunoréactifs pour le GABA a été rapportée dans le SL du rat (Köhler et Chan-palay, 1983 ; Panula et coll, 1984 ; Mugnaini et Oertel, 1985 ; Onteniente et coll, 1986, 1987 ; Leranath et Frotscher, 1989 ; Jakab et Leranath, 1990b) et du cobaye (Beauvillain et coll, 1991).

De nombreuses études ont montré la coexistence du GABA avec des protéines liant le Ca⁺⁺, telles que la PV (Celio, 1986 ; Katsumaru et coll, 1988 ; Kosaka et coll, 1987; Freund, 1989 ; Antal et coll, 1991 ; Kawaguchi et Kubota, 1993), ou la CaBP (Antal et coll, 1991; Gulyas et coll, 1991 ; Freund

et Gulyas, 1991 ; Toth et Freund, 1992 ; Rogers, 1992 ; Kawaguchi et Kubota, 1993), dans différentes régions du cerveau. Il est actuellement suggéré que la présence de PV et de CaBP dans les neurones leur confère une certaine résistance vis à vis de la neurotoxicité induite par le glutamate (Heizmann et Braun, 1992).

La ND a tout d'abord été utilisée comme marqueur sélectif histochimique pour repérer certains types neuronaux dans diverses régions du cerveau (Scherer-Singler et coll, 1983 ; Vincent et coll, 1985 ; Mizukawa et coll, 1988 ; McDonald, 1989 ; Rogers, 1992), car ce marqueur semble être localisé dans des populations cellulaires bien définies par leur nature neurochimique. Récemment, il a été montré que les populations cellulaires contenant la ND n'étaient quasiment pas concernées par les processus de dégénérescence couramment observés dans d'autres populations cellulaires, dans des cerveaux de patients âgés ou atteints de démence (Unger et Lange, 1992). En effet, la ND est une enzyme impliquée dans la synthèse de monoxyde d'azote (Hope et coll, 1991). Il y a controverse concernant la fonction exacte du monoxyde d'azote dans les neurones (Manzoni et coll, 1992). Il semble toutefois établi qu'il soit impliqué dans la protection du neurone contre les dommages dus aux phénomènes excitotoxiques (Nowicki et coll, 1991 ; Izumi et coll, 1992).

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons recherché si les neurones du SL contenaient la PV, la CaBP ou la ND. Nous avons aussi étudié la répartition des neurones immunoréactifs pour le GABA, afin de déterminer s'ils occupaient les mêmes territoires que les neurones à PV et à CaBP, dans le but d'appréhender une éventuelle colocalisation des substances. Cette étude a été complétée par une recherche de la colocalisation de la ND et de la CaBP, de tels exemples ayant été montrés par ailleurs (Alonso et coll, 1992 ; Guela et coll, 1993). Nous nous sommes enfin demandé si les fibres enképhalinergiques du tractus hypothalamo-septal contactaient les neurones contenant la PV, la CaBP et la ND.

Résultats

I. Description immunocytochimique des afférences au septum latéral chez le cobaye

La distribution des fibres afférentes au SL a été rapportée schématiquement sur des dessins provenant de l'atlas de l'hypothalamus et du septum de cobaye établi par Poulain (1974). Le niveau de chaque coupe frontale correspond à la distance, en mm, qui le sépare du plan vertical passant par l'axe interauriculaire (figure 1) : Plan antérieur : 12,9 mm ; Plans intermédiaires : 12,7 à 12,5 mm ; Plan postérieur (décussation de la commissure blanche) : 12,3 mm.

Les marquages immunocytochimiques ont été réalisés sur des animaux non colchicinisés.

Les différentes réactions immunocytochimiques mettent en évidence des fibres, des terminaisons nerveuses et très occasionnellement des corps cellulaires immunoréactifs. Les fibres sont, pour la plupart, pourvues de varicosités disposées régulièrement, ou de manière plus ou moins espacée. Ces varicosités constituent des zones de contact probables avec les neurones du SL ("boutons en passant"). D'autres fibres sont lisses et correspondraient plutôt à des fibres de passage, traversant le SL sans y faire synapse. Les terminaisons nerveuses se présentent soit sous la forme de ponctuations dispersées dans les différentes régions du SL, soit sous la forme d'arrangements périsonomatiques. Ces derniers sont constitués de ponctuations ou de fibres variqueuses qui dessinent le contour du corps cellulaire et des dendrites proximales. Les corps cellulaires immunoréactifs, bien qu'assez rares du fait de l'absence d'un traitement à la colchicine, présentent un marquage homogène qui occupe le corps cellulaire et parfois les dendrites proximales.

La répartition du marquage des différentes substances est récapitulée dans le tableau 4.

1 - Distribution des fibres immunoréactives pour la somatostatine (IR-SOM)

Des fibres variqueuses et des ponctuations IR-SOM sont détectées dans l'ensemble du SL. Quelques arrangements périsonomatiques sont observés dans le

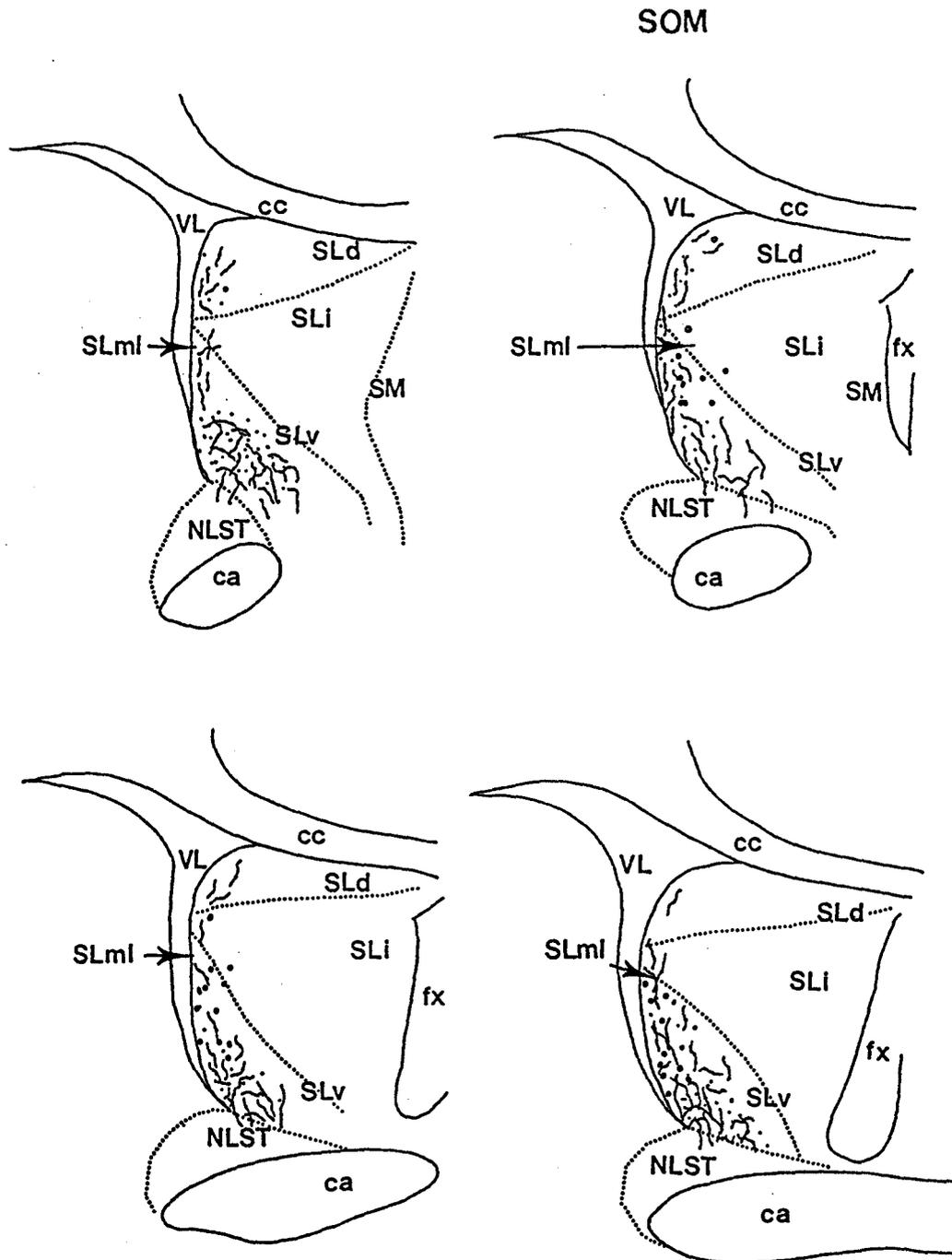
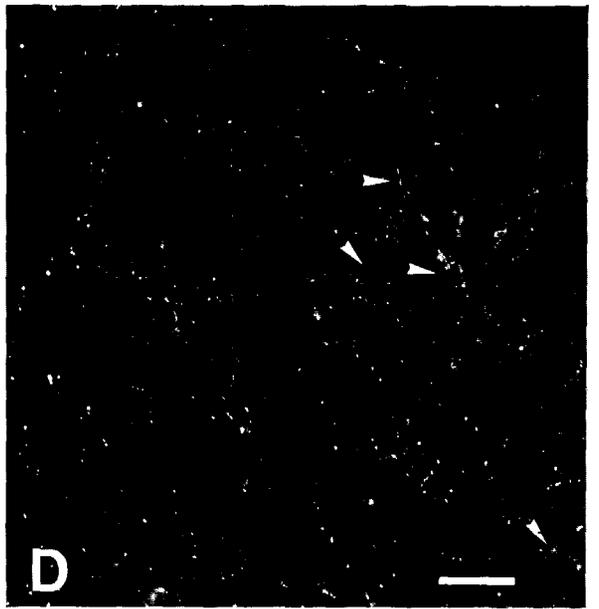
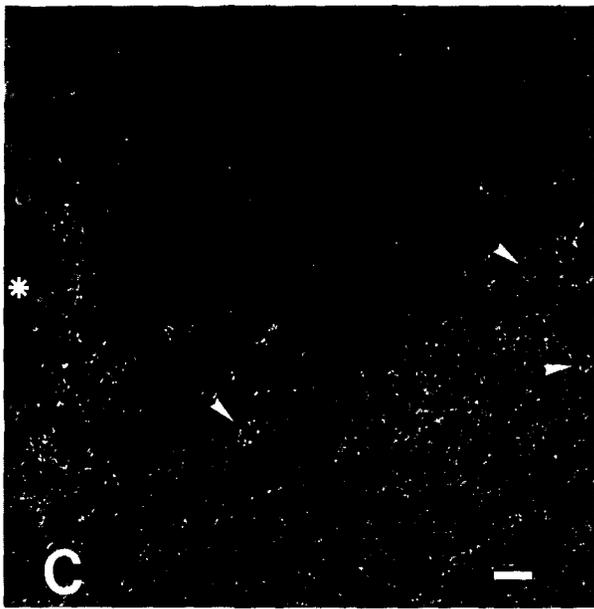
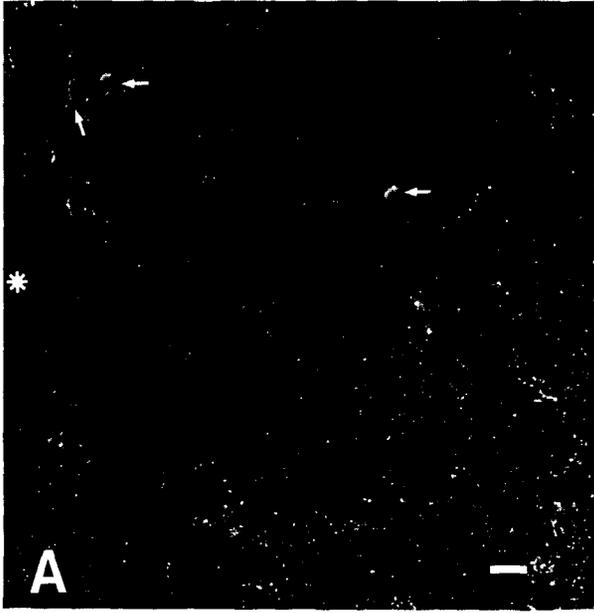


Figure 5 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL de la distribution des fibres et corps cellulaires immunoréactifs pour la somatostatine (SOM). (●) corps cellulaires ; (o) arrangements périsonomatiques.

Figure 6 : Localisation des structures immunoréactives pour la somatostatine (IR-SOM) sur des coupes frontales de SL. Détection par des anticorps couplés à la FITC. A. SLv antérieur. Quelques neurones IR-SOM (flèches), localisés dans le SLmi ventral, sont observés le long du ventricule latéral (étoile). De rares arrangements périsonomatiques sont observés. B. Fort grossissement de neurones IR-SOM (flèches) détectés dans le SLmi. C. Partie ventrale du SLmi postérieur. Les fibres variqueuses, plus nombreuses que dans le plan antérieur, se disposent en arrangements périsonomatiques (pointes de flèches). D. A un fort grossissement, disposition des fibres variqueuses et des ponctuations sous forme d'arrangements périsonomatiques dans la même région (pointes de flèche). Barre de calibration : 50 μ m.



SLml. Quelques rares neurones IR-SOM sont présents dans le SLd, le **SLml** et le SLv (figures 5, 6).

Dans le plan antérieur, des fibres variqueuses sont observées dans le SLd et quelques-unes parcourent le **SLml**. Le SLv comprend également des fibres variqueuses enchevêtrées et de nombreuses ponctuations. Ces fibres sont orientées ventralement et se prolongent dans le NLST. Un neurone est observé dans le SLd, d'autres sont observés dans le **SLml** et le long du ventricule latéral (figure 6A).

Dans les plans intermédiaires, l'innervation somatostatinergerique est quasiment identique. Il est toutefois intéressant de noter la présence d'arrangements périsonomatiques dans les différentes régions du SL, et plus particulièrement dans le **SLml**. Des neurones IR-SOM sont également détectés dans le **SLml** (figure 6B) et dans le SLv.

Dans le plan postérieur, les fibres variqueuses se raréfient dans le SLd, alors qu'elles sont encore détectées dans le **SLml** (figure 6C). De nombreux arrangements périsonomatiques y sont également observés (figure 6D). Quelques neurones sont encore observés dans le **SLml** et le SLv.

2 - Distribution des fibres immunoréactives pour la neurotensine (IR-NT)

L'innervation par les fibres IR-NT est relativement dense dans l'ensemble du SL (figures 7, 8).

Dans le plan antérieur, seul le SLd ne comprend que quelques fibres et quelques ponctuations, contrairement au reste du SL où l'IR-NT est détectée dans de nombreuses fibres variqueuses courtes (figure 8A), dans des ponctuations et sous forme d'arrangements périsonomatiques.

Dans des plans intermédiaires, des fibres IR-NT sont également observées tout au long du SL. La seule différence notable concerne un marquage plus dense dans le **SLml** et le SLv. A ce niveau, les fibres variqueuses ont une orientation ventrale. Un marquage important est également observé dans le NLST.

Dans le plan postérieur, le marquage devient encore plus disséminé dans le SLd où ne persistent que quelques ponctuations et quelques arrangements périsonomatiques. Le **SLml** contient encore de nombreuses fibres variqueuses, qui se prolongent dans le NLST, ainsi que des arrangements périsonomatiques dispersés au sein de la région (figure 8B).

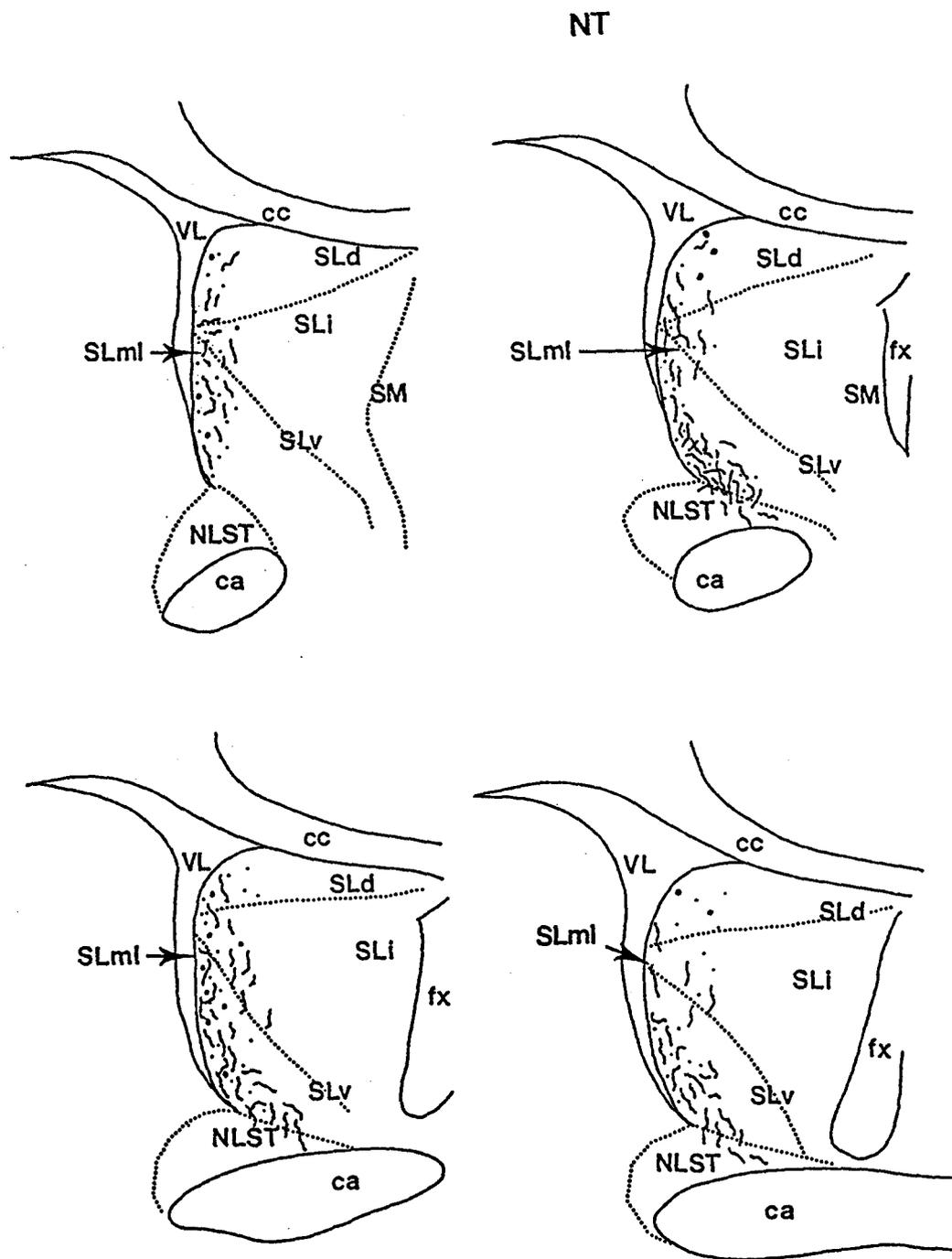
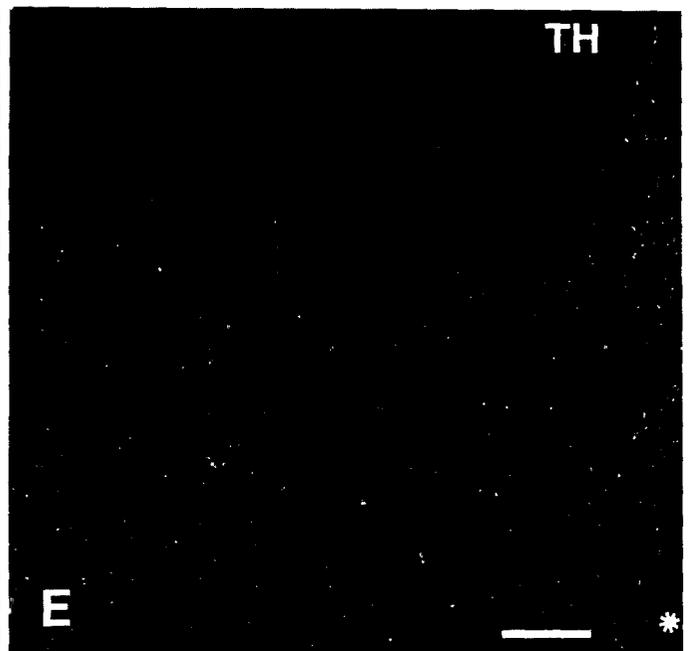
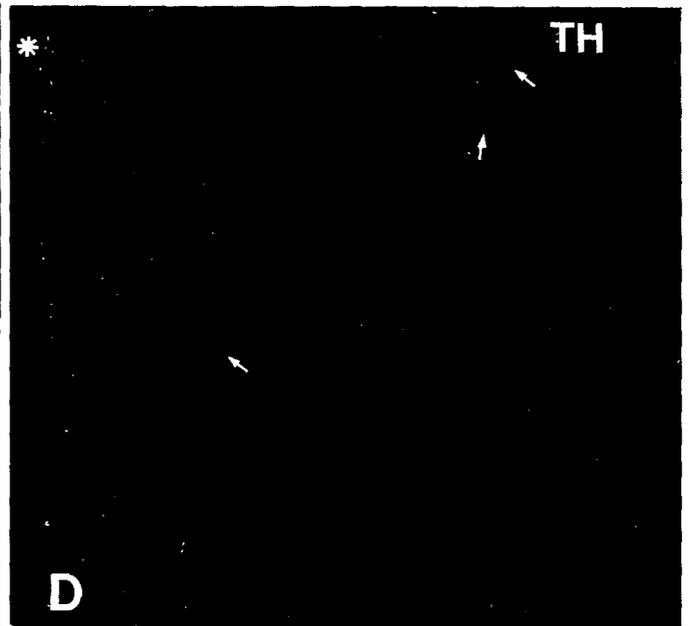
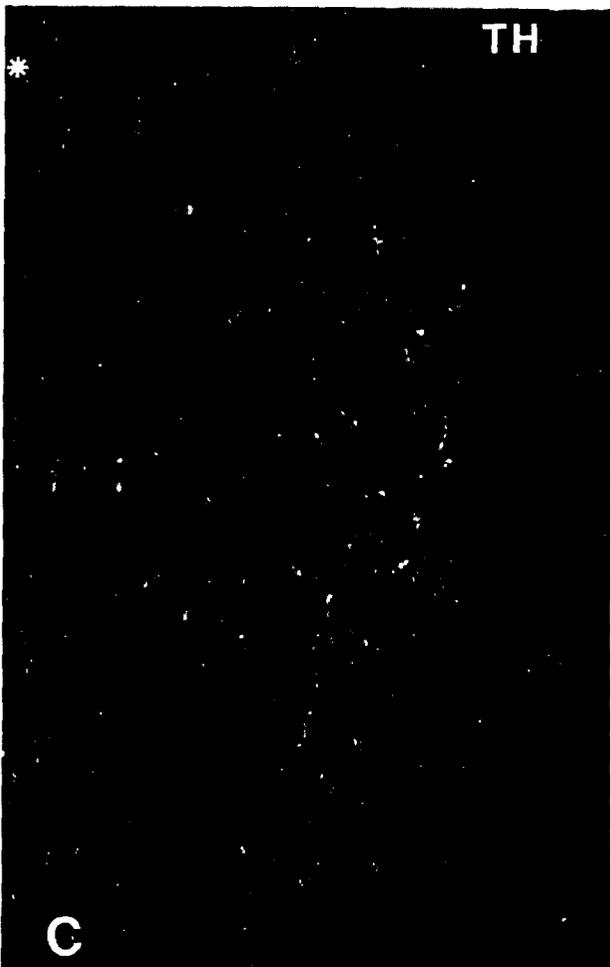
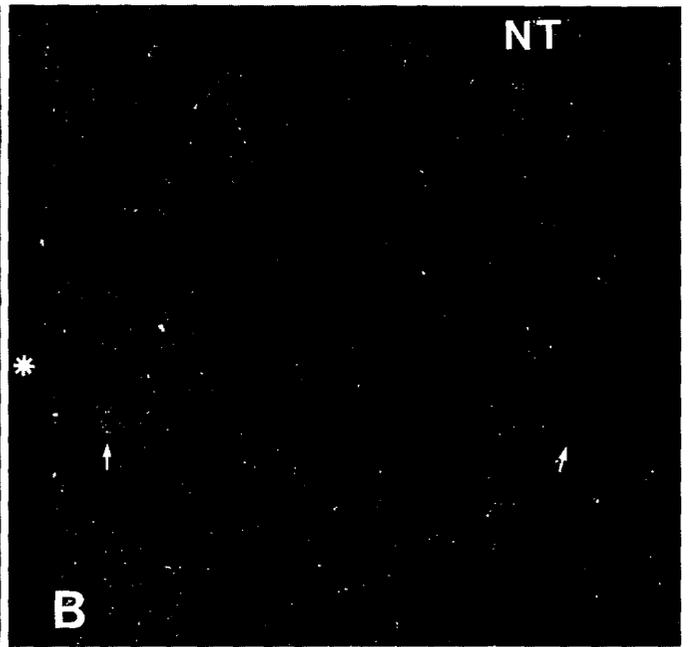


Figure 7 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL de la distribution des fibres immunoréactives pour la neurotensine (NT). (o) arrangements périsonomatiques.

Figure 8 : Localisation des structures immunoréactives pour la neurotensine (IR-NT) (A, B) et des structures immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase (IR-TH) (C-E) sur des coupes frontales de SL. Détection par des anticorps couplés à la FITC. A. SLml antérieur. Des fibres variqueuses courtes sont observées dans cette région. B. Présence d'arrangements périsonomatiques (flèches) dans le SLml postérieur. C. SLml antérieur. De nombreuses fibres variqueuses sont observées le long du ventricule latéral (étoile), elles se dirigent vers le SLv. D. Dans les plans intermédiaires, le SLml comprend de nombreuses fibres variqueuses, des ponctuations et des arrangements périsonomatiques (flèches). E. A plus fort grossissement, dans le SLml postérieur, les fibres variqueuses sont enchevêtrées et des arrangements périsonomatiques (flèches) y sont encore observés. Barres de calibration : 100 μ m.



3 - Distribution des fibres immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase (IR-TH)

L'IR-TH révèle l'innervation catécholaminergique (dopamine, noradrénaline, adrénaline) des neurones du SL. Le marquage est un peu plus diffus par rapport aux marquages précédents (figures 8, 9).

Dans le plan antérieur, des fibres et des ponctuations sont observées sur l'ensemble du SL. Le SLd et le SLv sont particulièrement bien innervés par ces afférences IR-TH. Quelques fines fibres variqueuses traversent le SL, le long du ventricule latéral, jusqu'au SLv (figure 8C). A ce niveau, les fibres IR-TH se disposent comme un arc qui couvre une partie du SLv et se poursuit vers le NLST.

Dans les plans intermédiaires, le marquage est un peu plus important dans le SLi et il est constitué de fibres variqueuses et de ponctuations. Le SLv forme la région la plus innervée des trois régions du SL et se caractérise par la présence de nombreux axones IR-TH orientés vers le NLST. Des arrangements périsonomatiques y sont également détectés. Le SLmi est une région particulièrement bien innervée par les fibres IR-TH (figure 8D).

Dans le plan postérieur, le marquage IR-TH revêt une disposition particulière. En effet, des fibres variqueuses et des ponctuations sont encore observées dans le SLd, mais en quantité moins importante, le long du ventricule latéral et dans le SLv. Des fibres IR-TH sont disposées à la façon d'un arc le long du noyau septo-fimbrial qui occupe ainsi une partie du SLi. Ces fibres sont variqueuses et quelques arrangements périsonomatiques sont également observés (figure 8E). Dans le NLST, le marquage IR-TH devient de moins en moins dense.

4 - Distribution des fibres immunoréactives pour la vasopressine (IR-VP)

Il n'existe que peu de fibres IR-VP dans le SL (figure 10).

Dans le plan antérieur, quelques courtes fibres variqueuses sont observées dans le SLv. Le NLST est également pourvu de quelques fibres de même allure, mais plus enchevêtrées.

Dans les plans intermédiaires, le SL est très peu pourvu de fibres. Quelques longues fibres variqueuses traversent le SL le long du ventricule latéral. D'autres plus courtes sont observées dans le SLv.

Dans le plan postérieur, l'IR-VP disparaît.

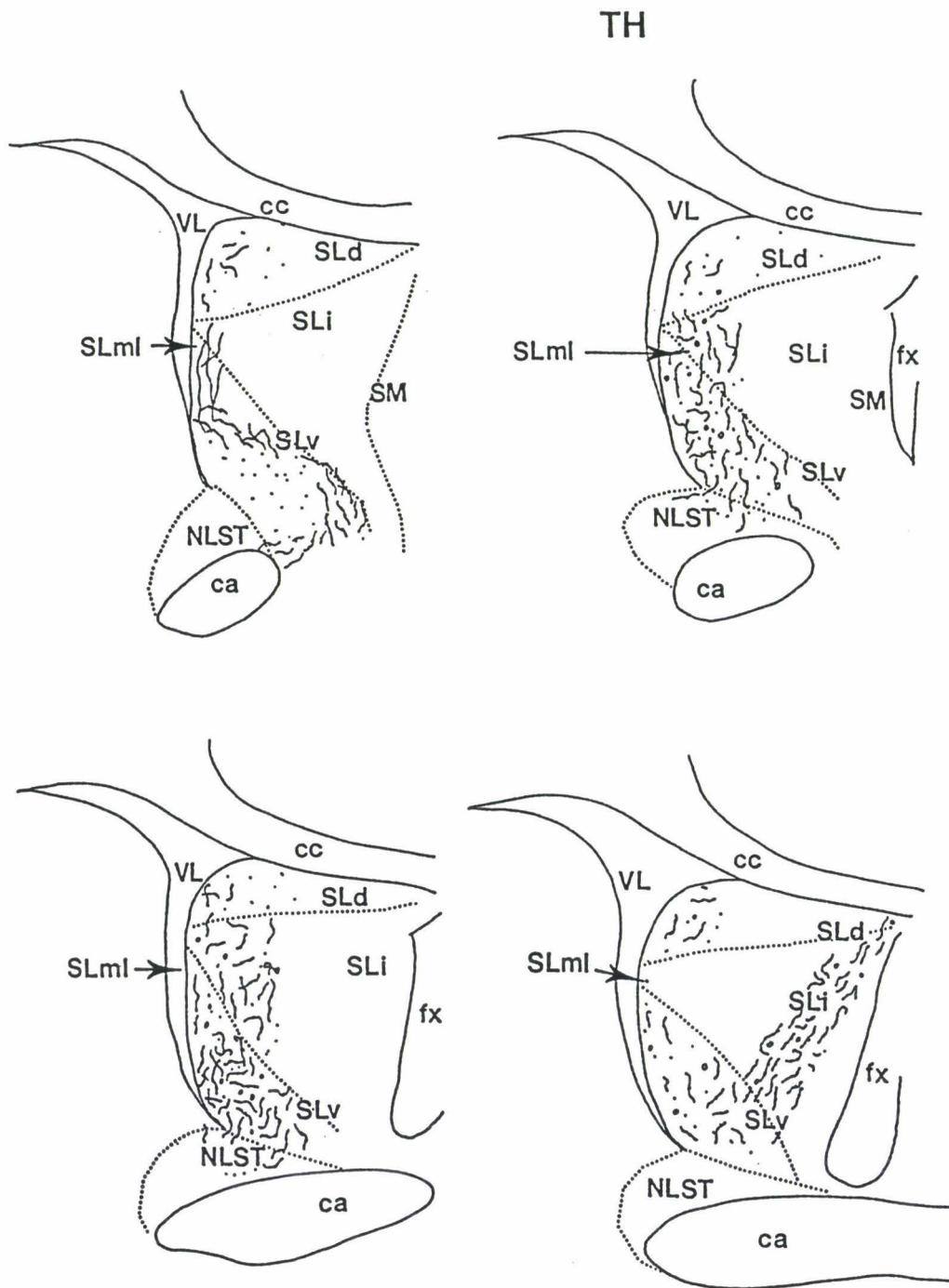


Figure 9 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL de la distribution des fibres immunoréactives pour la tyrosine hydroxylase (TH). (o) arrangements périsomatiques.

VP

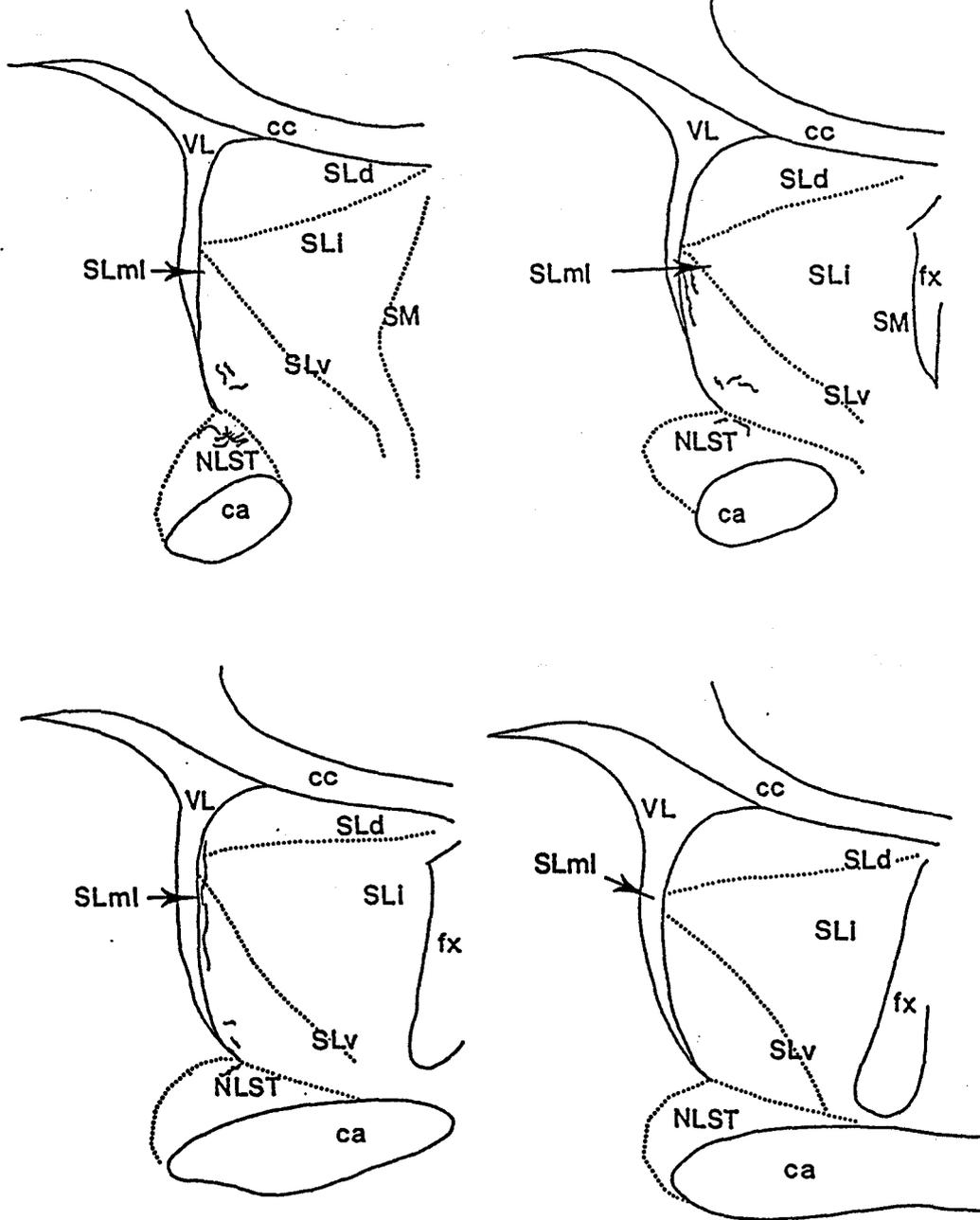


Figure 10 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL de la distribution des fibres immunoréactives pour la vasopressine (VP).

ENK

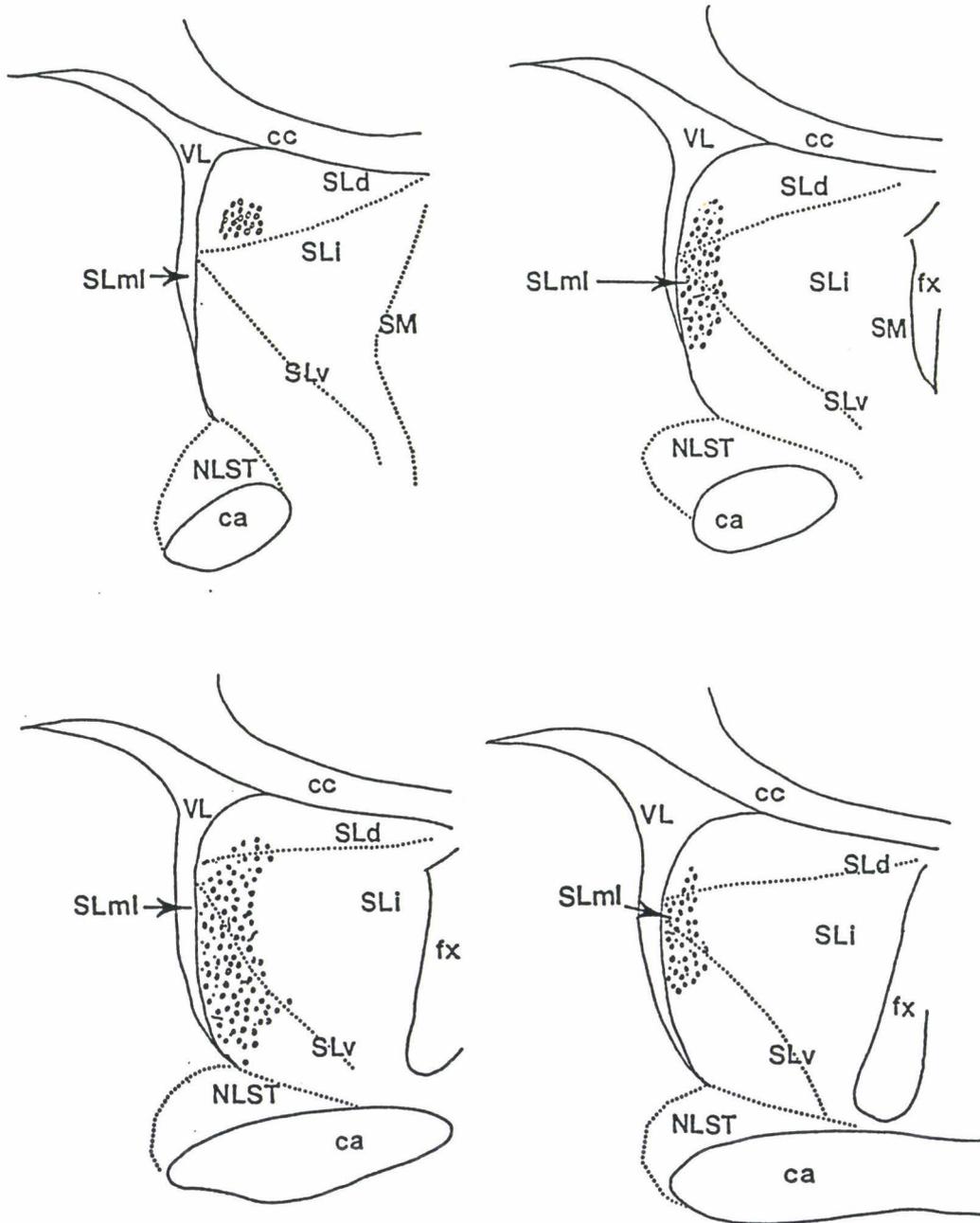


Figure 11 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL de la distribution des fibres et corps cellulaires immunoréactifs pour les enképhalines (Enk). (o) arrangements périsonomatiques.

5 - Distribution des fibres immunoréactives pour la met-enképhaline (IR-Enk)

L'innervation IR-Enk est particulièrement dense dans l'ensemble du SL (figures 11, 12A). Les afférences enképhalinerigiques s'organisent essentiellement en arrangements périsoniatiques (figure 12B). Quelques fibres variqueuses sont observées dans le SL; et de rares neurones sont également marqués dans le SLi (figure 13A).

Dans le SL antérieur, les terminaisons IR-Enk entourent un groupe de neurones localisés dans la partie ventrale du SLd, qui correspond à la partie la plus dorsale du SLml, formant un petit noyau bien circonscrit qui sera désigné dans cette étude sous le terme de noyau stigmoïde (figure 14A).

Dans les plans intermédiaires, l'innervation enképhalinerigique forme un dense plexus, constitué par une agrégation d'arrangements périsoniatiques qui recouvrent une aire assez importante et se présentent sous la forme d'un arc (figure 13A). Cet arc recouvre la partie latéro-ventrale du SLd, la partie du SLi appliquée contre le ventricule latéral et la partie médio-dorsale du SLv. Le plexus enképhalinerigique recouvre ainsi une grande partie du SLml (figure 13 B).

Dans les plans postérieurs, l'IR-Enk diminue progressivement pour ne plus occuper qu'un territoire restreint limité à la partie dorsale du SLml. Au niveau de la décussation de la commissure antérieure, quelques fibres enképhalinerigiques sont encore observées dans le SLd et dans la partie latérale du SLi.

II. Répartition des populations cellulaires du septum latéral contenant la parvalbumine, la calbindin-D28K, le GABA et la NADPH-diaphorase

1 - Distribution des neurones immunoréactifs pour la parvalbumine (IR-PV)

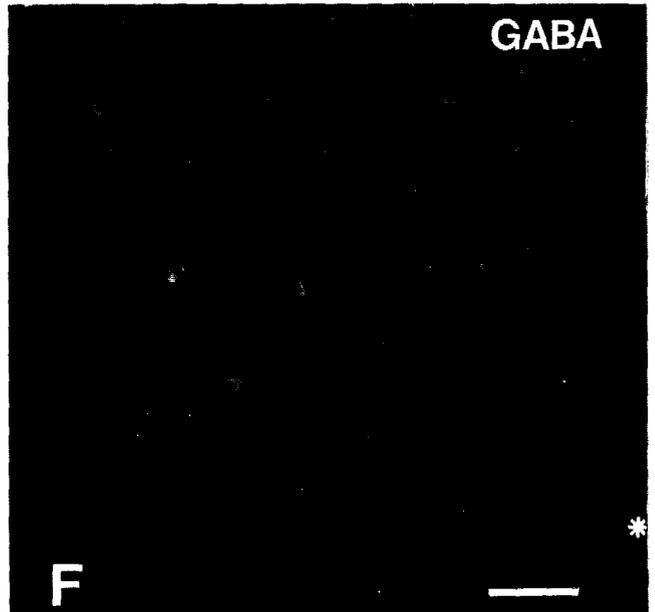
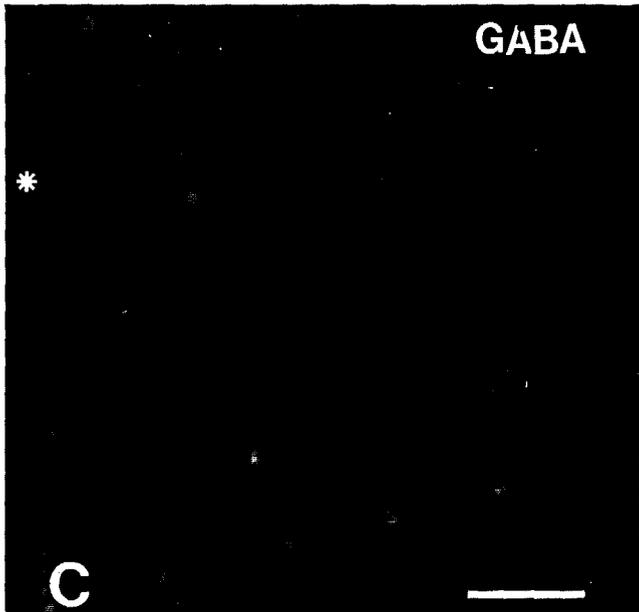
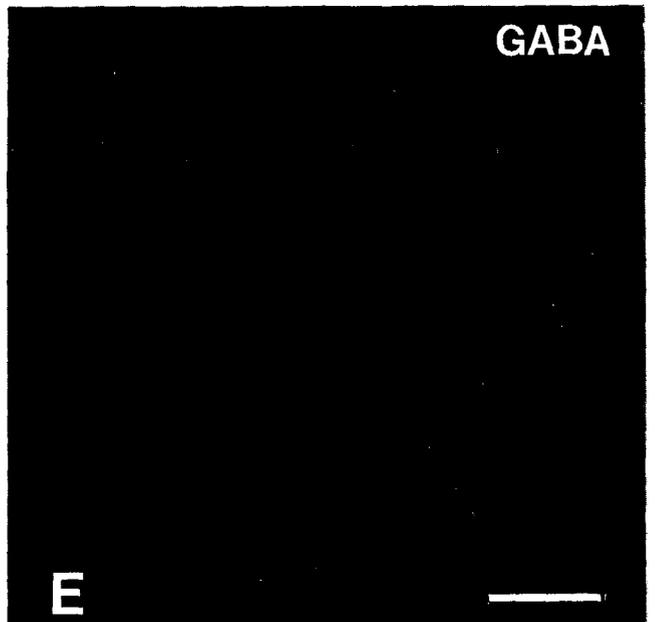
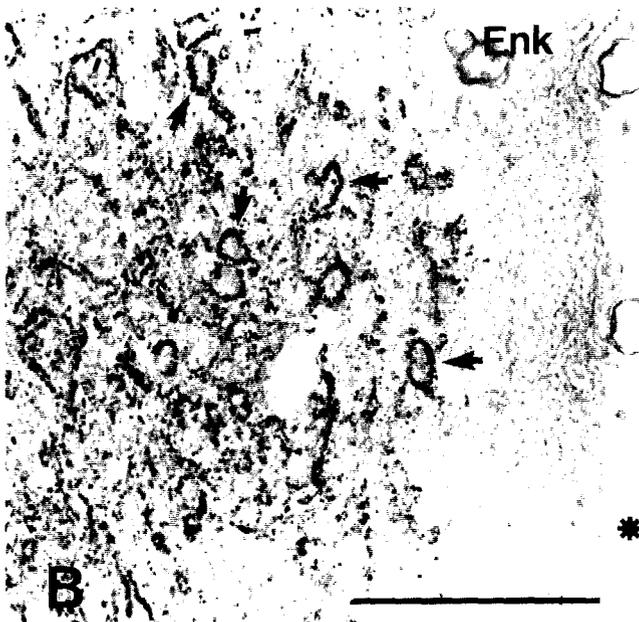
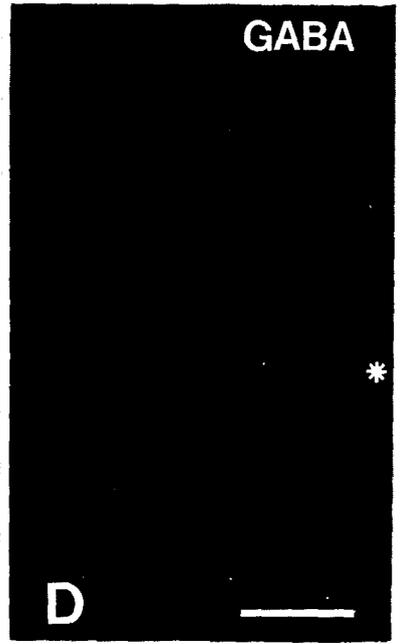
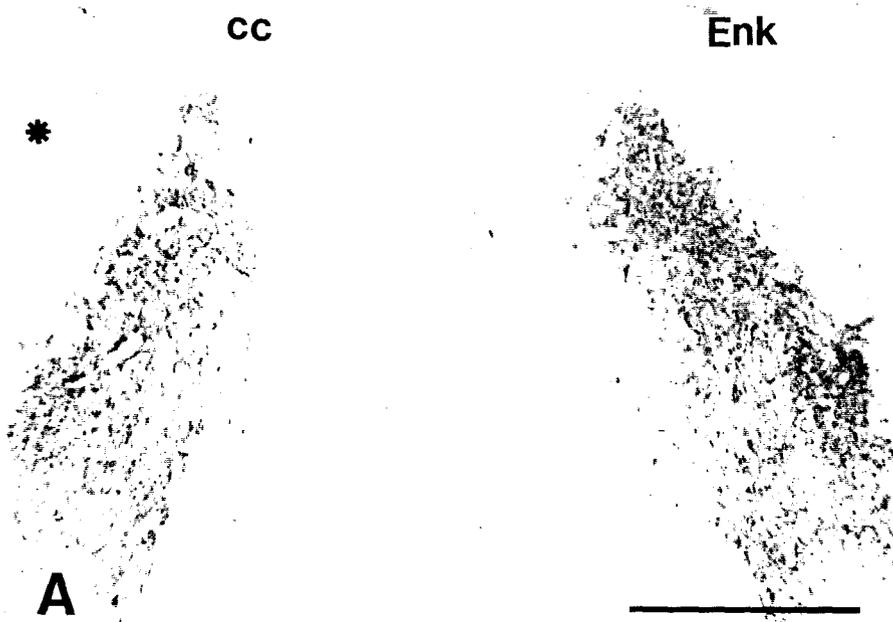
Il n'existe quasiment pas de neurones IR-PV dans le SL (figure 15). Le marquage est faible et ne concerne que le corps cellulaire de quelques neurones dispersés au sein du SL. Ces neurones ont une forme arrondie.

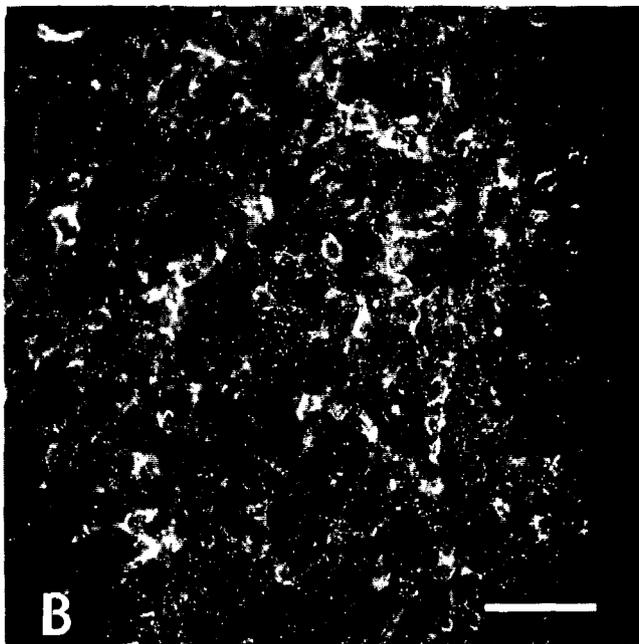
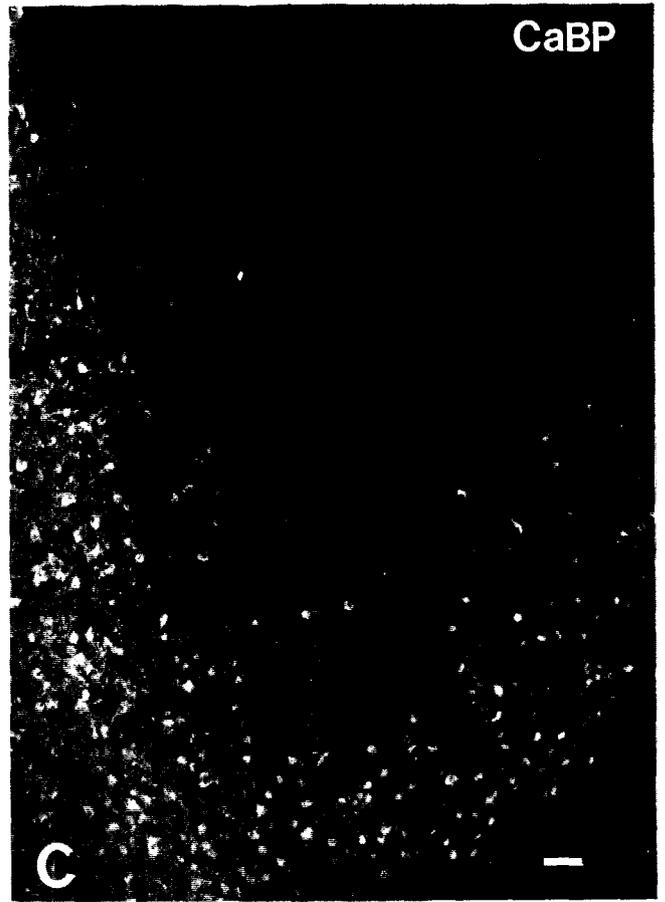
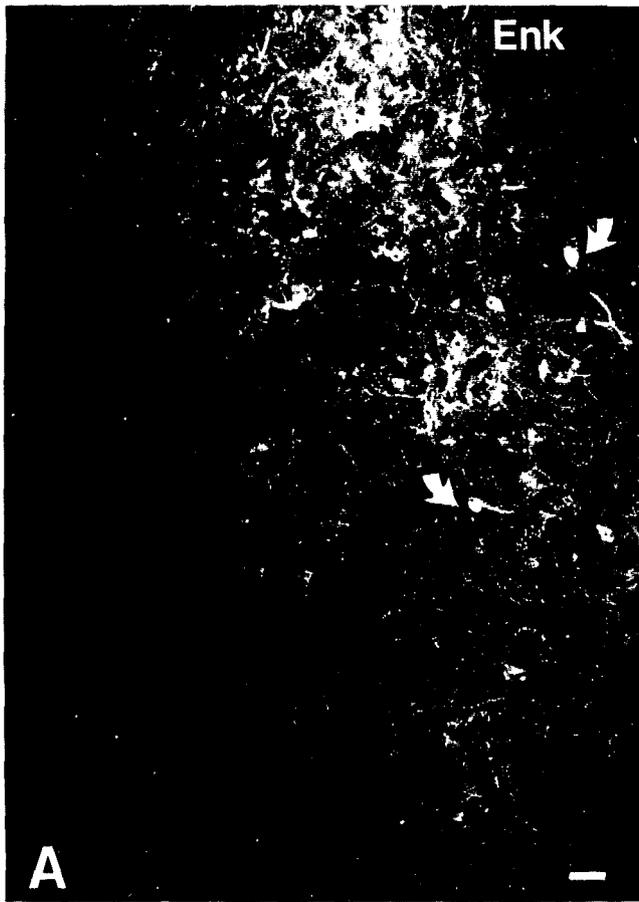
Dans le plan antérieur, quelques neurones IR-PV sont observés dans le SLd.

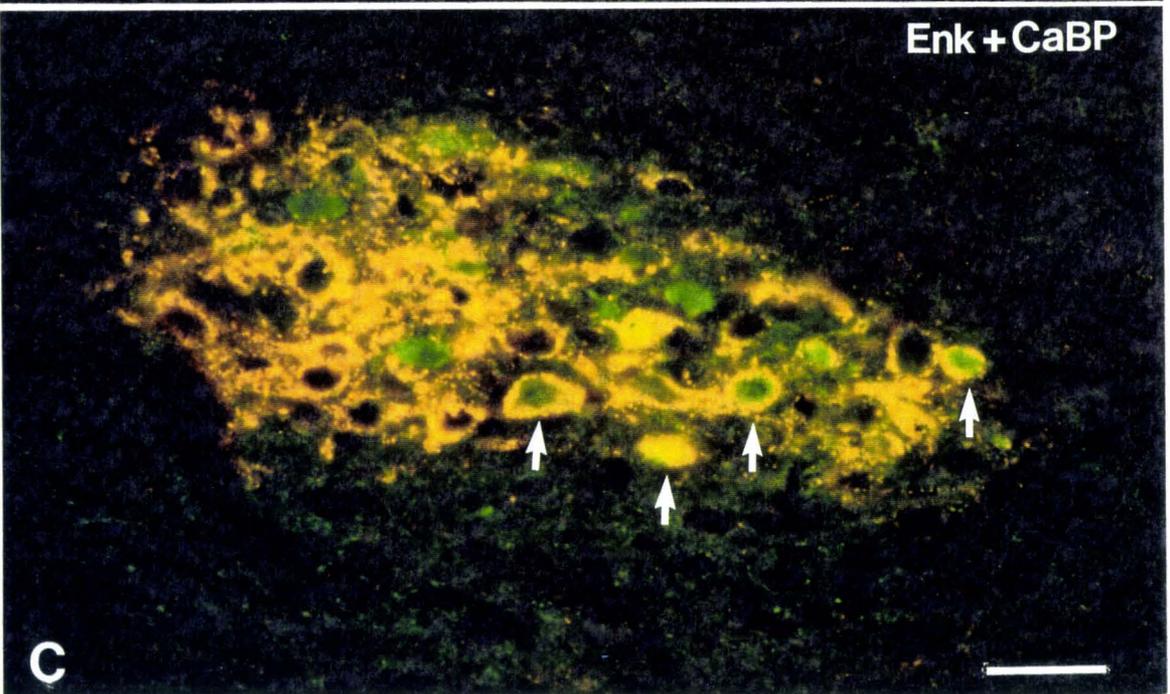
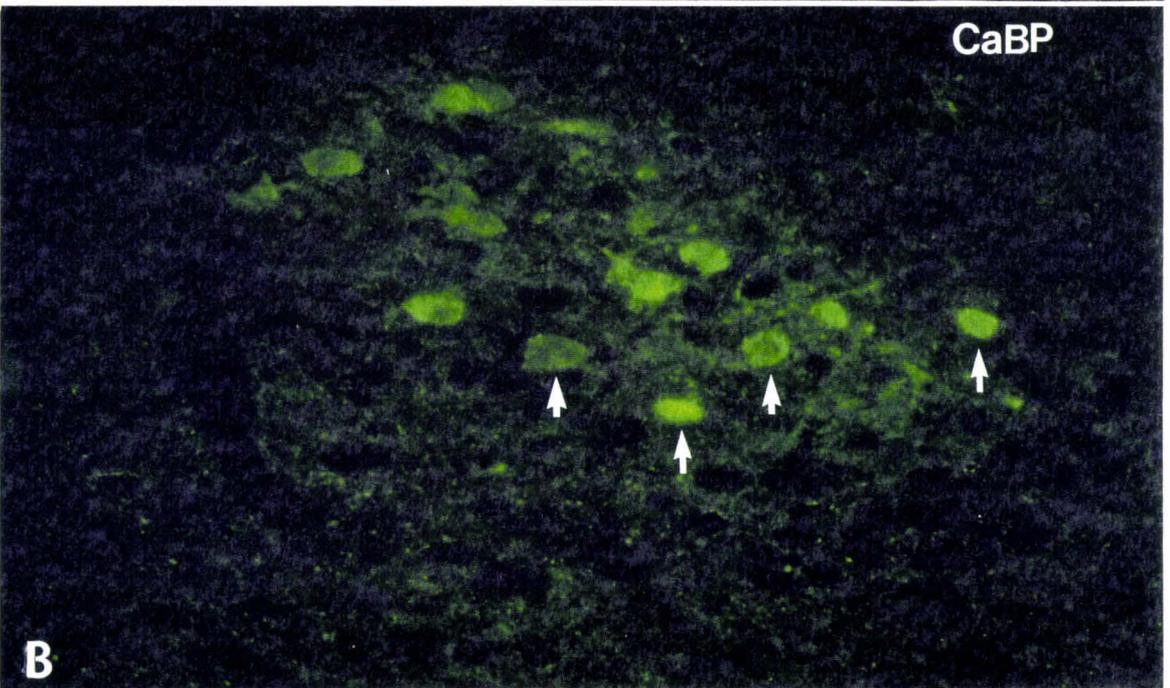
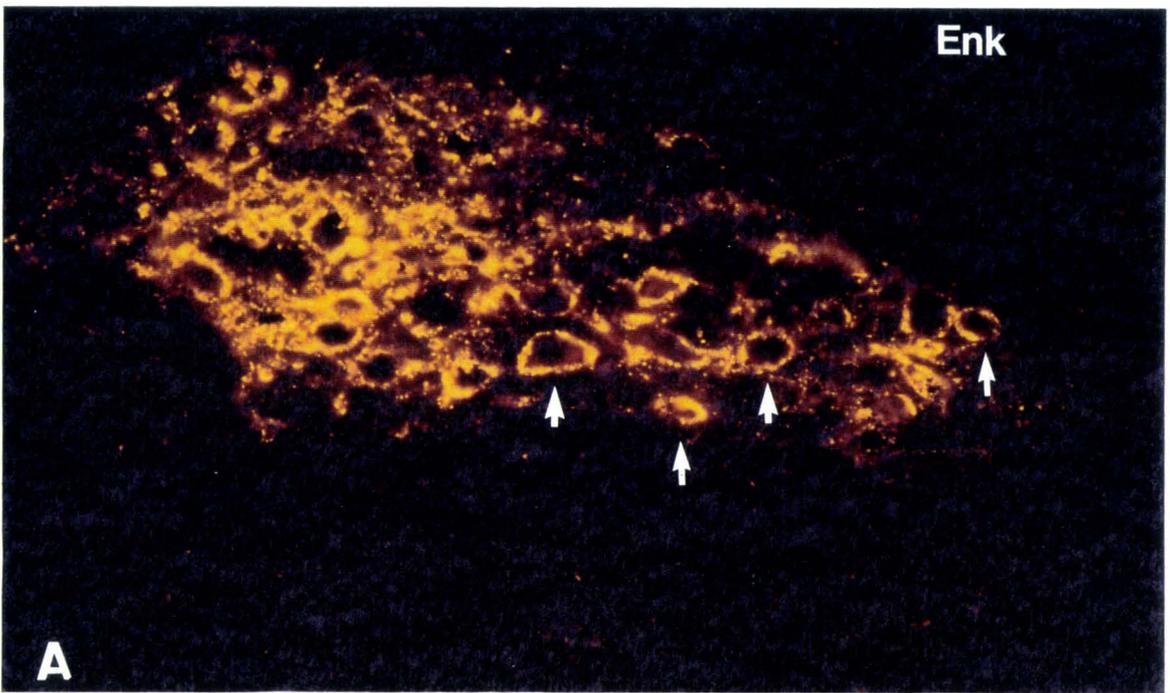
Figure 12 : Distribution des fibres et des terminaisons immunoréactives pour la met-enképhaline (Enk), détectées par des anticorps couplés à la peroxydase et révélés par la DAB (A, B), et des neurones GABAergiques (IR-GABA), détectés par des anticorps couplés à la FITC (C-F) sur des coupes frontales de SL. A. Dans le plan intermédiaire, l'innervation met-enképhalinergique est abondante et intéresse une grande partie du SLml. B. Détail des arrangements périsonomatiques (flèches). Les ponctuations met-enképhalinergiques encapsulent complètement le neurone ou sont dispersées au sein du SL. C. Répartition des neurones IR-GABA dans le SL antérieur : population de neurones IR-GABA présente dans la partie ventrale du SLd. D. Neurones IR-GABA localisés dans la partie dorsale du SLd. E. Répartition plus disséminée des neurones IR-GABA dans le SLi. F. Groupe de neurones IR-GABA dans le SLv. Ventricule latéral : étoile. Barres de calibration : 100 μm .

Figure 13 : Illustration d'une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline (Enk), révélée par le TRITC, et contre la calbindin-D28K (CaBP), révélée par la FITC sur les mêmes coupes frontales de SLml. Le ventricule latéral est à droite. A, B. Distribution des fibres met-enképhalinergiques dans le SLml avant la décussation de la commissure antérieure. Notez la présence de corps cellulaires dans le SLi (A flèches incurvées) et à fort grossissement (B), les arrangements périsonomatiques qui concernent de nombreux neurones du SLml. C, D. Distribution des neurones IR-CaBP sur les mêmes coupes. Barres de calibration : 50 μm .

Figure 14 : Illustration d'une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline (Enk), révélée par le TRITC, et contre la calbindin-D28K (CaBP), révélée par la FITC sur une même coupe frontale de SLml au niveau du noyau stigmaté. Le ventricule latéral est à droite. A. Arrangements périsonomatiques constitués par les terminaisons met-enképhalinergiques. B. Neurones IR-CaBP. C. Double exposition révélant les populations de neurones IR-CaBP entourés ou non par les terminaisons met-enképhalinergiques. Les flèches pointent les neurones doublement marqués. Barre de calibration : 50 μm .







Dans les plans intermédiaires, d'autres rares neurones IR-PV sont détectés dans le SLml.

Dans le plan postérieur, les neurones IR-PV sont uniquement détectés dans le SLd.

2 - Distribution des neurones immunoréactifs pour la calbindin-D28K (CaBP), comparaison avec la distribution des neurones immunoréactifs pour le GABA (IR-GABA), innervation enképhalinergique

2.1) Distribution des neurones IR-CaBP

Les neurones IR-CaBP ont une distribution tout à fait particulière dans le SL (figure 16). Le marquage des cellules est généralement dense et concerne un grand nombre de neurones dont le corps cellulaire est rond ou ovoïde. Des prolongements dendritiques épais sont couramment marqués.

Dans le plan antérieur, des neurones IR-CaBP sont détectés dans le noyau stigmoïde (figure 14B). De même, des neurones IR-CaBP sont dispersés sur l'ensemble du SL, hormis la partie ventrale du SLml.

Dans les plans intermédiaires, les neurones immunoréactifs pour la CaBP constituent une bande qui prend naissance dans le noyau septo-hippocampal, se poursuit le long du SM dans la région correspondant au noyau septo-fimbrial et se termine dans la partie ventro-médiale du SLml (figure 13C). Des neurones IR-CaBP sont également observés dans la partie dorsale du SLml. Le SLml est donc une région riche en neurones IR-CaBP (figure 13D). Quelques neurones sont également observés dans le NLST.

Dans le plan postérieur, les neurones IR-CaBP sont cantonnés dans la partie ventrale du SL. Leur nombre faible dans les parties dorsale et médiale du SLml. Quelques neurones sont observés dans le NLST.

2.2) Comparaison avec les neurones IR-GABA

L'étude de la répartition des neurones IR-GABA a été réalisée sur des animaux colchicinisés. Cette procédure a permis d'identifier la distribution des neurones GABAergiques et ainsi de les comparer à celle des neurones à CaBP.

La distribution des corps cellulaires IR-GABA est assez hétérogène dans le SL (figure 17). Le marquage est faible, il est observé dans le corps cellulaire ainsi que parfois dans les dendrites proximales (figure 12C-F). Des

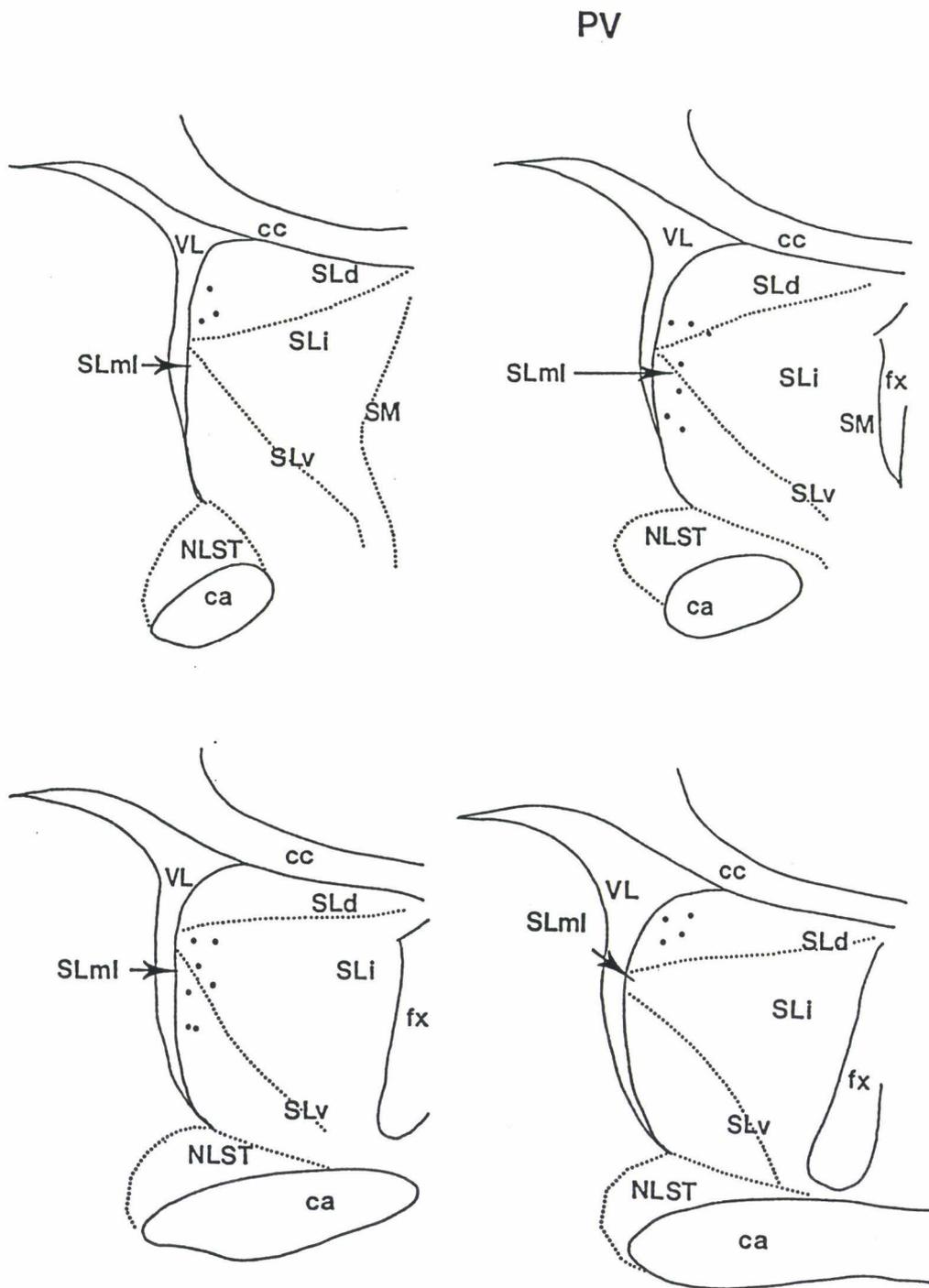


Figure 15 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL des corps cellulaires immunoréactifs pour la parvalbumine (PV). (●) corps cellulaires.

CaBP

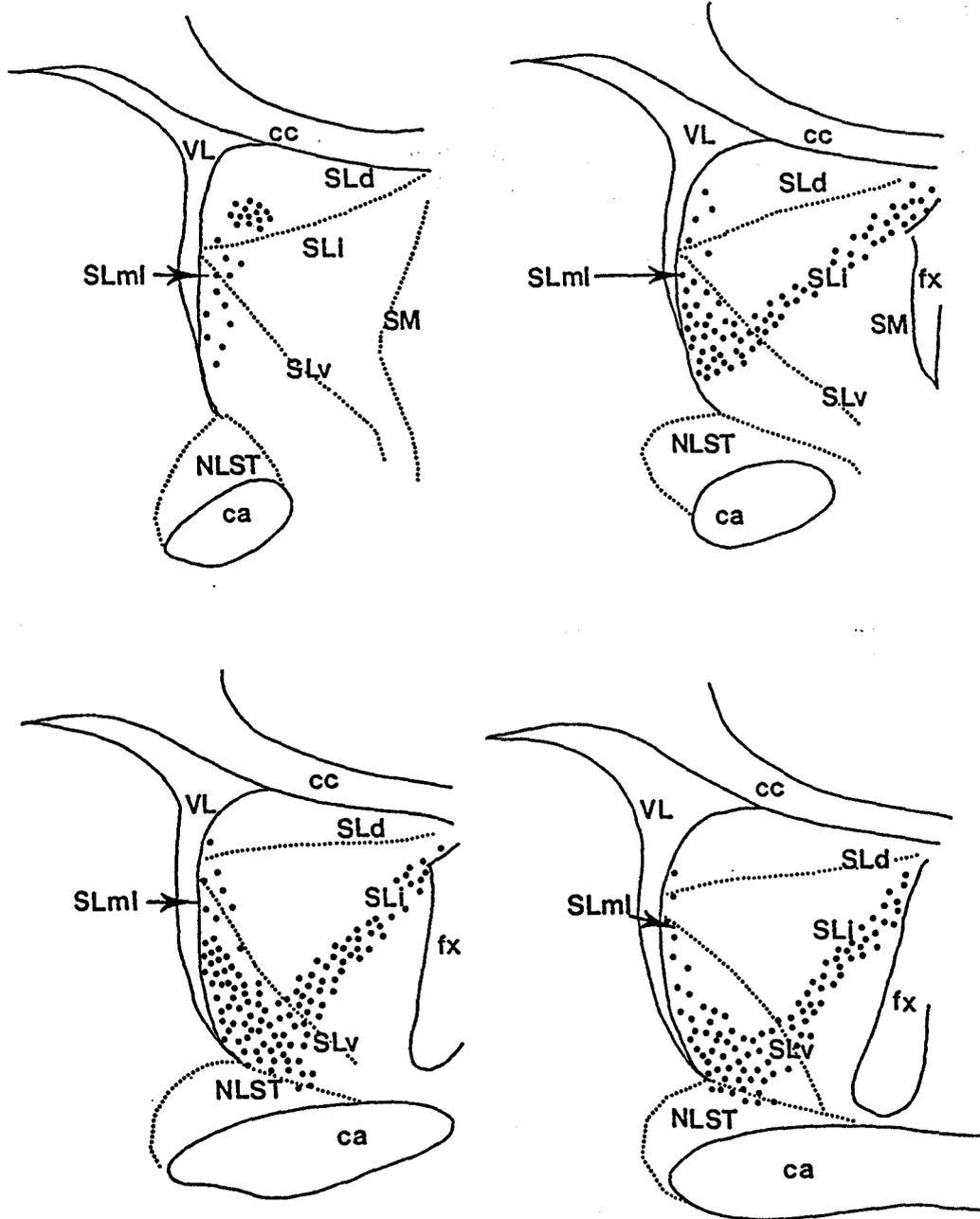


Figure 16 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL des corps cellulaires immunoréactifs pour la calbindin-D28K (CaBP). (●) corps cellulaires.

GABA

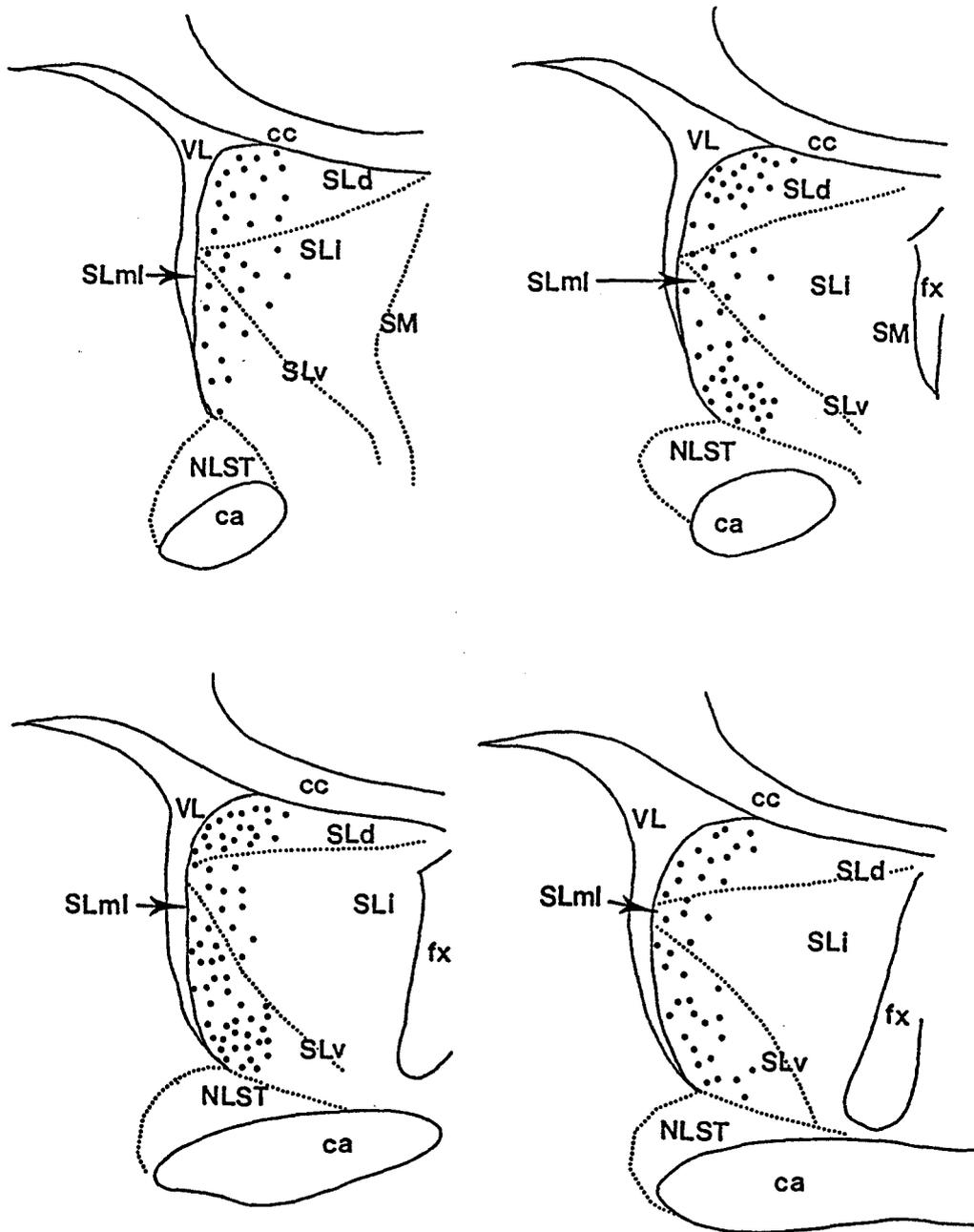


Figure 17 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL des corps cellulaires immunoréactifs pour le GABA. (●) corps cellulaires.

fibres ou des punctuations IR-GABA n'ont pas été détectées. Divers types cellulaires IR-GABA sont observés dans le SL. Le SLd, le SLi comprennent essentiellement des cellules de grande taille et de forme diverse, alors que le SLv se caractérise plutôt par des cellules plus petites et rondes.

Dans le plan antérieur, les neurones IR-GABA sont localisés de manière homogène sur l'ensemble du SL. Il n'apparaît pas de populations distinctes (figure 12C, D).

Dans des plans intermédiaires, les neurones IR-GABA sont plutôt localisés dans le SLd, en nombre relativement important. De même, quelques neurones IR-GABA sont regroupés dans le SLv. Des neurones sont également observés de manière plus éparse dans le SLi (figure 12E).

Dans le plan postérieur, les neurones IR-GABA gardent approximativement une répartition identique, bien que le nombre de neurones soit beaucoup moins important que dans les plans antérieurs (figure 12F).

Ces données montrent bien que les populations de neurones IR-GABA et de neurones IR-CaBP ne sont pas entièrement superposables. Les deux populations occupent cependant un territoire commun qui est la partie ventrale du SL.

2.3) Innervation enképhalinergique des neurones IR-CaBP

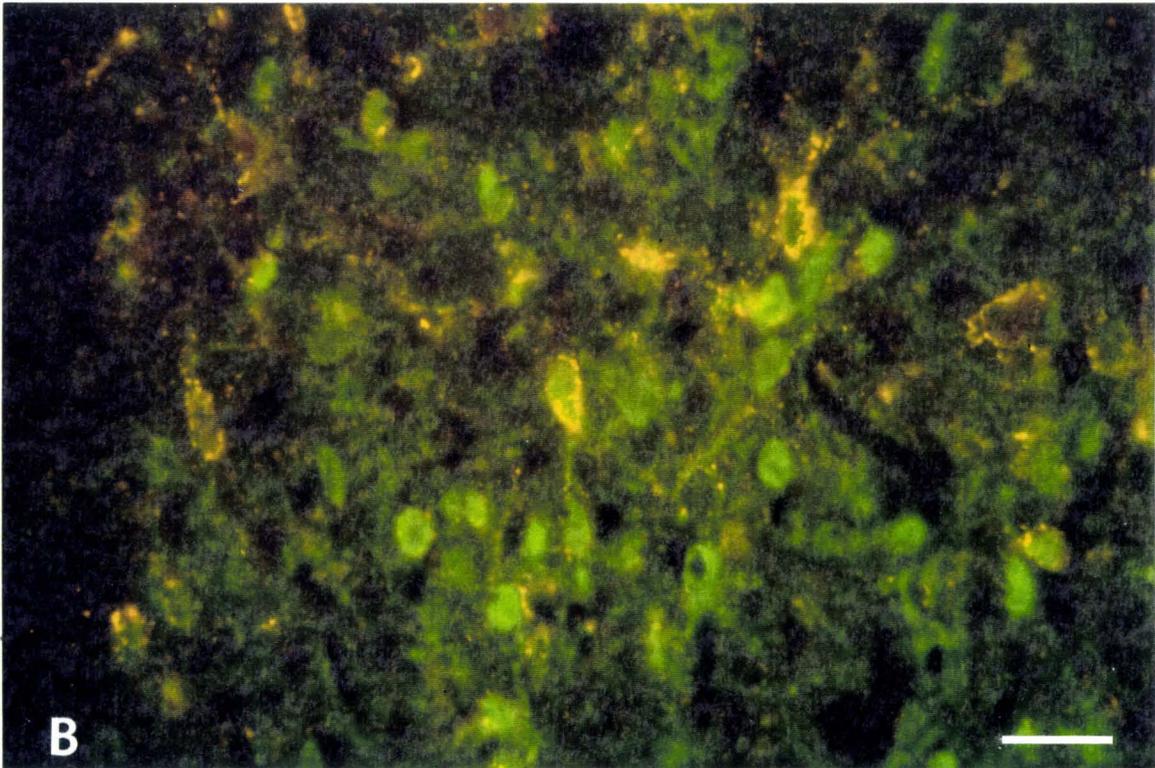
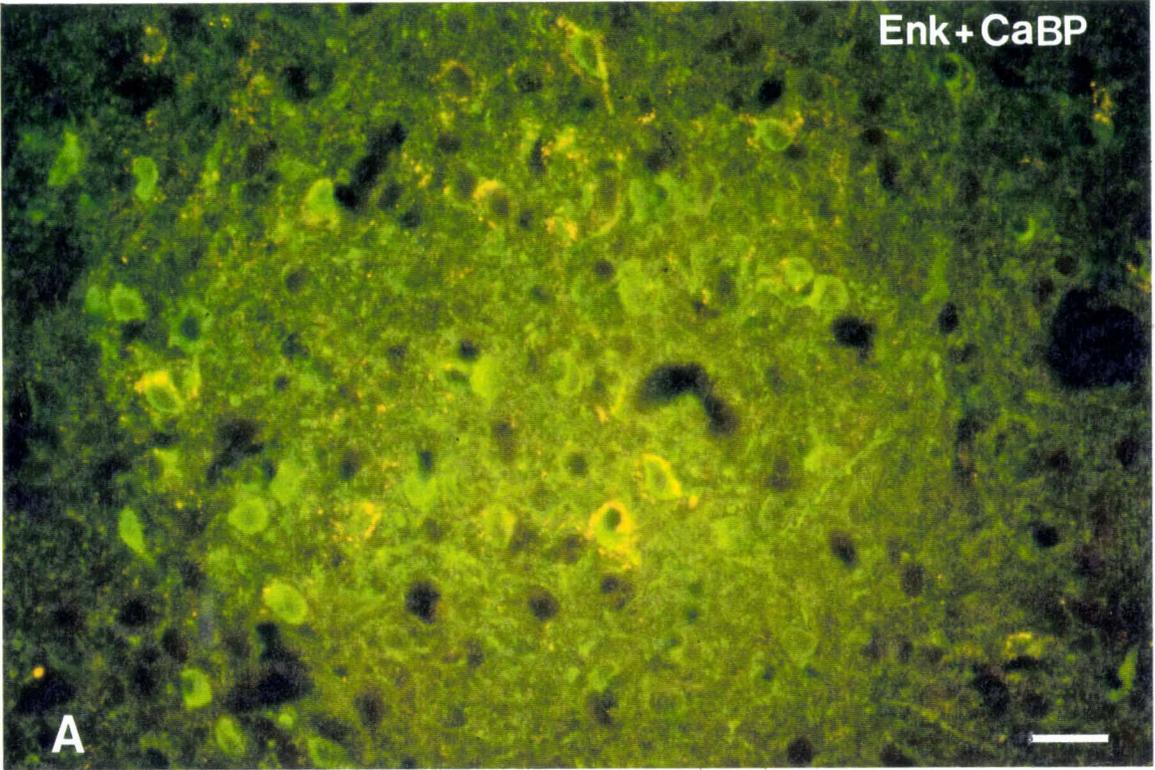
La présence de nombreux neurones IR-CaBP dans les régions du SL recevant l'innervation enképhalinergique laisse supposer l'existence d'appositions. La réalisation d'un double marquage en immunofluorescence révélant les neurones à CaBP en vert (FITC) et les fibres enképhalinergiques en rouge (TRITC) confirme cette supposition (figures 14, 18).

Dans le plan antérieur, le noyau stigmoïde contient quelques neurones IR-CaBP encapsulés par les fibres enképhalinergiques (figure 14C).

Dans les plans intermédiaires, les mêmes arrangements périsonomatiques sont observés autour des neurones IR-CaBP localisés dans les parties médiale et ventrale du SLml (figure 18A, B).

Dans le plan postérieur, l'innervation enképhalinergique ne concerne plus que quelques neurones IR-CaBP localisés dans le SLml.

Figure 18 A,B : Illustration d'une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline (Enk), révélée par le TRITC, et contre la calbindin-D28K (CaBP), révélée par la FITC sur des mêmes coupes frontales de SLml. Le ventricule latéral est à gauche. La double exposition révèle que les neurones IR-CaBP sont ou non entourés par des fibres met-enképhalinergiques. Barres de calibration : 50 μ m.



3 - Distribution des neurones à activité NADPH-diaphorase (ND+), colocalisation avec la calbindin-D28K, innervation enképhalinergique

3.1) Distribution des neurones ND+

Les neurones ND+ présentent une coloration qui va du bleu pâle au bleu-violet très foncé. La morphologie de ces neurones est très hétérogène (figures 19, 20). Le marquage intéresse le corps cellulaire, les dendrites proximales et parfois distales (figure 20A, B). Des fibres variqueuses ND+ sont également observées (figure 20C).

Dans le plan antérieur, le marquage est limité au noyau stigmoïde (figure 20A).

Dans les plans intermédiaires, les neurones ND+ se raréfient peu à peu dans le SLd, pour ne plus être localisés que dans le SLml, qui comprend un nombre relativement élevé de neurones (figure 20B) et dans le SLv.

Dans le plan postérieur, les neurones ND+ se font de plus en plus rares dans le SLml et sont remplacés par un lavis de fibres nerveuses variqueuses (figure 20C). Les nombreuses fibres ND+ occupent un territoire qui prend naissance au niveau du noyau septo-hippocampique, se poursuit le long du noyau septo-fimbrial et se termine dans le SLv (ou dans la partie ventrale du SLml).

3.2) Colocalisation ND/CaBP

La détection simultanée des neurones ND+ et IR-CaBP a été réalisée grâce à une technique de double marquage. Pour cela, les neurones IR-CaBP sont détectés avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase et en fonction du chromogène utilisé, la DAB ou la 3-amino-9-éthylcarbazole, ils présentent respectivement une coloration brune ou rouge. Les neurones ND+ étant bleus, lors d'un double marquage, les neurones présentent une coloration brunâtre.

3.2.1) Répartition des deux populations

La détection simultanée des neurones ND+ et IR-CaBP montre une distribution comparable des deux populations neuronales dans l'ensemble du SL. Certains territoires, cependant, dans les plans intermédiaires et postérieur, présentent une répartition différente des deux populations.

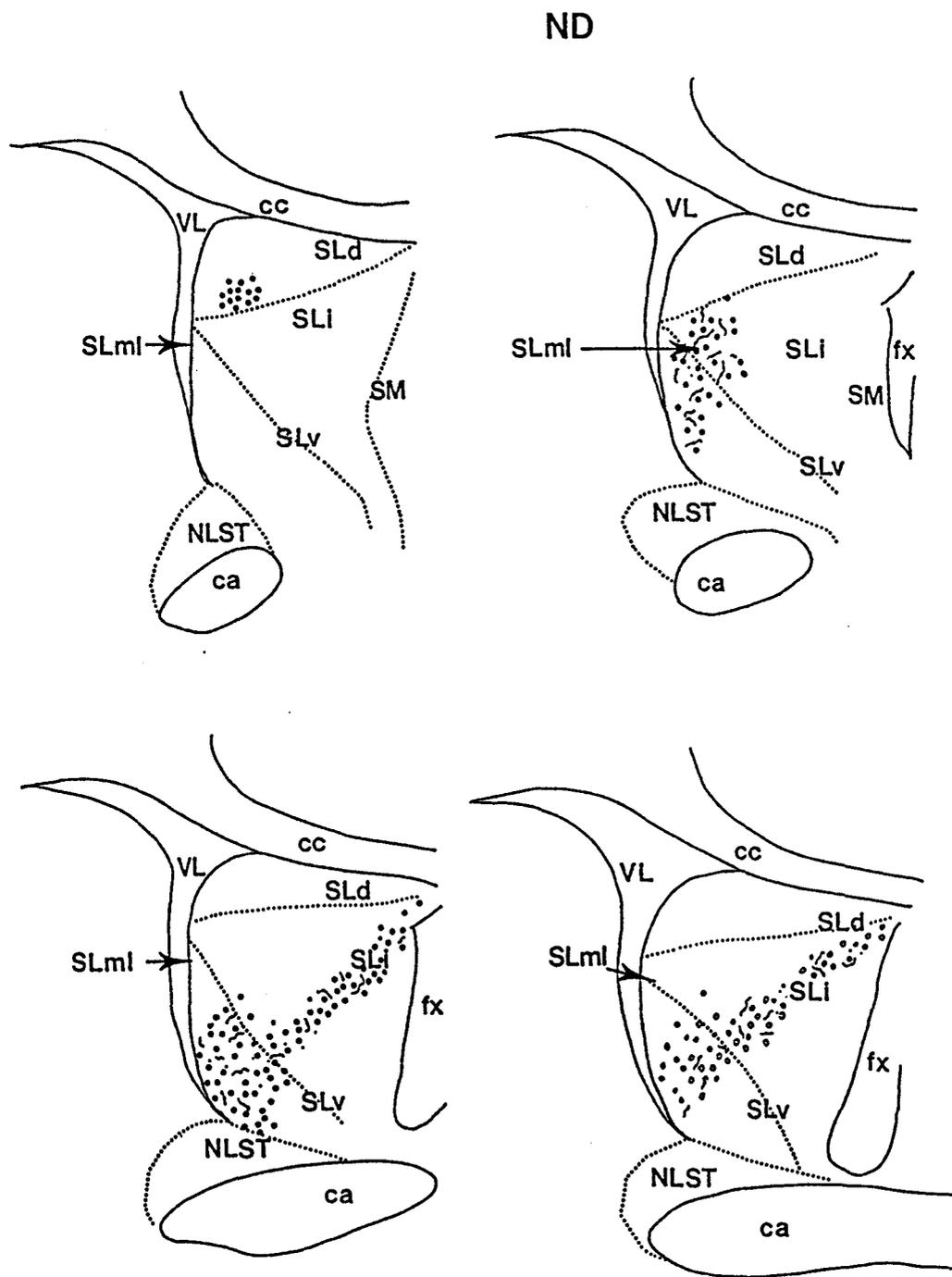


Figure 19 : Représentation schématique dans les plans frontaux du SL des corps cellulaires et des fibres à activité NADPH-diaphorase (ND). (●) corps cellulaires, (○) arrangements périsonomatiques.

Dans les plans intermédiaires, juste avant la décussation de la commissure blanche antérieure, les neurones ND+ occupent un territoire adjacent à celui occupé par les neurones IR-CaBP (figures 20A, B, 21B).

Dans le plan postérieur, les rares neurones ND+ sont localisés dans le SLml à proximité des neurones IR-CaBP. Les nombreuses fibres ND+ présentes dans cette région occupent un territoire adjacent à celui des neurones IR-CaBP.

3.2.2) Double marquage

Des doubles marquages sont observés pour un nombre important de neurones dans différents plans du SL.

Dans le plan antérieur, dans le noyau stigmoïde, certains neurones IR-CaBP sont ND+ (figure 20A).

Dans les plans intermédiaires, la ND colocalise avec la CaBP pour des neurones du SLml et du SLv, comme cela est représenté sur les figures 20B, 21B, 22B. Enfin, au niveau de la décussation de la commissure blanche antérieure, les marquages multiples deviennent plus rares.

Dans le plan postérieur, il n'existe pas de colocalisation ND/CaBP dans les neurones du SL. Par contre, il est à noter que les neurones IR-CaBP du SLml sont entourés par des fibres variqueuses qui encapsulent complètement le neurone ainsi que ses prolongements dendritiques proximaux (figure 20C).

3.3) Innervation enképhalinergique des neurones ND+ et neurones ND+/IR-CaBP

La distribution des neurones ND+ et des neurones colocalisant ND/CaBP semblait correspondre en partie à celle des neurones recevant l'innervation enképhalinergique. Un triple marquage où les fibres enképhalinergiques sont cette fois détectées par des anticorps secondaires couplés à la FITC a été réalisé (figures 21A, 22A).

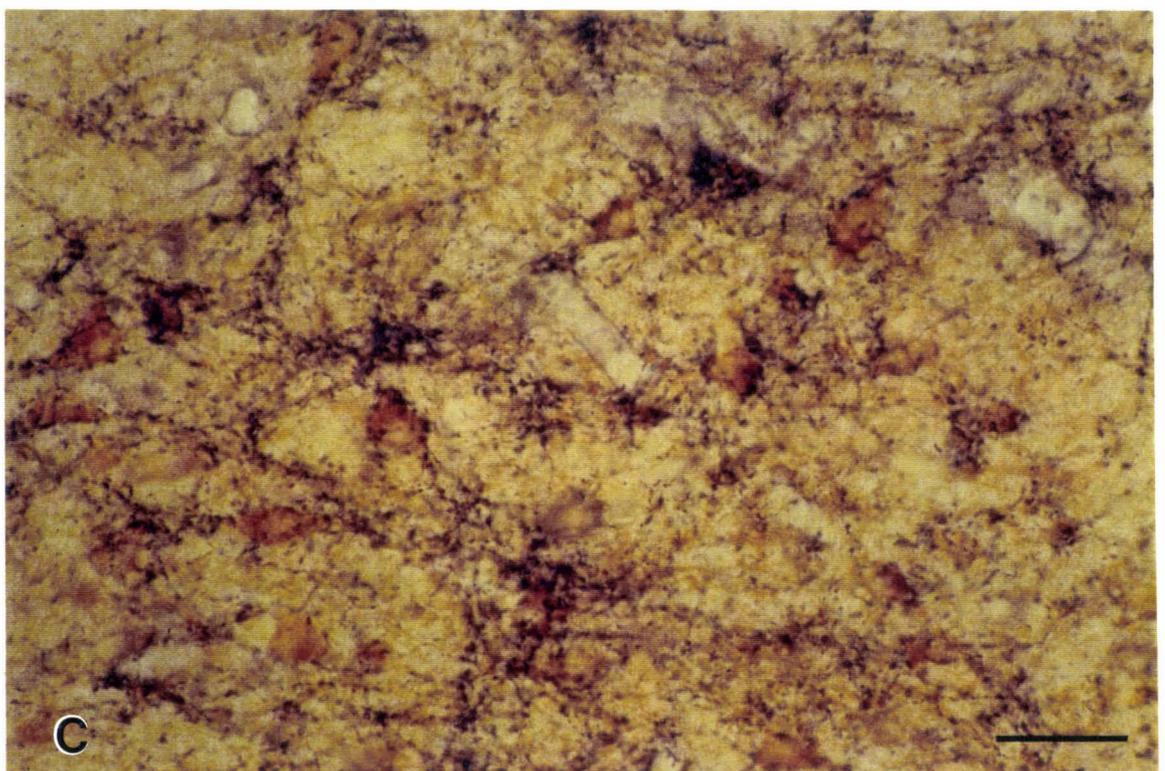
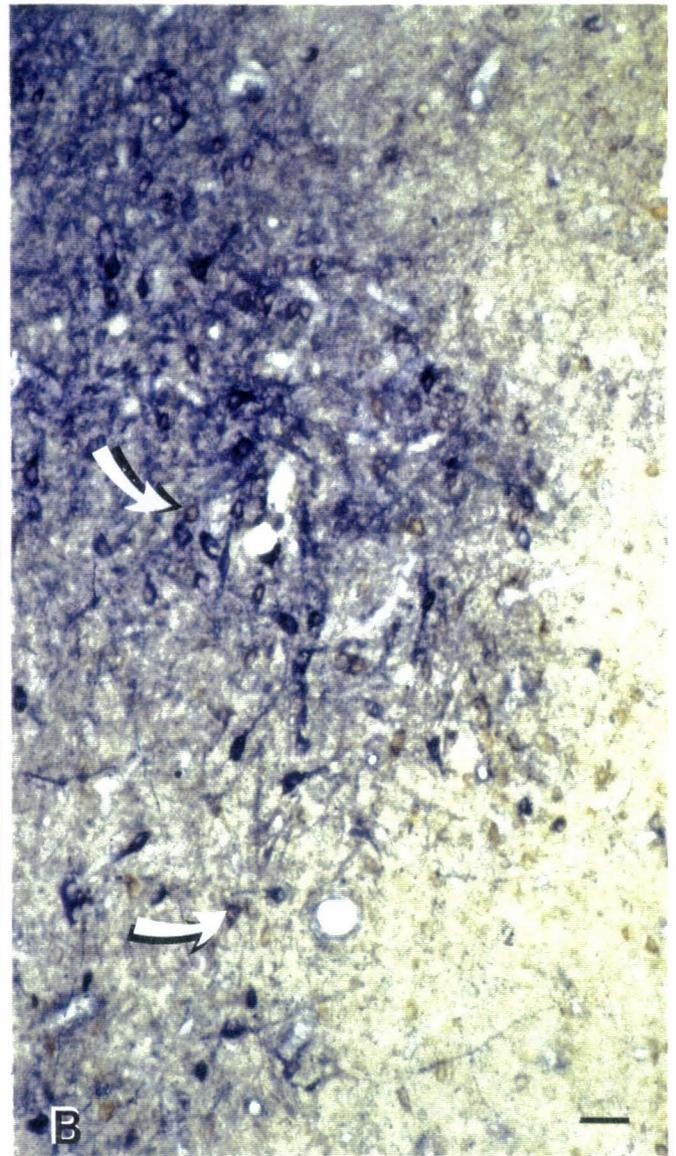
Dans le plan antérieur, il s'avère qu'un faible nombre de neurones ND+ ou ND+/IR-CaBP du noyau stigmoïde soient contactés par des fibres IR-Enk.

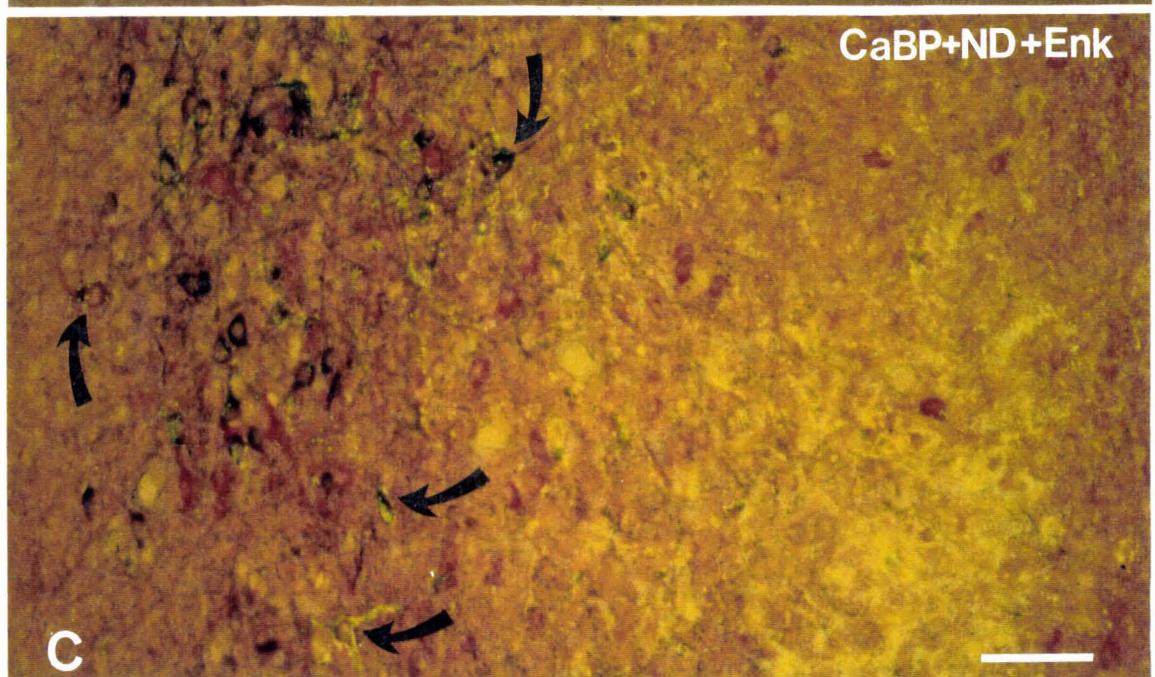
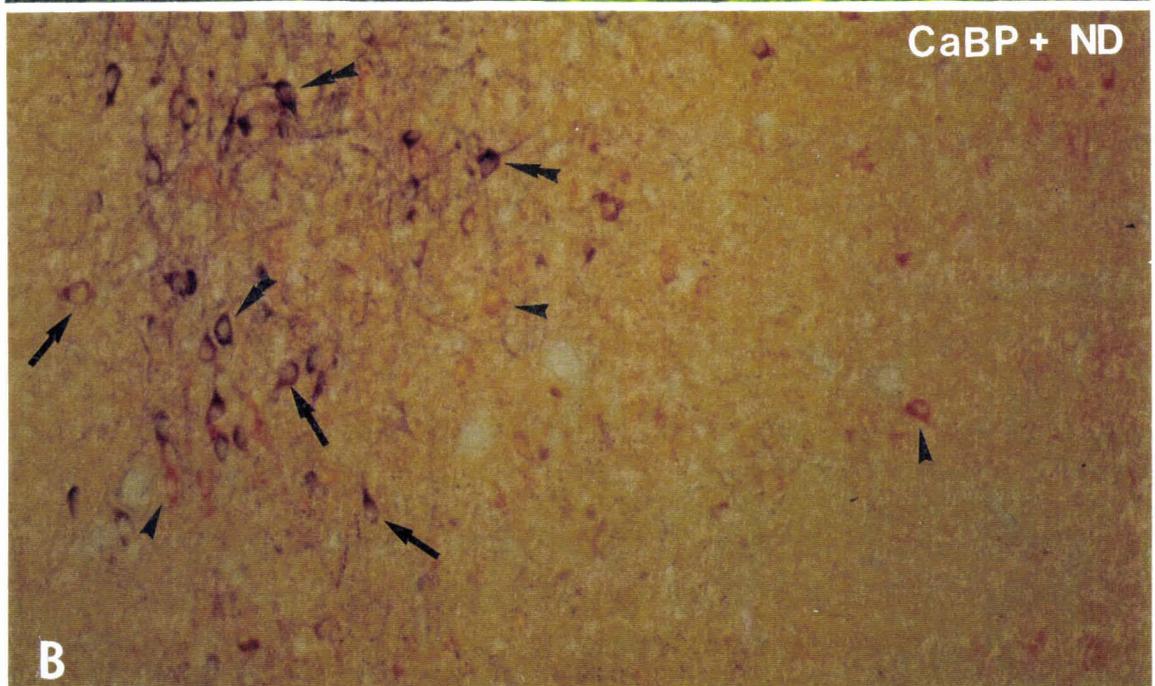
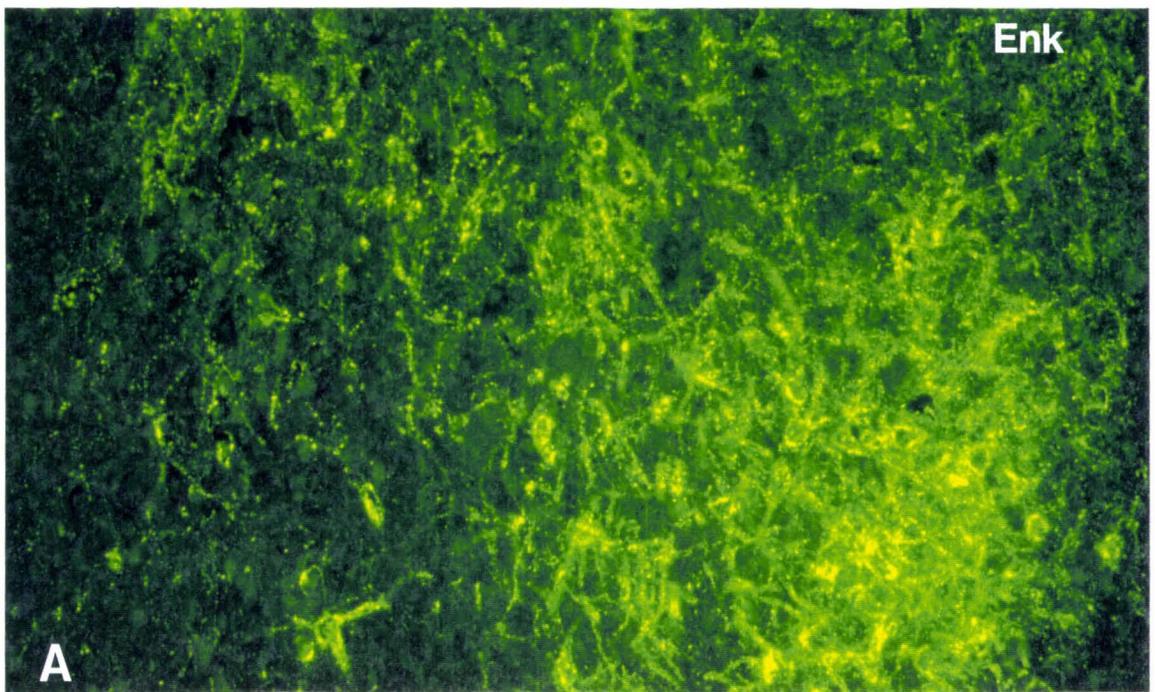
Dans les plans intermédiaires, les fibres IR-Enk contactent, dans le SLml, de nombreux neurones ND+ mais très peu de neurones ND+/IR-CaBP (figures 21C, 22C).

Dans le plan postérieur, il n'existe plus de marquages multiples étant donné la distribution différentielle de ces trois substances dans le SLml et le

Figure 20 : Illustration d'une réaction immunocytochimique dirigée contre la calbindin-D28K (CaBP) révélée par la DAB (en marron) couplée à une détection histochimique de la NADPH diaphorase (ND, en bleu foncé) sur des coupes frontales de SL. **A.** Dans le plan antérieur, disposition des différentes populations de neurones dans le noyau stigmoïde (en haut, à gauche) et dans le SLml. Les deux substances sont colocalisées dans certains neurones (flèches). Ventricule latéral : étoile. **B.** Dans les plans intermédiaires, le SLml comprend un nombre important de neurones ND+ parmi lesquels se trouvent des neurones IR-CaBP. Les neurones doublement marqués sont indiqués par des flèches incurvées. **C.** Dans le plan postérieur, des neurones IR-CaBP sont entourés par des fibres ND+. Barres de calibration : 50 µm.

Figure 21 : Illustration d'une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline (Enk) révélée par la FITC et contre la calbindin-D28K (CaBP), révélée par la 3-amino-éthyl-carbazole, couplée à une détection histochimique de la NADPH diaphorase (ND) sur la même coupe frontale du SLml. Le ventricule latéral est à droite. **A.** Fibres met-enképhalinergiques observées en fluorescence. **B.** Neurones IR-CaBP (rouges ; pointe de flèche) et de neurones ND+ (bleus ; double pointes de flèches), observés en fond clair. Notez la distribution différentielle des neurones IR-CaBP et des neurones ND+ dans la partie la plus latérale du SLml ainsi qu'une région de correspondance entre les deux populations dans la zone plus médiale du SLml. Des neurones sont doublement marqués (flèches). **C.** Double exposition révélant la présence de fibres met-enképhalinergiques au contact de neurones marqués (flèches incurvées). Barre de calibration : 100 µm.





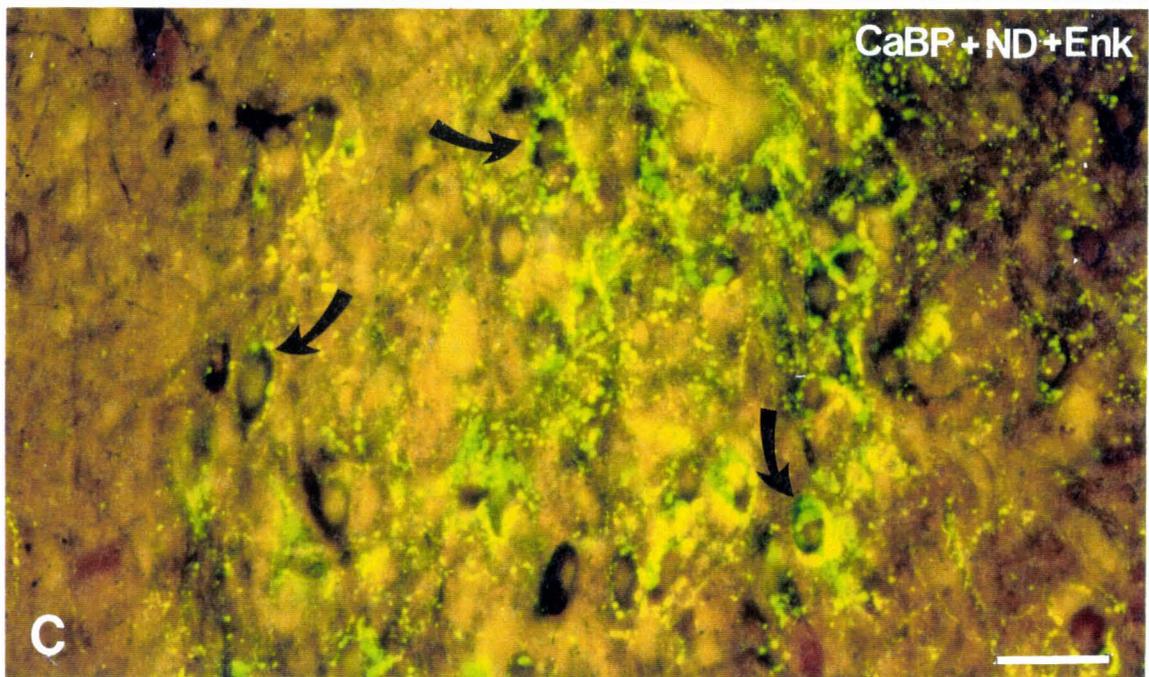
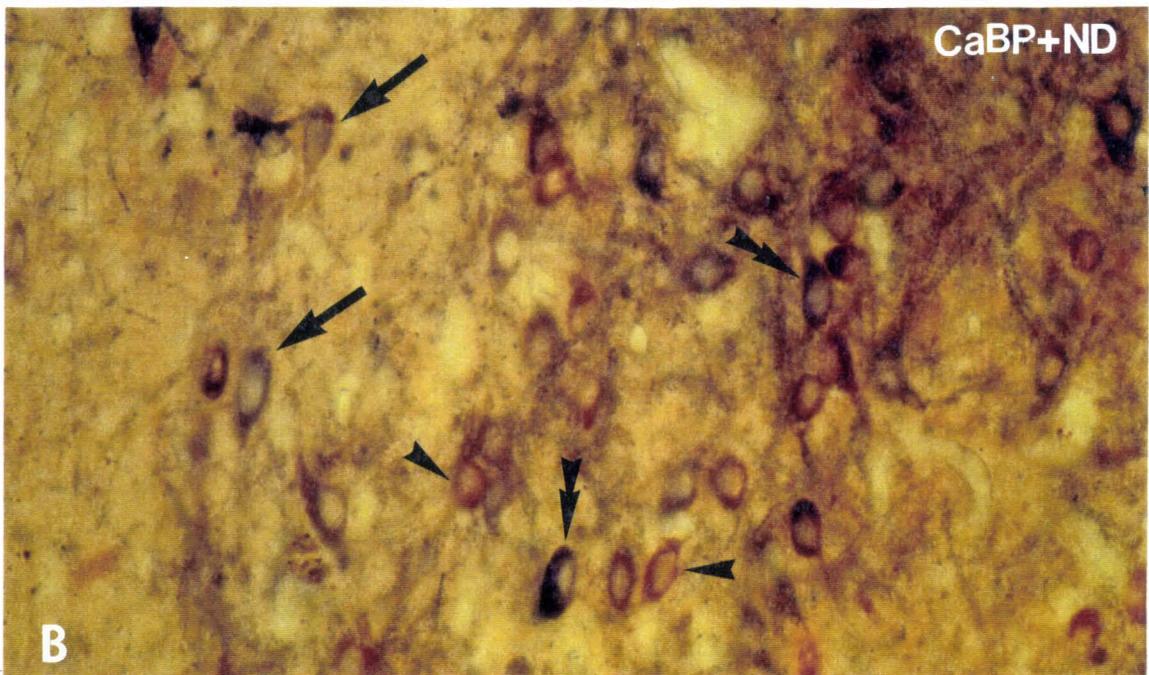
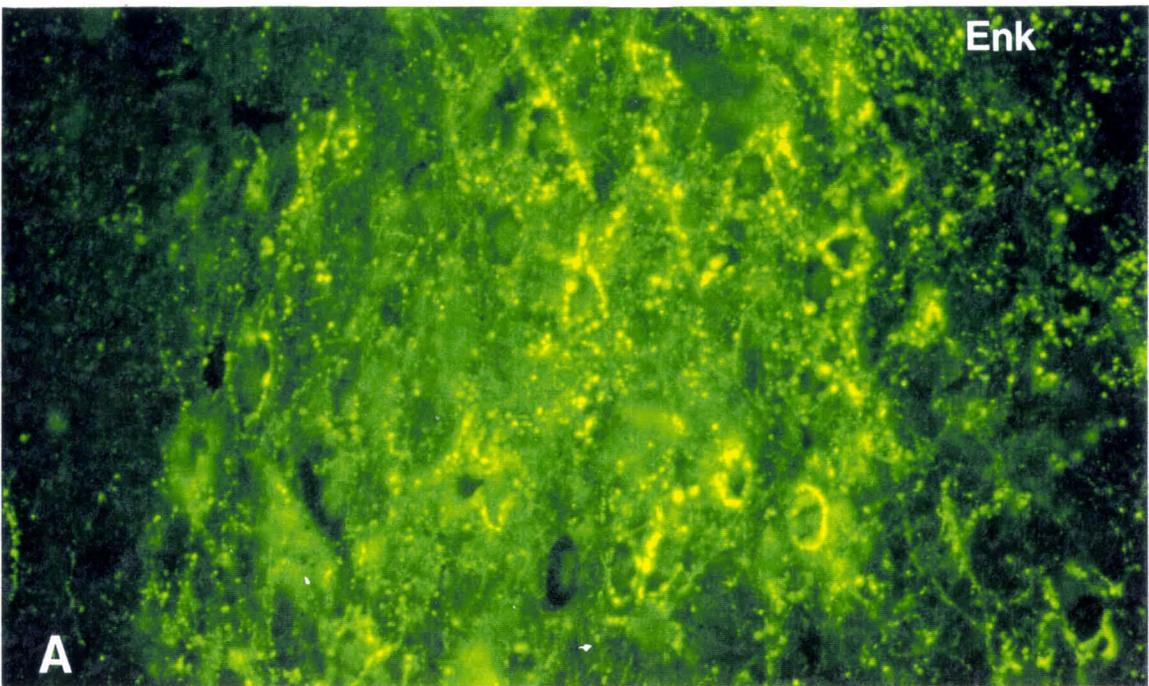
SLv, où sont encore observés des neurones IR-CaBP (et des fibres ND+), mais où l'innervation enképhalinergique a quasiment disparu.

Tableau 4 : Répartition des différents marquages immunocytochimiques dans le SL.

	SLd	SLi	SLv	SLml
SOM	+	±	+	±
NT	±	±	++	++
TH	++	+	++	++
VP	0	0	-	0
Enk	±	++	+	++
GABA	+	+	+	+
PV	-	0	0	0
CaBP	±	++	++	++
ND	±	++	++	++

++ très dense ; + dense ; ± moyennement dense ; - peu dense ; 0 pas de marquage.

Figure 22 : Illustration d'une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline (Enk) révélée par la FITC et contre la calbindin-D28K (CaBP), révélée par la 3-aminoéthyl-carbazole, couplée à une détection histochimique de la NADPH diaphorase (ND) sur la même coupe frontale du SLml. Le ventricule latéral est à gauche. A. Fibres met-enképhalinerigiques observées en fluorescence. B. Neurones IR-CaBP (rouges ; pointe de flèche) et de neurones ND+ (bleus ; double pointes de flèches), observés en fond clair. Les flèches pointent des neurones doublement marqués. C. Double exposition révélant la présence de fibres met-enképhalinerigiques au contact de neurones marqués (flèches incurvées). Barre de calibration : 50 μ m.



Discussion

I. Distribution des afférences au septum latéral

1 - Remarques générales

Le présent travail apporte une description précise des diverses afférences contactant les neurones du SL du cobaye. Les résultats obtenus au cours de cette étude immunocytochimique concordent généralement avec les descriptions apportées par la littérature chez le rat.

La distribution des fibres IR-SOM dans le SL de cobaye correspond globalement à ce qui est décrit chez le rat (Woodhams et coll, 1983 ; Köhler et Eriksson, 1984 ; Jakab et Leranth, 1991, 1993). Les arrangements périsonomatiques, particulièrement nombreux, sont observés, comme chez le rat, dans le SLd, le SLml et le SLv. Des neurones immunoréactifs pour la SOM, détectés chez le rat par Köhler et Eriksson (1984) sur des animaux non colchicinisés, sont également présents dans les mêmes régions, chez le cobaye.

En ce qui concerne plus particulièrement le SLml, la distribution des fibres et des neurones IR-SOM ressemble à ce qui est décrit par Jakab et Leranth (1991). Il existe cependant quelques variations chez le cobaye. Les arrangements périsonomatiques sont moins nombreux et il y a davantage de neurones IR-SOM. De plus, nous observons davantage de fibres variqueuses dans la partie ventrale du SLml. Chez le rat, Jakab et Leranth (1991) ont montré que les terminaisons nerveuses IR-SOM établissent des contacts synaptiques de type symétrique avec un grand nombre de neurones pourvus d'épines somatiques.

Les quelques différences observées dans la distribution des neurones et des fibres somatostatinerigiques chez le rat (Jakab et Leranth, 1991) et le cobaye, pourraient dépendre de l'anticorps choisi. Dans notre étude, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la SOM 1-12. Cet anticorps reconnaît toutes les formes de SOM, c'est à dire la SOM 1-12, la SOM 1-14 et la SOM 1-28 (Ciofi, communication personnelle). De ce fait, il est probable que tous les éléments neuronaux immunoréactifs pour la SOM aient été mis en évidence dans notre étude. L'anticorps utilisé pour décrire l'IR-SOM dans le SLml du rat est dirigé contre la SOM 1-14 (Jakab et Leranth, 1991). Après avoir testé

également l'anticorps anti-SOM 1-28, ces mêmes auteurs ont montré que l'anticorps anti-SOM 1-14 marque préférentiellement les arrangements périsonomatiques et quelques neurones seulement dans le SLv, alors que l'anticorps anti-SOM 1-28 est détecté dans de nombreux neurones répartis sur l'ensemble du SL et rarement dans les arrangements périsonomatiques. Ils suggèrent donc que les neurones contiendraient la SOM 1-28, alors que les fibres IR-SOM 1-14 proviendraient de l'aire périventriculaire hypothalamique.

Il existerait dans le SL plusieurs systèmes somatostatinerrgiques : *un système intrinsèque* constitué par les neurones du SL et *un système* constitué d'afférences provenant de l'aire périventriculaire hypothalamique et innervant principalement des neurones à épines somatiques. La disposition des fibres et des arrangements périsonomatiques dans le SL de cobaye nous laisse supposer qu'une telle organisation puisse également exister, mais des études complémentaires sont nécessaires pour la démontrer.

En ce qui concerne la répartition des récepteurs à somatostatine, Krantic et coll (1990) ont montré, chez le rat, que le SL contient les deux types de récepteurs, SS1 et SS2. Il semble donc qu'il existe une bonne corrélation entre la présence de fibres IR-SOM et les récepteurs correspondants.

La distribution des fibres à NT correspond à celle décrite chez le rat (Woodhams et coll, 1983 ; Köhler et Eriksson , 1984 ; Jakab et Leranthe, 1993). Cette innervation est un peu plus développée que l'innervation somatostatinerrgique, et comprend également des arrangements périsonomatiques, qui caractérisent le SLd antérieur.

Le SLml du cobaye comprend, comme chez le rat (Jakab et Leranthe, 1993), de nombreuses fibres ainsi que quelques arrangements périsonomatiques. Ces mêmes auteurs ont montré que, chez le rat, les terminaisons nerveuses IR-NT établissent des contacts symétriques avec certains neurones à épines somatiques.

Par des expériences de transport rétrograde couplé à une détection immunocytochimique, Jakab et Leranthe (1993) ont montré que les fibres IR-NT proviennent essentiellement de l'aire ventrale tegmentale, mais également de l'hypothalamus latéral, ce qui est en accord avec les travaux d'Hökfelt et coll (1984) et de Seroogy et coll (1987).

Enfin, il existe une bonne corrélation entre la répartition de l'IR-NT et celle des récepteurs à NT, qui sont observés en quantité variable dans les différentes régions du SL (Uhl, 1990).

La distribution des fibres IR-TH correspond à celle des fibres catécholaminergiques. La TH est une des enzymes impliquée dans la synthèse des catécholamines et elle est plus spécialement utilisée comme marqueur de la noradrénaline et de la dopamine. Nos observations concernant la distribution des fibres catécholaminergiques dans le SL concordent avec les études réalisées chez le rat. L'utilisation d'anticorps anti-TH (Gall and Moore, 1984), d'anticorps anti-dopamine (Onteniente et coll, 1984, 1987 ; Decavel et coll, 1987) ou de méthodes fluorescentes combinées avec la recapture de dopamine (Lindvall et Stenevi, 1978 ; Moore, 1978) donne des images semblables à celles obtenues ici chez le cobaye. De nombreux arrangements périsonomatiques sont observés sur l'ensemble du SL. Ces arrangements sont plus abondants dans le SL caudal que dans le SL rostral et sont localisés plus particulièrement dans le SLi et dans les parties très latérales du SL.

Dans le **SLml**, ces arrangements périsonomatiques sont observés autour de nombreux neurones. Notons également la disposition particulière des fibres dans la partie ventrale du **SLml** antérieur et du **SLv**. Ces fibres se disposent en arc et entourent les neurones du **SLv**. Ces données correspondent à ce qui est observé chez le rat (Gall and Moore, 1984 ; Jakab et Leranath, 1990b). Jakab et Leranath (1990b) ont décrit la présence de terminaisons IR-TH établissant des contacts synaptiques de type symétrique sur le corps cellulaire et les dendrites proximales de neurones à épines somatiques et des contacts de type symétrique et asymétrique avec des épines somatiques.

Comme nous l'avons déjà souligné, la caractéristique essentielle de cette innervation TH est l'abondance d'arrangements périsonomatiques (Verney et coll, 1987). Ces arrangements périsonomatiques ne sont pas observés lorsque des anticorps anti-dopamine- β -hydroxylase (enzyme synthétisant la noradrénaline) sont utilisés dans le SL (Gall et Moore, 1984). Cette constatation indique donc que l'innervation observée avec des anticorps anti-TH, tant chez le rat que chez le cobaye, correspond plus à l'innervation dopaminergique. Ces formations périneuronales n'apparaissent qu'à partir du 3ème jour après la naissance chez le rat (Verney et coll, 1987). De tels arrangements périsonomatiques IR-TH, bien qu'en nombre moins élevé, sont également observés dans le SL de l'Homme (Gaspar et coll, 1985).

L'innervation dopaminergique aurait pour origine les neurones de l'aire A10 localisés dans l'aire ventrale tegmentale (Hökfelt et coll, 1980). Les neurones dopaminergiques de cette région du mésencéphale sont également immunoréactifs pour la cholecystokinine, la substance P et la NT (Hökfelt et coll, 1980, 1984 ; Seroogy et coll, 1988 ; Seroogy et Fallon, 1989). Dans le

SLml du rat, une étude récente de Jakab et Leranath (1993) indique clairement la présence de NT dans des terminaisons à TH, terminaisons trouvées au contact de neurones à épines somatiques.

Les récepteurs dopaminergiques n'ont pas été mis en évidence dans le SL, malgré diverses études réalisées sur l'ensemble du cerveau (Wamsley et coll, 1989 ; Mansour et coll, 1992).

Les fibres IR-VP sont peu nombreuses dans le SL du cobaye. En comparant nos données avec celles de Dubois-Dauphin et coll (1989), qui ont étudié en détail l'innervation vasopressinergique chez le cobaye mâle et femelle, nous constatons une certaine dissemblance entre les deux études. Le fait que l'innervation vasopressinergique observée dans notre étude soit si faible peut provenir soit des propriétés de l'anticorps primaire utilisé, soit des conditions physiologiques de l'animal étudié. Il ne semble pas que notre anticorps puisse être remis en cause car nous avons observé, sans colchicine, un marquage abondant dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques. Il semblerait donc que les circonstances physiologiques dans lesquelles l'animal se trouvait au moment du sacrifice soient la cause de ce faible marquage. En effet, Merker et coll (1980) ont montré que l'innervation VP du SL est plus importante chez des animaux gestants que des animaux non gestants. Ces modifications de l'innervation en fonction de l'état physiologique de l'animal étudié nous laisse suggérer que de tels changements puissent intervenir au cours du cycle oestral.

Chez le rat, la VP n'est détectée que dans de fins prolongements axoniques (Buijs, 1978 ; Sofroniew et Weindl, 1978 ; De Vries et Buijs, 1983 ; De Vries et coll, 1981, 1985 ; Caffé et coll, 1987).

Dans le **SLml**, le marquage est très faible et est limité à des fibres variqueuses fines et à des ponctuations. Chez le rat, le marquage est plus important, surtout dans le **SLml** caudal, où des arrangements périsonomatiques sont observés (Jakab et coll, 1991a). Les terminaisons nerveuses vasopressinergiques, observées au microscope électronique, forment des synapses de type symétrique avec le corps cellulaire de certains neurones à épines somatiques (Jakab et coll, 1991a).

Contrairement à ce que l'on pensait, cette innervation vasopressinergique ne vient pas exclusivement des noyaux paraventriculaires et supraoptiques. Elle aurait pour origine le NLST (DeVries et Buijs, 1983) et l'amygdale médiane (Caffé et coll, 1987).

Une densité importante de récepteurs à la VP de type V1 ont été détectés chez le rat (Raggenbass et coll, 1987 ; Poulin et coll, 1988). Ces récepteurs sont particulièrement abondants dans le SLd.

La distribution des fibres IR-Enk dans le SL correspond à celles déjà décrites chez le cobaye (Tramu et coll, 1981 ; Beauvillain et coll, 1983 ; Stengaard-Pedersen et Larsson, 1983) et chez le rat (Wamsley et coll, 1980 ; Finley et coll, 1981 ; Gall et Moore, 1984 ; Onteniente et coll, 1989 ; Sakanaka et Magari, 1989). Les terminaisons nerveuses IR-Enk forment des arrangements périsonomatiques qui encapsulent totalement le neurone et dessinent son contour. La distribution des fibres IR-Enk est assez hétérogène sur l'ensemble du SL. Dans les plans antérieurs, les fibres dessinent le petit territoire de neurones localisés dans le SLd, dénommé noyau stigmoïde, puis forment un croissant qui recouvre les différentes régions du SL. De rares neurones sont observés, essentiellement dans le SLi.

Les neurones du **SLml** sont très richement innervés par les fibres IR-Enk. Les terminaisons constituant les arrangements périsonomatiques établissent des contacts synaptiques symétriques sur le corps cellulaire et les dendrites primaires des neurones du **SLml** de rat (Onteniente et coll, 1982 ; Verney et coll, 1987) et de cobaye (Beauvillain et coll, 1983, 1991).

Il est intéressant de noter que la disposition périsonomatique particulière des terminaisons nerveuses IR-Enk se développe après le 6ème jour chez le rat (Verney et coll, 1987) alors que chez le cobaye, elle est déjà visible dès le 24ème jour de gestation (V. Mitchell, communication personnelle).

L'origine hypothalamique des fibres IR-Enk trouvées dans le SL ne fait plus de doute chez le rat (Onteniente et coll, 1989 ; Sakanaka et Magari, 1989) et le cobaye, où il a été montré que le NMD était la seule source de toute l'innervation septale (Poulain et coll, 1984).

Les récepteurs $\mu 1$ et δ , récepteurs sur lesquels les enképhalines se lient spécifiquement, ont été détectés en faible proportion dans le SL du rat et du cobaye (Sharif et Hughes, 1989 ; Adler et coll, 1990, Gouardères et coll, 1993). Chez le rat, les récepteurs $\mu 1$ sont très peu détectables (une faible densité dans le SLv antérieur) ; les récepteurs δ sont observés dans le SLv antérieur et dans le **SLml**. Ces régions ne correspondent pas à la totalité de la surface innervée par les enképhalines.

2 - Implications fonctionnelles

Comme nous venons de le détailler, il n'existe pas de différences fondamentales entre la distribution des fibres à SOM, NT, TH, VP, Enk chez le rat et le cobaye. Cette constatation nous laisse supposer qu'il en est de même pour la nature des contacts établis par ces fibres ainsi que pour leur origine. L'analyse ultrastructurale des différentes terminaisons nous renseigne sur le type de contacts établis par ces fibres et les neurones du **SLml**. Il est intéressant de constater que chaque type de fibre établit préférentiellement des contacts synaptiques de type symétrique, localisés à la surface du corps cellulaire et de troncs dendritiques, avec des neurones possédant ou non des épines somatiques (Jakab et Leranath, 1990a, b, 1991 ; Jakab et coll, 1991a ; Beauvillain et coll, 1991). D'après Gray (1959) de telles synapses (synapses de type 2) sont des synapses inhibitrices.

La plupart du temps, il existe une bonne corrélation entre la distribution des fibres nerveuses IR-SOM, IR-NT et celles de leurs récepteurs respectifs. Par contre, cette corrélation est loin d'être parfaite pour les fibres IR-TH, IR-VP, IR-Enk, certaines régions sont riches en peptides et assez pauvres en récepteurs (IR-TH, IR-Enk) tandis que d'autres montrent la répartition inverse (IR-VP). Il est établi que les différences de répartition entre les fibres immunoréactives et les récepteurs, ou "mismatch", selon la formulation anglo-saxonne, proviendraient de problèmes techniques et qu'elles ne traduiraient pas obligatoirement une absence de fonctionnalité pour les systèmes mis en évidence. De fait, des études électrophysiologiques ont montré, *in vivo* ou *in vitro*, l'action des différentes substances répertoriées dans notre étude, sur l'activité électrique des neurones du SL.

La **SOM** est reconnue comme ayant un rôle inhibiteur sur l'activité neuronale en général (Epelbaum, 1982). La SOM provoque, sur des neurones du SLd enregistés en intracellulaire sur tranches, une hyperpolarisation et une diminution de la résistance membranaire en fonction de la concentration appliquée dans le milieu de perfusion (Twery et Gallagher, 1989). Cela aboutit à une inhibition de leur activité spontanée. Un autre effet de la SOM va au contraire dans le sens d'une modulation positive de l'activité des neurones car la SOM diminue la réponse hyperpolarisante produite par les agonistes des récepteurs GABA de types A et B (Twery et Gallagher, 1990). Dans le **SLml**, aucune étude de ce type n'a mis en évidence le rôle de la SOM sur l'activité électrique des neurones, mais nous pourrions supposer que les effets de la SOM soient les mêmes que ceux obtenus dans le SLd.

Il n'existe pas de données sur l'action de la NT dans le SL.

L'action de la TH et plus particulièrement de la dopamine sur les neurones des différentes régions du SL est bien documentée. Assaf et Miller (1977), par des études réalisées in vivo chez le rat, ont montré que les neurones du SL reçoivent une influence monosynaptique excitatrice en provenance de l'aire A10 de l'aire ventrale tegmentale. Des données contraires ont été amenées par des expériences électrophysiologiques réalisées in vivo, chez le rat, par Joels et Urban (1985). Ces auteurs reportent que l'application iontophorétique de dopamine induit une diminution de l'activité spontanée de 70% des neurones du SL spontanément actifs. Ces neurones étudiés sont principalement localisés dans le SLi et le SLv, donc dans une grande partie du **SLml**. L'action de la dopamine sur les neurones du SL apparaît donc complexe. Les données neuroanatomiques récentes de Jakab et Leranath (1993) montrent à l'échelle ultrastructurale la présence de NT, mais aussi de SOM, dans des terminaisons dopaminergiques, ce qui permet de mieux comprendre l'action complexe de la dopamine. Les afférences dopamine/NT et dopamine/SOM pourraient avoir deux actions opposées, les afférences dopamine/NT provenant du mésencéphale auraient une action excitatrice, alors que les afférences dopamine/SOM provenant de l'aire périventriculaire hypothalamique auraient une action inhibitrice.

En ce qui concerne la VP, des études électrophysiologiques, menées chez le rat in vivo, ont montré que les applications iontophorétiques de VP avaient un effet inhibiteur (Huwlyer et Felix, 1980 ; Marchand et Hagino, 1982). Le fait que dans ce type d'étude la concentration précise de VP éjectée ne soit pas connue est important, si l'on considère que la réponse des neurones du SL dépend de la concentration (Raggenbass et coll, 1988 ; Van den Hoof et coll, 1990a ; Van den Hoof et Urban, 1990). Raggenbass et coll (1988) ont montré que 44% des neurones du SL enregistrés en intracellulaire sur tranche sont excités par l'application d'une faible concentration de VP. Par contre, l'application de concentrations plus élevées de VP provoque une excitation initiale suivie d'une diminution, voire même d'un arrêt de la décharge du neurone enregistré. Un effet inhibiteur de la VP est cependant observé pour 8% des neurones du SL testés (Ragenbass et coll, 1987, 1988). Ces auteurs ont également montré, par des études pharmacologiques, que cette action de la VP s'exerçait via des récepteurs V1. Joëls et Urban (1982), par des enregistrements extracellulaires, réalisés dans le SL de rat in vivo, indiquent que la VP contribue à augmenter l'effet excitateur du glutamate. La VP a aussi la propriété de réduire l'inhibition induite par les catécholamines dans une

sous-population de neurones du SL dont certains appartiennent au **SLml** (Joels et Urban, 1985). Il semblerait donc que les effets de la VP sur les neurones du SL soient complexes et impliquent à la fois des excitations et des inhibitions. De plus, Van den Hoof et coll (1989b) ont montré que la VP a un rôle important dans la mise en place du phénomène de potentialisation à long terme dans le SLd.

Les mécanismes d'action des enképhalines dans le SL sont encore très mal connus. Des études réalisées *in vivo* sur le SL de cobaye ont montré que les enképhalines avaient une action inhibitrice (Carette et Poulain, 1982), alors qu'elles provoquent chez le rat aussi bien une inhibition qu'une excitation (Nayar et coll, 1987).

Ces résultats montrent que les substances présentes dans les fibres et les terminaisons axonales du SL exercent des effets variés, mais qu'ils sont en majorité inhibiteurs. Cela peut être relié au fait que les contacts établis par les terminaisons contenant les substances sont préférentiellement de type symétrique, donc de nature inhibitrice. Il peut être supposé que l'ensemble de ces afférences exerce un contrôle surtout inhibiteur sur les neurones du **SLml**, qui pourrait s'opposer à l'influence excitatrice transmise par les fibres originaires de l'hippocampe.

II - Neurones à GABA

La détection des neurones synthétisant le GABA dans le SL a fait l'objet de nombreuses études chez le rat, à l'aide d'anticorps dirigés contre la L glutamic acid decarboxylase (GAD ; Köhler et Chan-Palay, 1983 ; Panula et coll, 1984 ; Mugnaini et Oertel, 1985 ; Leranthe et Frotscher, 1989 ; Jakab et Leranthe, 1990b), ou avec des anticorps dirigés contre le GABA chez le rat (Mugnaini et Oertel, 1985 ; Onteniente, 1986, 1987) et chez le cobaye (Beauvillain et coll, 1991). Nos résultats sont en accord avec ces diverses descriptions ; les neurones GABAergiques ont une distribution hétérogène au sein du SL. Les neurones sont essentiellement regroupés dans le SLd et le SLv. Leur répartition est plus éparse dans le SLi. Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de regroupement particulier dans le **SLml**, où nous n'observons que quelques neurones de taille moyenne. Il a déjà été signalé que, pour Jakab et Leranthe (1990b), la plupart des neurones à épines somatiques sont immunoréactifs pour la GAD. Chez le cobaye, Beauvillain et coll (1991) ont

montré qu'une très forte proportion de neurones GABAergiques étaient la cible du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal.

III - Neurones contenant la parvalbumine, la calbindin-D28K, et la NADPH-diaphorase, innervation enképhalinergique

La distribution des neurones IR-PV a été décrite dans le septum du rat par Alonso et coll (1990). Ces auteurs indiquent que les neurones IR-PV sont rares dans le SL. Ils sont détectés essentiellement dans le SLd et dans une partie du SLv. Chez le cobaye, nous avons observé une distribution similaire. Les neurones IR-PV ne représentent donc pas un échantillon représentatif des neurones du SL, tant chez le rat que chez le cobaye.

L'étude de la distribution des neurones IR-PV dans le septum est intéressante, car la PV représente un marqueur fiable des neurones GABAergiques dans de nombreuses régions du cerveau (Celio, 1986 ; Katsumaru et coll, 1988 ; Kosaka et coll, 1987 ; Freund, 1989 ; Antal et coll, 1991 ; Kawaguchi et Kubota, 1993). Il apparaît que dans le SL, l'infime proportion de neurones IR-PV ne peut en aucun cas caractériser les nombreux neurones GABAergiques répartis en abondance sur l'ensemble du SL, tout au moins pourraient ils en caractériser une faible sous-population. Il faut signaler la coexistence de la PV et de GABA dans les neurones du complexe SM/bdB où la PV caractérise les neurones GABAergiques qui sont impliqués dans la relation septo-hippocampique chez le rat (Freund, 1989; Leranth et coll, 1992). Cette différence de répartition entre le SL et le complexe SM/bdB suggère que des neurones GABAergiques fonctionnellement différents se distinguent par leur contenu en PV.

Chez le rat, les neurones IR-CaBP sont particulièrement nombreux dans le SL (Garcia-Segura et coll, 1984 ; Freund, 1989 ; Celio, 1990 ; Jabab et coll, 1991b ; Kiss et Patel, 1991). Notre étude montre qu'il en est de même chez le cobaye. La répartition interspécifique de la CaBP est quelque peu différente dans certaines régions du SL, en particulier dans le noyau stigmaté, ainsi que dans les plans postérieurs où les neurones IR-CaBP forment chez le cobaye une bande longeant le noyau septo-fimbrial. De tels arrangements n'ont pas été décrits chez le rat. Les neurones à épines somatiques du SLml du rat sont pour un grand nombre d'entre eux IR-CaBP, comme l'a indiqué Jakab et coll (1991b).

Une coexistence entre la CaBP et le GABA a été montrée dans certaines populations spécifiques de neurones GABAergiques localisées dans d'autres régions du cerveau (Antal et coll, 1991; Gulyas et coll, 1991 ; Freund et Gulyas, 1991 ; Toth et Freund, 1992 ; Rogers, 1992 ; Kawaguchi et Kubota, 1993). Lorsque l'on compare la distribution des neurones IR-CaBP et celle des neurones IR-GABA, une telle coexistence, si elle existe, ne devrait concerner que les neurones situés dans la partie ventrale du SL. Il apparaît donc, que dans le SL, la CaBP n'est pas un marqueur des neurones GABAergiques d'une manière générale.

La détection simultanée des neurones IR-CaBP et des fibres IR-Enk indique que ces deux immunoréactivités sont distribuées dans des territoires relativement distincts du SL, malgré un recoupement dans des aires déterminées, tels le noyau stigmoïde la partie centrale du **SLml**.

Les études menées chez le rat par Bredt et coll (1991) et Geula et coll (1993) ne montrent aucun marquage ND+ dans le SL. Ceci serait le signe d'une différence d'espèce, étant donné le nombre important de neurones ND+ présents chez le cobaye, tel que cette étude le montre. Il est également surprenant de constater dans le SL la présence de nombreuses fibres ND+. Cette particularité est également observée dans le cervelet, au niveau des fibres grimpantes qui s'arborescent le long des dendrites des cellules de Purkinje (Southam et Garthwaite, 1991).

La distribution des neurones ND+ se superpose en de nombreuses régions du SL à celle des neurones IR-CaBP. La colocalisation de ces deux substances est observée dans de nombreuses régions du SL, tels que le noyau stigmoïde et le **SLml**. Cette coexistence entre la CaBP et la ND a également été décrite dans l'hypothalamus et particulièrement dans les noyaux paraventriculaires et supraoptiques et dans les noyaux magnocellulaires accessoires (Alonso et coll, 1992) et dans le striatum (Geula et coll, 1993). La signification fonctionnelle de ce type de coexistence reste inconnue.

Les régions du SL innervées par les fibres enképhalinergiques du tractus hypothalamo-septal contiennent des neurones IR-CaBP, des neurones ND+ et des neurones colocalisant les deux substances. Dans le noyau stigmoïde et dans la partie centrale du **SLml**, tout particulièrement, nous démontrons que ces fibres contactent des neurones IR-CaBP, des neurones ND+, et plus occasionnellement des neurones colocalisant les deux substances.

Chapitre II

**ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE
ET MORPHOLOGIQUE DES
NEURONES DU SEPTUM LATERAL
MEDIO-LATERAL**

Introduction

Jusqu'alors, les études électrophysiologiques réalisées dans le SL se sont plutôt intéressées au SLd. Cette région a fait l'objet de nombreuses investigations, notamment chez le rat, en raison de son implication évidente dans le circuit de rétroaction septo-hippocampo-septal. Dans cette espèce, les propriétés intrinsèques de base des neurones ont été décrites (Stevens et coll., 1984), puis les mécanismes d'excitation et d'inhibition post-synaptiques (Joëls et Urban, 1984a, b ; Stevens et Cotman, 1986 ; Raggenbass et coll, 1988 ; Gallagher et Hasuo, 1989a, b ; Van den Hoof et coll, 1989a ; Van den Hoof et Urban, 1990 ; Zheng et Gallagher, 1991) et de potentialisation à long terme (Stevens et Cotman, 1991 ; Zheng et Gallagher, 1992) ont été documentés. Enfin, les mécanismes d'action de divers neurotransmetteurs et neurohormones ont été détaillés pour les mêmes neurones (Gallagher et coll, 1984 ; Stevens et coll, 1985 ; Joëls et coll, 1987a,b ; Nayar et coll, 1987 ; Stevens et coll, 1987 ; Joëls et Gallagher, 1988 ; Twery et Gallagher, 1989, 1990 ; Van den Hoof et coll, 1989a, 1990a, b ; Hasuo et Gallagher, 1988 ; Hasuo et coll, 1990). Récemment, une population neuronale du SLd, caractérisée par des décharges rythmiques en bouffées, qui pourraient avoir des implications indirectes dans la genèse du rythme thêta, a été individualisée (Twery et coll, 1992). La plupart de ces études ont été menées sur des préparations de tranches de cerveau maintenues en survie

Chez le cobaye, les études concernant les caractéristiques électrophysiologiques des neurones du SL sont peu nombreuses. Leurs propriétés membranaires ont été décrites dans des études réalisées *in vitro* sur des tranches de cerveau (Lopez-Barneo et coll, 1985 ; Alvarez de Toledo et Lopez-Barneo, 1988) ou sur des cultures de neurones du SL (Castellano et Lopez-Barneo, 1991).

Il n'existe donc que peu de données concernant les propriétés électriques des neurones localisés dans le SLi et le SLv et plus particulièrement dans le SLml.

Pour cela, dans **une première partie**, nous avons décrit les propriétés intrinsèques des neurones du SLml, par des enregistrements en intracellulaire réalisés de manière conventionnelle en courant-imposé, sur des tranches de cerveau

La réalisation d'injections intracellulaires de marqueurs tels que la peroxydase, le LY, ou la biocytine, a favorisé une approche nouvelle pour l'étude des caractéristiques morphologiques des cellules nerveuses. D'une part, ce procédé procure des renseignements remarquables sur la morphologie des cellules nerveuses étudiées individuellement, qui s'ajoutent à ceux recueillis par les méthodes histologiques classiques. D'autre part, il permet de combiner l'analyse morphologique, aussi bien à l'échelle du microscope optique qu'à celle du microscope électronique, à l'analyse électrophysiologique, ce qui apporte des éléments de premier ordre pour la caractérisation fonctionnelle des neurones individuels. Il est ainsi possible de s'interroger sur la corrélation entre certaines particularités morphologiques et certaines propriétés fonctionnelles des neurones.

Les études concernant la morphologie des neurones du SL sont assez rares. Il faut surtout citer les travaux d'Alonso et Frotscher (1989a, b) consacrés, chez le rat, à la description des différents types cellulaires présents dans le SL, par des techniques d'imprégnation argentique. Bien que cette étude ait décrit pour la première fois la morphologie des neurones du SL, elle comporte de nombreuses limitations liées à la technique utilisée. Il n'existait pas d'études qui permettaient d'associer les propriétés électriques des neurones du **SLml** à leur morphologie.

Dans la **deuxième partie** de notre étude, l'analyse électrophysiologique des neurones du **SLml** a été couplée à celle de leur analyse morphologique par la technique d'injection intracellulaire de marqueurs. Nous avons cherché à déterminer si à un type électrophysiologique correspondait un type cellulaire caractérisé par sa morphologie. Pour cela, des injections intracellulaires de marqueurs (peroxydase, LY, biocytine) ont été réalisées après identification des propriétés électriques des neurones. Les neurones injectés ont été observés au microscope optique et au microscope électronique.

Enfin, la **troisième partie** de ce chapitre concerne la caractérisation par immunocytochimie des neurones du **SLml** après leur identification électrophysiologique et morphologique. Le but recherché était de savoir si ces neurones étaient la cible du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal et s'ils étaient IR-CaBP.

Résultats

I. Caractéristiques électrophysiologiques des neurones du septum latéral médio-latéral

1 - Généralités

Les données électrophysiologiques proviennent d'enregistrements réalisés en courant-imposé sur 174 neurones du SLml. Le critère de sélection de ces neurones est l'observation d'un potentiel de repos de valeur inférieure ou égale à -50 mV, restant stable pendant une période relativement longue pour réaliser l'ensemble des protocoles de stimulation et l'application d'agents pharmacologiques (30 min à 2 h).

Une première catégorie de neurones regroupant deux types cellulaires (79,9% du total, n=139), nommés classe A et classe B, se caractérise par l'apparition de potentiels d'action (PA) sodiques de forte amplitude, en réponse à une impulsion rectangulaire de courant dépolarisant de faible intensité appliquée par la microélectrode. La deuxième catégorie de neurones appelée classe C (20,1% du total, n=35) se distingue de la précédente par l'apparition de PA sodiques de faible amplitude dans les mêmes conditions de stimulation.

2 - Neurones de classe A et de classe B

2.1) Propriétés communes aux deux classes

Les neurones de ces deux classes ne présentent pas de différences évidentes quant à leurs propriétés membranaires passives. Le potentiel de repos de ces neurones a une valeur moyenne de -61 ± 7 mV (moyenne $\pm \sigma$, n=30). La résistance membranaire apparente est mesurée au potentiel de repos en appliquant des impulsions calibrées de courant par la microélectrode d'enregistrement. Sa valeur moyenne est de $78,9 \pm 22$ M Ω (moyenne $\pm \sigma$, n=30). Cinq neurones ont une activité spontanée au potentiel de repos, qui se caractérise par la décharge de PA rapides ayant une valeur supérieure à celle du potentiel de repos, et apparaissant de manière aléatoire.

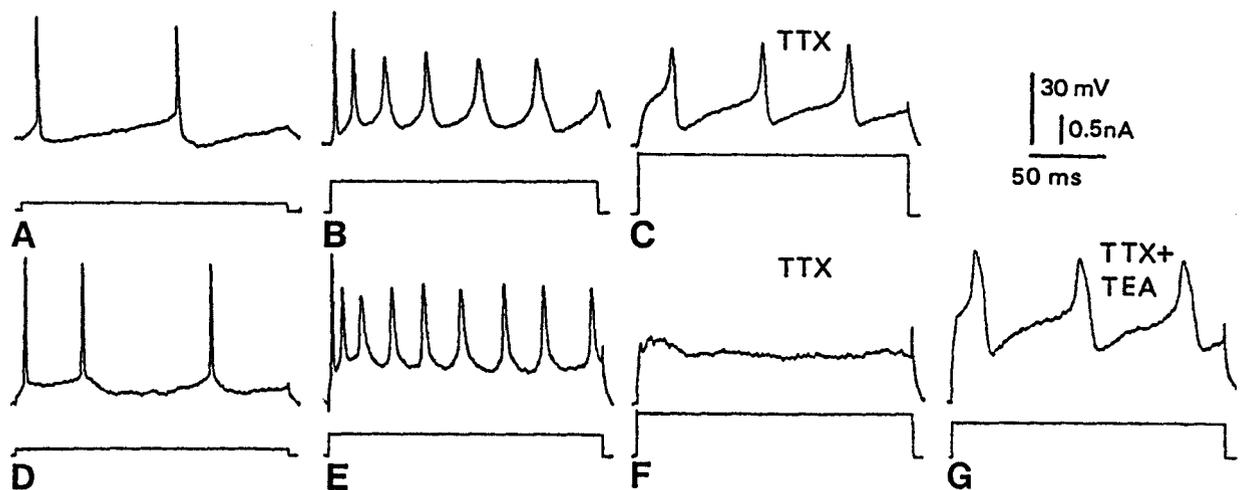


Figure 23 : Critères de différenciation des classes A et B des neurones du SLml. A-C. Pour le neurone de classe A, l'amplitude des potentiels d'action est réduite et leur durée est augmentée en réponse à une impulsion de courant dépolarisant de forte intensité (B), par rapport à une impulsion d'intensité liminaire (A). Les potentiels d'action subsistent en présence de TTX (potentiel de repos -58mV). D-G. Les mêmes réponses sont obtenues sur ce neurone de classe B, mais les potentiels d'action sont totalement supprimés sous TTX (F) et ne sont évoqués que lorsque le TEA est ajouté au milieu de perfusion (G), potentiel de repos $= -66\text{mV}$.

2.2) Différences entre les deux classes

Les classes A et B se distinguent par le type de réponse obtenu au cours de la stimulation directe par l'application de chocs dépolarisants de forte intensité alors que la TTX est présente dans le milieu de perfusion (figure 23). La TTX (10^{-6}M) a la propriété de supprimer les conductances sodiques et donc d'éliminer les PA sodiques.

Après l'application de TTX, les neurones de classe A ($n=103$) présentent encore des PA haut-seuil caractérisés par une faible amplitude et une durée supérieure à celle des PA sodiques enregistrés dans les conditions normales (figure 23C). Ces PA ont des vitesses de dépolarisation et de repolarisation lentes (tableau 5). La nature calcique des PA insensibles au TTX est démontré par l'application de Co^{++} , qui supprime toute réponse (non illustré).

Les neurones de classe B ($n=36$), après l'application de TTX, n'expriment plus aucune réponse même lorsque sont appliqués des chocs dépolarisants de très forte intensité (figure 23F). Des PA haut-seuil de longue durée, semblables à ceux enregistrés sous TTX pour les neurones de classe A, n'apparaissent que si le TEA (10mM) est ajouté au TTX dans le milieu de perfusion (figure 23G). Ces PA sont également éliminés sous Co^{++} , ce qui indique leur nature calcique (non illustré).

Tableau 5 : Caractéristiques (moyenne $\pm\sigma$) des PA évoqués par des impulsions de courant dépolarisant pour les 3 classes de neurones.

	Classe A (n=30)		Classe B (n=16)	Classe C (n=26)	
	1er PA	PA calcique	1er PA	1er PA	PA calcique
Amplitude seuil-sommet (mV)	62,2 \pm 6,5	20,7 \pm 2,2	66,6 \pm 4,1	17,5 \pm 4,5	31,1 \pm 7
largeur au seuil (ms)	2,8 \pm 0,3	6,6 \pm 1,2	2 \pm 0,4	5,1 \pm 2,5	18,8 \pm 6,2
vitesse de dépolarisation (mV/ms)	146,7 \pm 33,8	8 \pm 1,9	171,5 \pm 13,9	*	9,4 \pm 2,3
vitesse de repolarisation (mV/ms)	-41,1 \pm 11,3	-8,7 \pm 2,4	-88,1 \pm 19,2	*	-6,9 \pm 1,7

"1er PA" correspond aux PA produits par une stimulation liminaire. "PA calcique" correspond au PA de grande amplitude, insensible au TTX, observé en milieu normal.

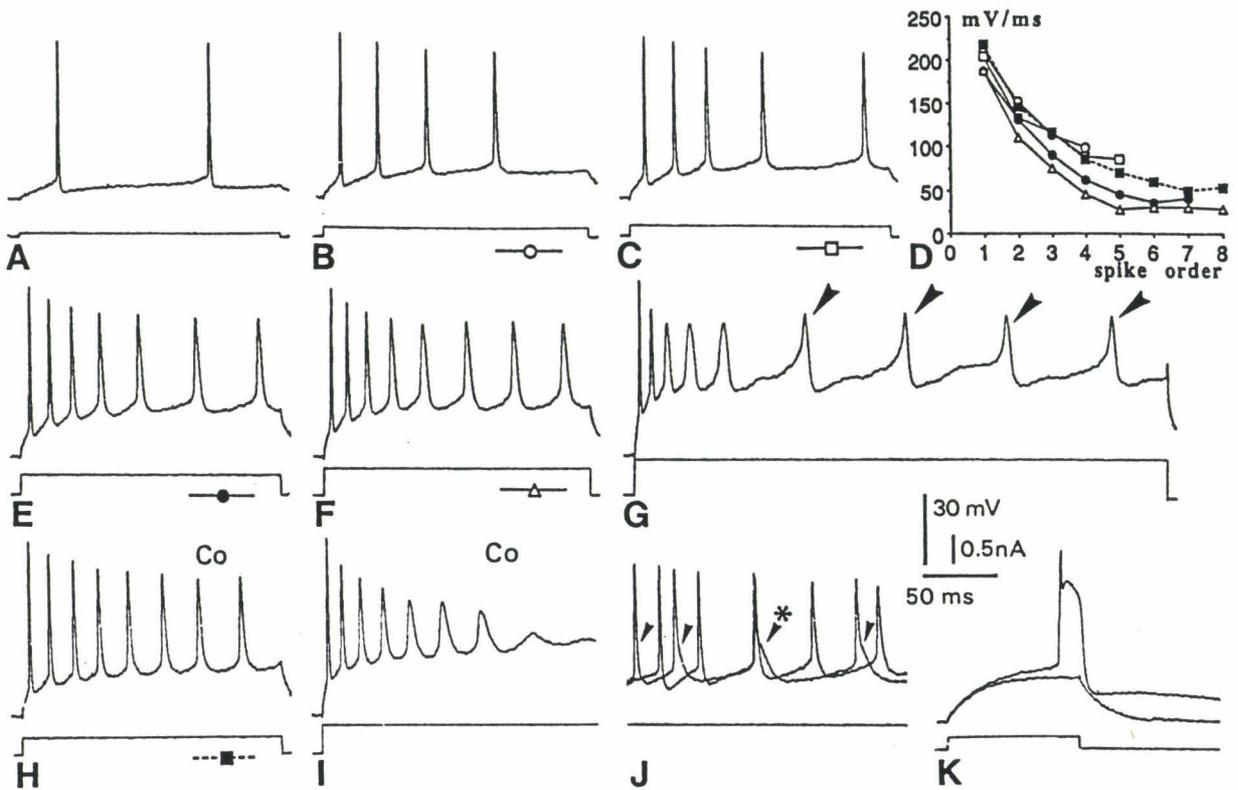


Figure 24 : Exemples de décharges de 3 neurones de classe A. **A-I.** Réponses d'un même neurone (potentiel de repos - 66 mV) à des impulsions de courant dépolarisant d'intensité croissante (**A-C**, **E-G**). Notez la réduction d'amplitude et l'augmentation de la durée des potentiels d'action par les fortes intensités de stimulation, ainsi que l'apparition de potentiels d'action purement calciques (pointes de flèches en **G**). **E-H** et **F-I** représentent la réponse du neurone à des stimulations d'intensité semblable, en milieu normal et en milieu contenant du Co^{++} . En **F-I**, la participation des conductances calciques à la genèse des potentiels d'action est évidente. Le graphique **D** indique l'évolution du temps de montée des potentiels d'action successifs en fonction de l'intensité des impulsions en milieu contrôle et en présence de Co^{++} . Les valeurs sont mesurées pour chaque potentiel d'action des 5 décharges représentées par les différents symboles. Pour un autre neurone (potentiel de repos - 65 mV) des épaulements apparaissent sur la phase de repolarisation des potentiels d'action, déclenchés par une dépolarisation continue. Deux traces sont superposées, les réponses obtenues en milieu contrôle sont indiquées par des pointes de flèches. Les épaulements sont supprimés sous Co^{++} (astérisque). (**K**) Pour un autre neurone (potentiel de repos - 55 mV), un potentiel dépolarisant retardé de longue durée apparaît dans la phase de repolarisation du potentiel d'action, suite à une impulsion de courant dépolarisant modérée.

2.3) Décharges répétitives des neurones de classe A

2.3.1) Observations en milieu normal

La stimulation directe des neurones de classe A par une impulsion de courant dépolarisant d'intensité liminaire entraîne l'apparition d'un ou de deux PA rapides d'amplitude supérieure à celle du potentiel de repos (figure 23A, 24A). Lorsque les neurones sont stimulés par des impulsions de courant dépolarisant d'intensité croissante, les PA voient leur forme et leur amplitude se modifier progressivement. Ce phénomène, visible sur la figure 23B, est également bien illustré sur la figure 24A-I. Lorsque l'intensité de l'impulsion dépolarisante augmente, le nombre de PA évoqués augmente en conséquence. Cependant, alors que le premier PA conserve sa pleine amplitude et présente une durée brève, les PA qui lui succèdent perdent progressivement en amplitude, avant d'atteindre une amplitude qui restera constante pour tous les PA de la décharge. Parallèlement, les PA deviennent plus larges. Si une impulsion dépolarisante d'amplitude forte et de longue durée est appliquée (figure 24G), les PA plus petits et plus larges sont eux-mêmes suivis de PA dont la vitesse de dépolarisation, très lente, les rend comparables aux PA obtenus sous TTX (comparer les figures 24G et 23C). Ces PA sont supprimés par le Co^{++} (non illustré), ce qui confirme leur nature purement calcique.

Au cours de leur décharge répétitive, les PA montrent une vitesse de dépolarisation qui évolue dans le sens d'une diminution. Les mesures de ce paramètre, présentées sous forme de graphique dans la figure 24D, montrent que la diminution de la vitesse de dépolarisation des PA successifs s'effectue en rapport avec l'intensité de l'impulsion dépolarisante et avec la position du PA dans la décharge.

2.3.2) Observations en milieu cobalt

L'intervention des conductances calciques dans la genèse des PA des neurones de classe A a été étudiée au cours de leur stimulation directe par l'application d'impulsions de courant dépolarisant, en remplaçant les ions Ca^{++} du milieu de perfusion par une concentration identique d'ions Co^{++} . Une expérience représentative est illustrée par la figure 24, qui montre la réponse d'un même neurone en milieu normal (figure 24E, F) et en milieu Co^{++} (figure 24H, I). Le temps d'application du Co^{++} est ici suffisamment long pour pouvoir conclure que les PA qui subsistent (figure 24H, I) sont de nature sodique.

La première observation, réalisée au cours de l'application d'une impulsion d'amplitude modérée en milieu Co^{++} , montre que le nombre de PA a augmenté (comparer les figures 24E et 24H). Ce phénomène est directement interprétable par une réduction de la durée du potentiel tardif hyperpolarisant (AHP) succédant au PA, qui comporterait une composante calcique. Il s'agit vraisemblablement d'un AHP potassique dépendant du Ca^{++} (Blatz et Magleby, 1987).

La seconde observation, réalisée au cours de l'application d'une impulsion de plus forte amplitude, montre que les PA de nature sodique qui subsistent après une application prolongée de Co^{++} subissent une réduction drastique de leur amplitude, qui conduit à leur suppression totale (figure 24I). Cette observation a deux conséquences :

- premièrement, elle montre que les ions Ca^{++} sont une composante essentielle des PA (en milieu normal) lors de l'application d'une impulsion de forte amplitude ;

- deuxièmement, elle montre que dans les mêmes conditions, le composant sodique des mêmes PA subit une inactivation qui tend à limiter le taux de décharge en réponse à une forte dépolarisation. Le terme inactivation est employé ici en référence à Castellano et coll (1991), qui l'ont utilisé pour expliquer le phénomène, déjà observé dans le SLd du cobaye (Lopez-Barneo et coll, 1985 ; Alvarez de Toledo et Lopez Barneo, 1988). Par des mesures en voltage-imposé sur des neurones dissociés du SL de cobaye, Castellano et coll (1991) ont en effet montré que l'inactivation de la conductance sodique présentait une composante qui nécessitait un temps extrêmement long pour se dé-inactiver (c'est à dire au canal sodique pour passer de l'état inactivé non disponible à l'état fermé disponible), lorsque la membrane était dépolarisée (voir leur figure 6). D'après ces auteurs, lors de la genèse d'un train de PA, l'amplitude et la fréquence de ces derniers sont réduites car le nombre de canaux sodiques disponibles est fortement diminué.

Qu'un influx de Ca^{++} intervienne pendant la phase de dépolarisation du PA est démontré par la mesure de la vitesse de dépolarisation des PA en milieu normal et en milieu Co^{++} (figure 24D). Sous Co^{++} , les PA (sodiques) qui se succèdent en réponse à une impulsion dépolarisante présentent un temps de montée qui diminue progressivement, fait qui ne peut être attribué qu'au seul phénomène d'inactivation sodique. En milieu contrôle, la diminution du temps de montée du PA est plus accentuée que celle observée en milieu Co^{++} . La vitesse de dépolarisation plus lente des PA en milieu normal montre bien qu'une conductance calcique intervient dans la genèse des PA.

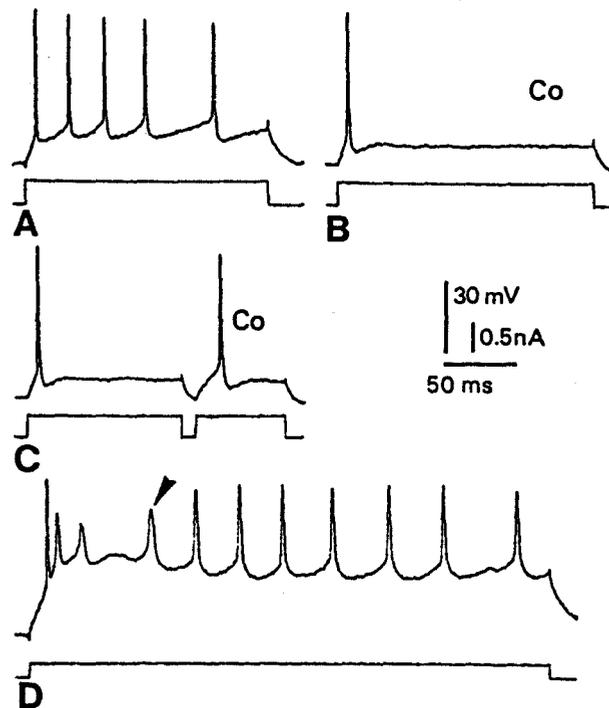


Figure 25 : Exemples de décharge de 2 neurones de classe A. **A.** Au potentiel de repos (- 63 mV), décharge tonique en milieu contrôlé. **B.** En présence de Co^{++} , un seul potentiel d'action apparaît suite à l'application d'impulsions de courant dépolarisant de même intensité. **C.** Dans les mêmes conditions qu'en B, l'application d'une impulsion de courant hyperpolarisant de faible intensité est efficace pour déclencher l'apparition d'un potentiel d'action. **D.** Dans une autre cellule (potentiel de repos - 55 mV), lorsqu'une impulsion de courant de longue durée est appliquée, une atténuation rapide des potentiels d'action est observée alors qu'un potentiel d'action calcique est déclenché (caractérisé par son temps de montée de 11 mV/ms, pointe de flèche). Ce potentiel d'action est suivi d'un post-potentiel hyperpolarisant d'amplitude suffisante pour engendrer une décharge de potentiels d'action, caractérisés par un temps de montée plus rapide (26 à 36 mV/ms).

D'autres exemples suggèrent également une forte participation du Ca^{++} au cours de la phase de repolarisation des PA (figure 24J-K). Dans un premier exemple (figure 24J), des PA successifs, déclenchés par une dépolarisation continue, deviennent progressivement plus larges, alors qu'un épaulement apparaît sur leur phase de repolarisation. L'application de Co^{++} supprime l'épaulement, ce qui indique la participation d'ions Ca^{++} dans la phase de repolarisation du PA. Dans un second exemple (figure 24K), suite à une impulsion dépolarisante modérée, la participation des ions Ca^{++} dans la phase de repolarisation du PA est rendue évidente par la présence d'un potentiel dépolarisant retardé de longue durée.

En conclusion, pour les neurones de classe A stimulés par à une impulsion dépolarisante de forte amplitude, la décharge répétitive des PA n'est possible que grâce à l'intervention de courants calciques entrants, qui viennent compenser un phénomène d'inactivation des conductances sodiques qui mènerait, sans cette intervention, à une impossibilité pour ces neurones de décharger de manière tonique.

2.4) Intervention de l'AHP dans les décharges répétitives des neurones de classe A

Pour un petit nombre de neurones ($n=6$), alors qu'une décharge tonique est observée dans des conditions normales en réponse à l'application d'une impulsion dépolarisante (figure 25A), un seul PA subsiste lorsque le Co^{++} est appliqué dans le milieu de perfusion (figure 25B). Si l'on produit une brève impulsion hyperpolarisante au cours de l'impulsion dépolarisante, un PA est observé en rebond à la fin de l'impulsion hyperpolarisante (figure 25C). Cela suggère, qu'en condition normale, l'AHP succédant au PA a une amplitude suffisante pour permettre aux conductances sodiques d'être dé-inactivées et, en conséquence, de déclencher un nouveau PA. Au contraire, sous Co^{++} , l'AHP est fortement réduit - ce qui a été montré plus haut - et le processus de dé-inactivation ne peut se produire. Comme ce phénomène n'est observé que pour un petit nombre de neurones, il est probable que ceux-ci présentent une inactivation sodique particulièrement importante.

Il a été montré précédemment (figure 24G) que des PA purement calciques apparaissent au cours de l'application d'une impulsion dépolarisante prolongée de forte intensité. Dans un exemple comparable (figure 25D), l'apparition du PA purement calcique permet aussitôt de déclencher une décharge tonique de PA rapides. Il faut supposer que le PA calcique déclenche

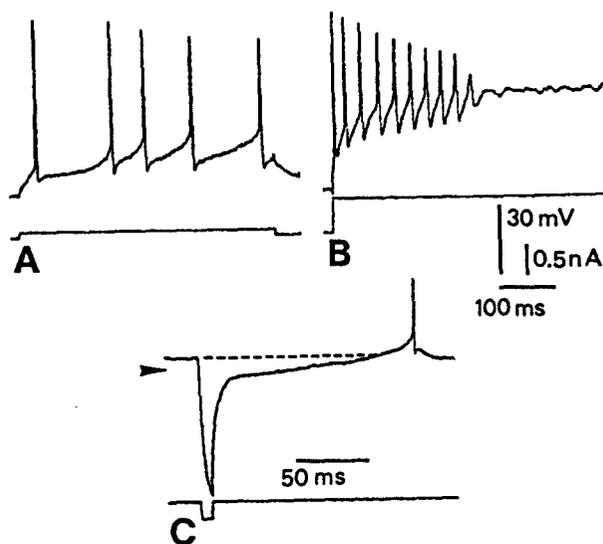


Figure 26 : Propriétés électriques de 2 neurones de classe B (potentiel de repos -72 mV). A. Décharge tonique obtenue lors de l'application d'impulsions de courant dépolarisant d'intensité modérée. B. Une impulsion de courant d'intensité plus importante produit une diminution de l'amplitude des potentiels d'action jusqu'à disparition de la décharge. C. Une rectification transitoire sortante est obtenue lorsqu'une brève impulsion de courant hyperpolarisant est appliquée au potentiel de repos (-57 mV, pointe de flèche) de cet autre neurone.

un AHP d'amplitude suffisante pour dé-inactiver les conductances sodiques. Ces observations indiquent que le processus d'inactivation, qui tend à limiter la décharge tonique des neurones de classe A, est voltage-dépendant. L'hyperpolarisation membranaire produite, soit par une impulsion hyperpolarisante, soit par l'AHP, conduit à raccourcir la période pendant laquelle les conductances sodiques sont sous un état non disponible.

2.5) Décharges répétitives des neurones de classe B

Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions que pour les neurones de classe A.

Pour 16 neurones, dont un exemple typique est illustré par la figure 23D-G, en réponse à une impulsion de courant dépolarisant d'intensité liminaire, une décharge régulière de PA est observée. L'augmentation de l'intensité de l'impulsion produit des décharges semblables à celles observées pour les neurones de classe A. Un premier PA rapide et de courte durée est suivi par un train de PA plus lents et de durée plus longue. La décharge est empêchée par l'inactivation sodique et il s'avère que le Ca^{++} participe à la genèse de ces PA en raison, d'une part, de leur faible vitesse de dépolarisation (figure 23E) et d'autre part, de leur évolution sous Co^{++} (non illustré). Cependant, la différence essentielle par rapport à la classe A est qu'aucun PA purement calcique n'apparaît sous TTX (figure 23F), ni dans des conditions normales lorsqu'une impulsion dépolarisante prolongée de forte intensité est appliquée (non illustré).

Pour 20 autres neurones (figure 26A-C), les neurones présentent des PA sodiques dont l'amplitude diminue progressivement. La configuration de décharge obtenue (figure 26B) peut être expliquée par l'existence d'une inactivation sodique non accompagnée d'une participation de courants calciques dans la genèse des PA.

2.6) Rectification entrante (anormale)

La plupart des neurones de classe A et B montrent, en réponse à l'application d'impulsions de courant hyperpolarisant, une hyperpolarisation de la membrane qui décroît bien que l'échelon de courant soit maintenu constant. La dépression de la réponse électrotonique s'accompagne d'un rebond dépolarisant à la cessation de l'impulsion (figure 27 A, B). Ces phénomènes traduisent l'existence d'une rectification anormale dite "dépendante du temps",

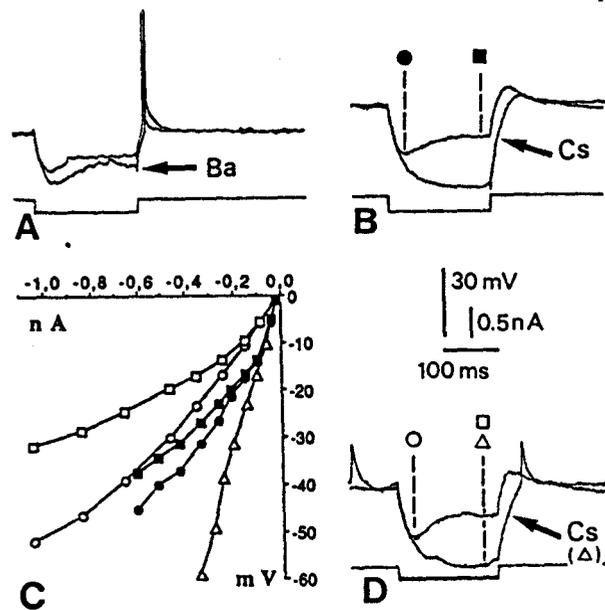


Figure 27 : Démonstration de la rectification anormale pour 2 neurones de classe A (A, potentiel de repos - 54mV ; B, potentiel de repos - 61mV) et pour un neurone de classe C (D, potentiel de repos -67mV). A, B, D. Les réponses électrotoniques obtenues suite à l'application d'impulsions de courant hyperpolarisant montrent, au bout d'un certain temps, une forte réduction qui s'accompagne d'un rebond dépolarisant dès la cessation de l'impulsion. Ces phénomènes sont insensibles à l'application de Ba⁺⁺ (A), mais la réponse électrotonique est rétablie lors de l'application de Cs⁺ (B, D). C. Courbes courant-voltage obtenues à partir des enregistrements B et D. Les mesures sont effectuées au début, puis pendant la période stable de la réponse électrotonique de la membrane. Les courbes réalisées montrent l'existence d'une rectification dépendante du temps. Par leur non-linéarité, lorsque les mesures sont réalisées en milieu normal, les mêmes courbes montrent l'existence d'une rectification instantanée. Notez l'effet du Cs⁺ (triangle) qui supprime les deux types de rectification.

qui est illustrée par le graphique de la figure 27C. Sur ce graphique, sont représentées les mesures courant-voltage réalisées peu après le début de l'application de l'impulsion hyperpolarisante et plus tard pendant la dépression de la réponse électrotonique, au cours d'une séquence d'impulsions de valeur croissante. L'examen individuel des différentes courbes montre en outre que les tracés ne sont pas linéaires et qu'une augmentation de la conductance membranaire s'établit alors que les impulsions hyperpolarisantes croissent en amplitude. Cette observation suggère l'existence d'une autre forme de rectification anormale dite "instantanée". La rectification "dépendante du temps" n'est pas supprimée lorsque les ions Ca^{++} du milieu de perfusion sont remplacés par des ions Ba^{++} (figure 27A). Elle n'est pas supprimée non plus, lors de l'application de TTX, de TEA ou de Co^{++} (non illustré). Au contraire, elle disparaît pendant l'application de Cs^+ (figure 27B). L'application de Cs^+ a deux autres conséquences : l'atténuation du rebond dépolarisant à la cessation de l'impulsion (figure 27B) et la suppression de la rectification anormale de type instantané (non illustré). Le fait que la rectification soit bloquée par le Cs^+ mais soit insensible au Ba^{++} suggère qu'elle est portée par les ions K^+ et Na^+ (Halliwell et Adams, 1982).

2.7) Rectification sortante transitoire

Pour mettre en évidence la rectification sortante transitoire, des impulsions brèves de courant hyperpolarisant ont été appliquées aux neurones de classe A et B, maintenus à un potentiel de membrane plus positif que le potentiel de repos. Pour 8 neurones des 2 classes, à la fin du choc de courant hyperpolarisant, le retour du potentiel de membrane au niveau de base s'effectue d'abord de manière normale avant d'être considérablement freiné et de nécessiter plusieurs dizaines de ms avant de retrouver sa valeur initiale. Ce phénomène est illustré pour un neurone de classe B (figure 26C) L'application de 4-AP ne supprime pas ce phénomène, qui est dû vraisemblablement à l'intervention d'un courant potassique de type A résistant à la 4-AP (Rudy, 1988).

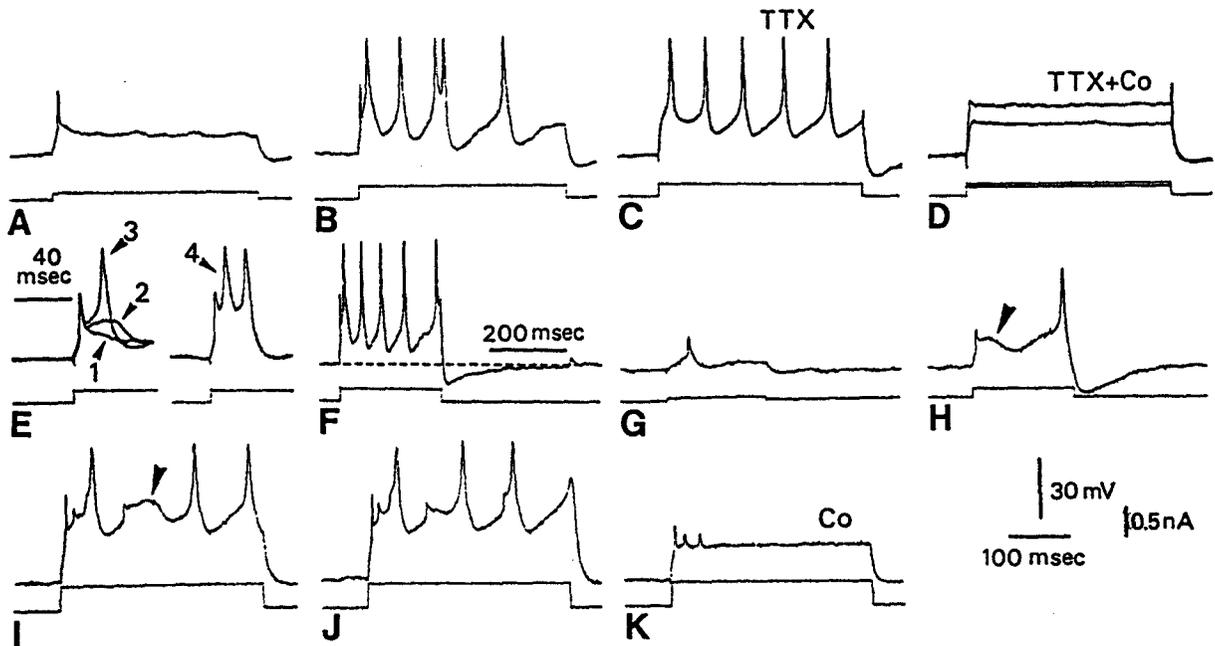


Figure 28 : Exemples de décharges de 2 neurones de classe C. A-F. correspondent à un même neurone (potentiel de repos - 63 mV). A. En milieu contrôle, une impulsion de courant dépolarisant de faible intensité déclenche un potentiel d'action rapide de faible amplitude. B. Une impulsion de courant dépolarisant de plus forte intensité déclenche une décharge répétitive de potentiels d'action de grande taille, l'un présentant un double pic. Ces grands potentiels d'action sont suivis de post-potentiels hyperpolarisants développés. C. En présence de TTX, le petit potentiel d'action disparaît alors que les grands potentiels d'action subsistent. D. Ces potentiels d'action résistants au TTX sont supprimés lorsque le Ca^{++} est remplacé par le Co^{++} . E. Lorsqu'une impulsion dépolarisante de faible intensité (1) est appliquée au même neurone, en milieu normal, le petit potentiel d'action est suivi par d'un potentiel dépolarisant lent. Une augmentation légère de l'intensité de la stimulation induit une augmentation de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent (2) pour atteindre le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action calcique (3), présentant parfois un double pic (4). F. Réponse du même neurone, avec une autre échelle de temps, pour visualiser le post-potentiel hyperpolarisant à la cessation de l'impulsion. Le potentiel de repos est indiqué par la ligne pointillée. G. Pour un autre neurone (- 57 mV), l'application d'une impulsion de courant de faible intensité engendre un potentiel d'action rapide de faible amplitude. H. En augmentant l'intensité, un potentiel dépolarisant lent (pointe de flèche) apparaît sur la phase de repolarisation du petit potentiel d'action. Un grand potentiel d'action calcique présentant un post-potentiel hyperpolarisant développé, est déclenché. I, J. Sur le même neurone, lorsque l'on augmente l'intensité de la stimulation, une décharge répétitive de potentiels d'action calciques est déclenchée. Notez la présence d'un potentiel dépolarisant lent qui s'inactive (pointe de flèche), ou qui atteint le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action calcique (J). K. La nature calcique de ces potentiels d'action est vérifiée sous Co^{++} .

3 - Neurones de classe C

3.1) Propriétés générales

Les potentiels de repos des neurones de classe C ($n=35$) ont une valeur moyenne de $-60 \pm 6,9 \text{ mV}$ (moyenne $\pm \sigma$, $n=20$). Leur résistance membranaire apparente, mesurée au potentiel de repos, a une valeur moyenne de $117 \pm 59 \text{ M}\Omega$ (moyenne $\pm \sigma$, $n=31$).

3.2) Décharges répétitives des neurones de classe C

3.2.1) Observations en milieu normal

Au potentiel de repos, des impulsions de courant dépolarisant de faible intensité provoquent l'apparition d'un seul (figures 28A, G, 30B) ou très rarement de plusieurs (figure 29A) PA rapides de 2 à 10 ms de durée ($5,1 \pm 2,5$ ms, moyenne $\pm \sigma$, $n=26$) et de 8 à 25 mV d'amplitude ($17,5 \pm 4,5$ mV, moyenne $\pm \sigma$, $n=26$). L'application d'impulsions dépolarisantes d'intensité croissante fait apparaître une décharge répétitive de PA plus lents et plus larges dont les durées et des amplitudes sont plus élevées, de 10 à 35 ms ($18,8 \pm 6,2$ ms, moyenne $\pm \sigma$, $n:26$) et de 20 à 45 mV ($31,1 \pm 7$ mV, moyenne $\pm \sigma$, $n=26$) respectivement. La décharge typique consiste donc en un premier PA rapide de faible amplitude, suivi d'une bouffée de PA larges et amples (figures 28B, F, 29A, 30C, tableau 5). Ces derniers peuvent présenter des double pics et sont suivis par des AHP prononcés (figures 28B, 30C). Une phase prononcée d'hyperpolarisation se développe également à la fin de l'application des chocs dépolarisants (figure 28F).

Pour 21 neurones, l'application d'impulsions dépolarisantes peut occasionner non seulement l'apparition de deux types distincts de PA, mais aussi de potentiels dépolarisants lents d'amplitude et de durée variable. Ils sont observés sur la phase de repolarisation des PA rapides, leur amplitude croît graduellement à chaque augmentation de l'intensité des impulsions de courant (figure 28E). Ces potentiels dépolarisants lents peuvent être également observés seuls en réponse à un choc dépolarisant : ils sont inactivés après une phase plateau brève (figure 28H, I) ou ils atteignent le seuil de déclenchement de PA larges (figure 28J).

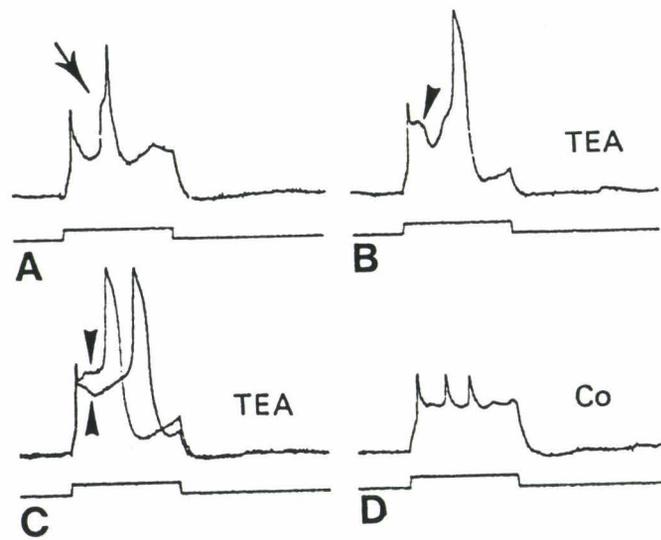


Figure 29 : Actions du TEA sur un neurone de classe C (potentiel de repos = - 62 mV). A. En réponse à une impulsion de courant dépolarisant, ce neurone produit 2 potentiels d'action rapides de faible amplitude, le second déclenchant un potentiel d'action calcique (flèche). B. Sous TEA, le potentiel d'action calcique est plus ample et plus large, tandis que le premier potentiel d'action (sodique) est suivi d'un potentiel dépolarisant (pointe de flèche). C. Une minute plus tard, les deux phénomènes sont accentués. D. La nature calcique des potentiels d'action est vérifiées sous Co^{++} , seuls ne subsistent que les potentiels d'action rapides de faible amplitude.

3.2.2) Spécificité ionique

Afin de déterminer la spécificité ionique des courants responsables de la genèse des PA rapides et lents, l'application de TTX (n=5), de Co^{++} (n=13), et de TEA (n=10) a été réalisée.

- TTX -

Comme l'indique la figure 28C, l'application de TTX (10^{-6}M) dans le milieu de perfusion supprime les PA rapides, alors que les PA lents ne sont pas touchés. Les PA rapides dépendent donc de conductances sodiques.

- Co^{++} -

Le remplacement équimolaire du Ca^{++} par le Co^{++} provoque la disparition de la décharge répétitive des PA lents (figure 28D) et supprime les potentiels dépolarisants lents (figure 28K). Ces deux phénomènes sont donc de nature calcique (voir aussi la figure 29 D).

- TEA -

L'implication des conductances K^+ dans la genèse des PA sodiques et calciques a été envisagée au cours de l'application de TEA (10mM) dans le milieu de perfusion. Cela provoque une augmentation de l'amplitude des PA calciques (figure 29 A-C) et généralement une disparition des doubles pics (non illustré). Dans le cas du neurone illustré par la figure 29, l'application de TEA provoque également l'apparition d'un potentiel dépolarisant lent sur la phase de repolarisation du premier PA sodique (figure 29B). Progressivement, l'administration de TEA induit une augmentation de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent, jusqu'au déclenchement d'un PA lent (figure 29C). L'application de Co^{++} supprime tous les événements de nature calcique : PA lents et potentiels dépolarisants (figure 29D) et il subsiste une succession de PA sodiques de faible amplitude. Cela suggère que les conductances K^+ participent à la repolarisation des PA calciques et sodiques.

3.3) Rectification entrante (anormale)

Presque tous les neurones de classe C présentent une dépression prononcée de leur réponse électrotonique, en réponse à l'application d'impulsions de courant hyperpolarisant. Cette dépression s'accompagne d'un rebond dépolarisant observé avant la cessation de l'impulsion (figure 27D, 30E). Ce phénomène est identique à celui décrit pour les neurones de classe A

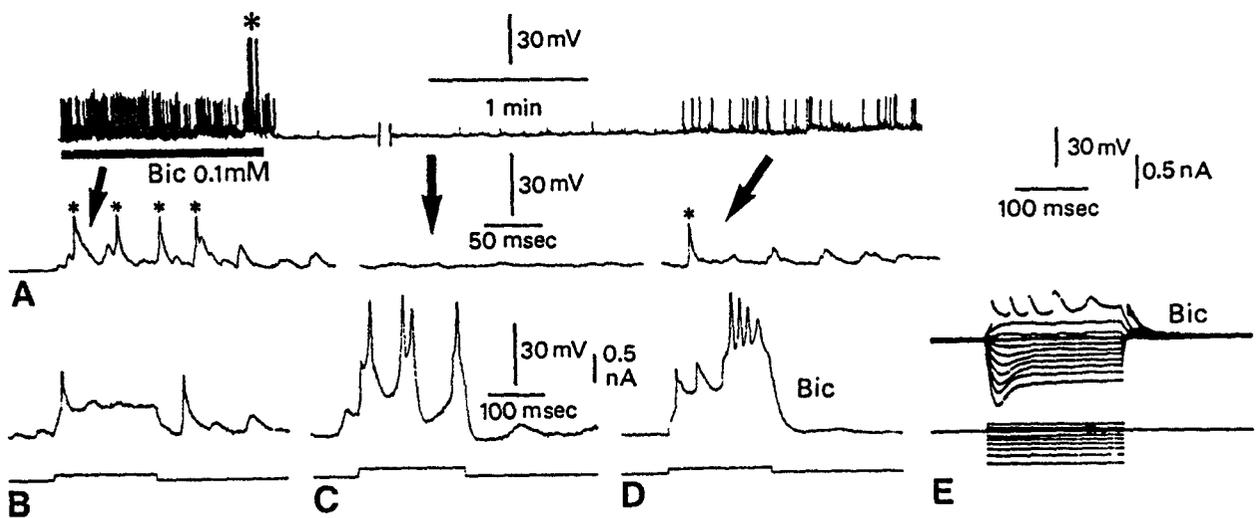


Figure 30 : Actions de la bicuculline sur un neurone de classe C.

A. Tracés supérieurs : enregistrement réalisé au potentiel de repos (- 58 mV) pour montrer la suppression des potentiels post-synaptiques après l'application de bicuculline (Bic) dans le milieu de perfusion. L'effet est réversible. L'interruption dans le tracé est de 7 min. Tracés inférieurs : détails élargis des trois séquences extraites du tracé supérieur, pour montrer les potentiels post-synaptiques dont certains atteignent le seuil de déclenchement de petits potentiels d'action sodiques (astérisques). Des potentiels d'action calciques de grande amplitude sont également produits (astérisques sur les tracés supérieurs). B, C. Réponses du même neurone, en milieu contrôle pour démontrer son appartenance à la classe C. Un des potentiels d'action de grande amplitude présente un double pic. D, E. L'application de Bic provoque une réponse inhabituelle, à la fois pour le potentiel d'action de grande amplitude, qui culmine en un plateau présentant plusieurs pics, et pour les potentiels d'action rapides de faible amplitude, qui sont obtenus de manière répétitive (comparez B et E). La rectification anormale est apparente en E.

et B et correspond à une rectification anormale "dépendante du temps", illustrée par une courbe courant-voltage sur la figure 27C. De plus, les neurones de classe C présentent également des rectifications anormales "instantanées". Les deux types de rectification sont abolies par le Cs⁺ (figure 27 C, D).

3.4) Potentiels post-synaptiques

Au potentiel de repos, 20 neurones présentent des potentiels dépolarisants spontanés d'amplitude avoisinant 10mV (figure 30A). Ces potentiels présentent parfois un décours multiphasique. Ils peuvent donner naissance, lorsque leur seuil de déclenchement est atteint, à des petits et des grands PA, respectivement de nature sodique et calcique. Ces potentiels dépolarisants spontanés correspondent probablement à des événements synaptiques (potentiels post-synaptiques) d'autant plus qu'ils sont totalement supprimés par la TTX (non illustré). Les effets de la bicuculline ont été testés sur 3 de ces neurones. L'application de bicuculline supprime complètement et de manière réversible les potentiels dépolarisants spontanés (figure 30A). Ces observations indiquent que les potentiels dépolarisants spontanés correspondent à des potentiels inhibiteurs post-synaptiques provoqués par le GABA. Ils sont observés ici comme des événements dépolarisants à cause de l'utilisation de microélectrodes contenant du KCl. En réponse à des impulsions de courant dépolarisant, le même neurone (figure 30B, C) présente une décharge typique des neurones de classe C. L'application de bicuculline induit la genèse d'une décharge répétitive de petits PA sodiques, qui ne sont pas observés en milieu normal et produit un PA calcique inhabituel à plusieurs pics (figure 30D, E).

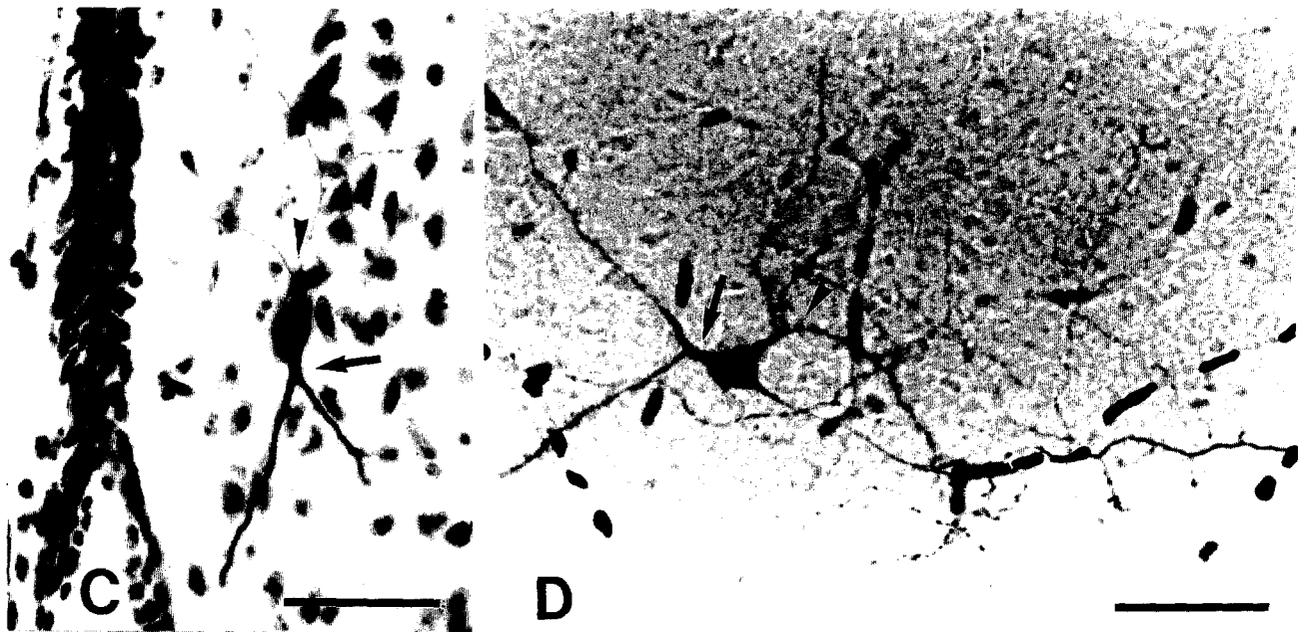
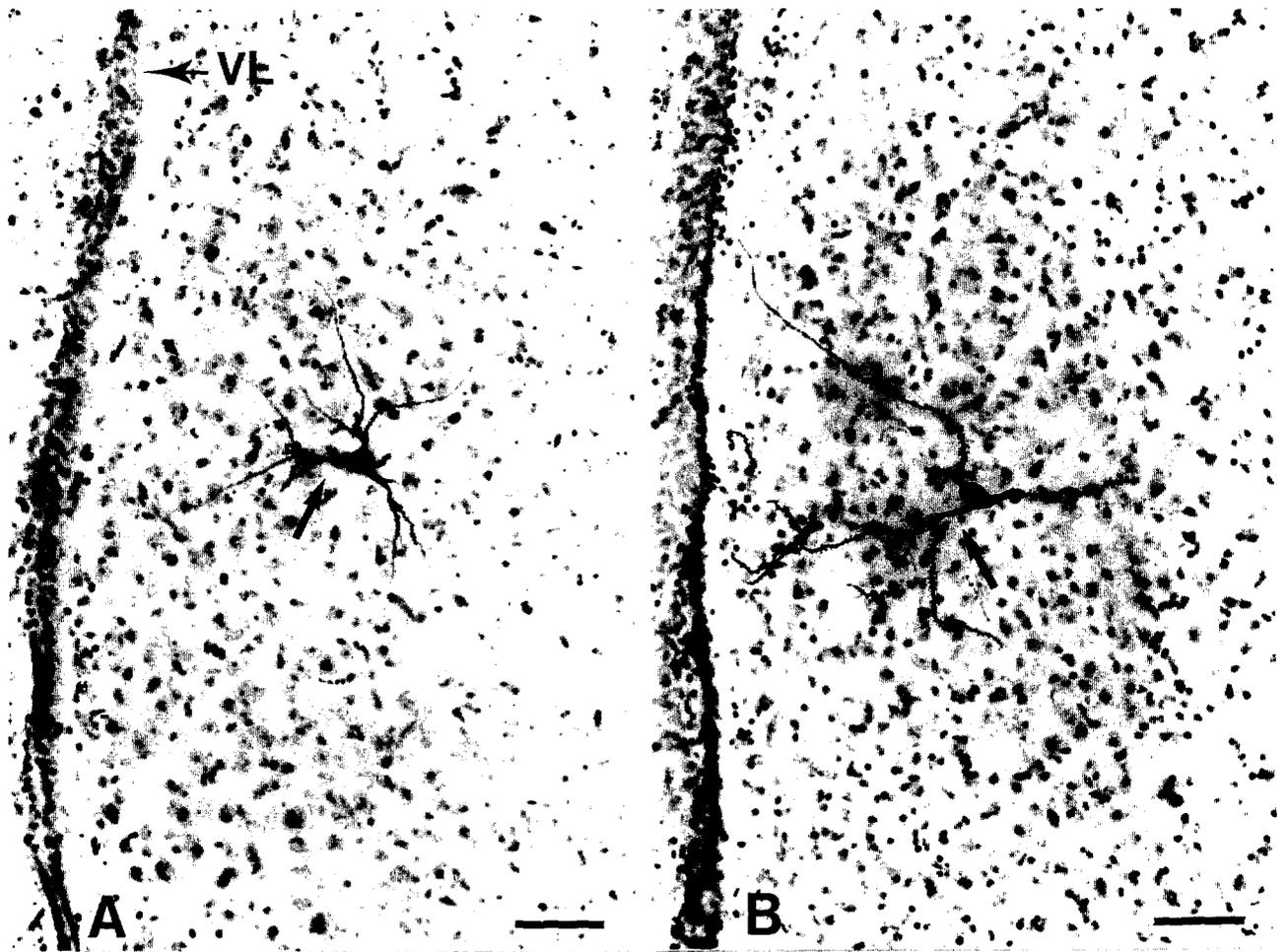
II. Caractéristiques morphologiques des neurones du septum latéral médio-latéral

1 - Analyse à l'échelle du microscope optique

1.1) Généralités

64 neurones du SLml, identifiés de manière électrophysiologique, ont été observés à l'échelle du microscope optique, après injection intracellulaire de peroxydase (n=48) ou de biocytine révélée par l'avidine couplée à la

Figure 31 : Résultats d'injections intracellulaires de peroxydase (A, B) ou de biocytine (C, D) pour des neurones du SLml identifiés sur le plan électrophysiologique, à partir de coupes frontales. Ces deux marqueurs permettent d'obtenir des images comparables au microscope optique. A, C, D. Neurones de classe A. B. Neurone de classe C. L'axone (pointe de flèche) et les "boutons en passant" sont clairement visibles (D). Les flèches pointent les troncs dendritiques élargis à la base. VL: ventricule latéral. Barres de calibration : 100 μ m.



peroxydase (n=16). Une injection intracellulaire unique peut dans certains cas conduire à un marquage multiple. Celui-ci est dû le plus souvent à un mauvais empalement de la cellule et/ou à une perte inopinée de la cellule au cours de l'injection. Cela aboutit à une extrusion du marqueur hors de la cellule. Il peut alors être capté par endocytose par les cellules voisines et produire un marquage multiple suite à une seule injection.

Tableau 6 : Nombre de cellules injectées pour l'analyse morphologique

	SIMPLE MARQUAGE	MARQUAGE MULTIPLE
PEROXYDASE		
Microscopie optique	21	10
Microscopie électronique	7	10
TOTAL	28	20
BIOCYTINE		
Microscopie optique	8	7
Microscopie électronique	0	1
TOTAL	8	8
TOTAL	36	28

Ces marquages multiples peuvent également résulter du passage du traceur d'un neurone à l'autre par des jonctions de type "gap". Ces jonctions, appelées également jonctions communicantes, relient directement le cytoplasme de deux cellules adjacentes par le biais de canaux. Ces jonctions communicantes sont présentes en forte densité au niveau des synapses électriques et permettent le couplage électrique, le couplage métabolique et le transfert de seconds messagers entre les cellules couplées. Seuls les traceurs de faible poids moléculaire peuvent traverser ce type de jonctions. Le LY remplit parfaitement cette condition avec un poids moléculaire (PM) de 457 daltons (Stewart, 1978) et il a d'ailleurs été utilisé pour montrer l'existence de jonctions électrotoniques entre les neurones du SLd (Phelan et coll, 1993). De même, la biocytine (PM = 372 daltons) peut également traverser les jonctions "gap" (Horikawa et Armstrong, 1988 ; Smith et Armstrong, 1990 ; Goddard et coll 1991), contrairement à la peroxydase (PM = 40000 daltons). Comme il est très difficile de distinguer, dans le cas de marquages multiples, quelle est la cellule injectée et donc identifiée par ses propriétés électrophysiologiques, les

expériences qui ont conduit à ce type de marquage (28 neurones) n'ont pas été prises en considération (tableau 6).

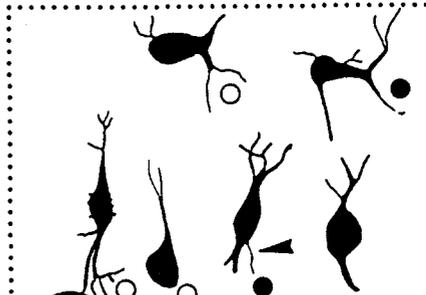
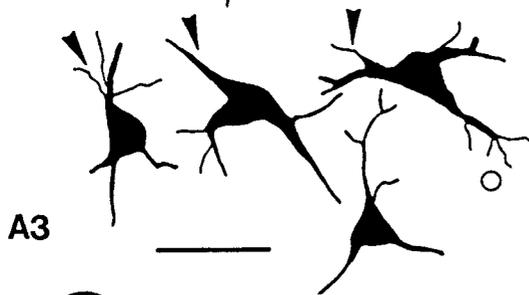
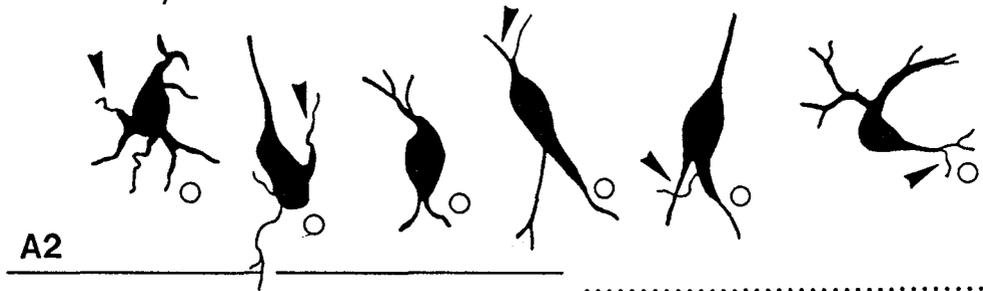
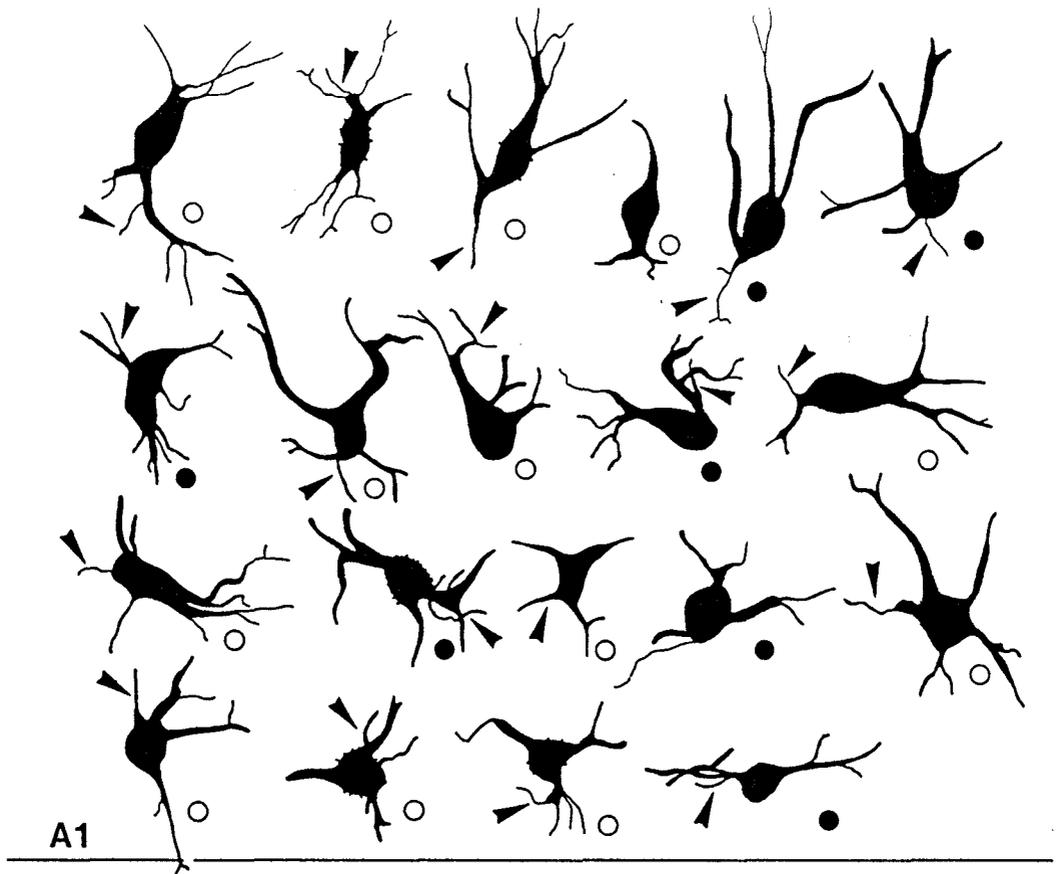
Notre analyse morphologique est donc basée sur 36 neurones. L'utilisation des deux marqueurs permet l'obtention d'images comparables lors de l'analyse microscopique des neurones injectés (figure 31). Parmi ces neurones, 32 présentent des propriétés électrophysiologiques permettant de les classer dans l'une des trois catégories décrites précédemment (tableau 7) : 23 appartiennent à la classe A (figure 31A, C, D) et 9 appartiennent à la classe C (figure 31B). Les propriétés électrophysiologiques des 4 autres neurones injectés n'ont pas pu être établies, car les critères permettant de conclure à un bon empalement n'étaient pas remplis. Il est surprenant de constater qu'aucun neurone simplement marqué n'appartient à la classe B. Ceci est probablement lié à un problème d'échantillonnage, les neurones de classe B constituant la population la moins importante. En fait, parmi les 64 neurones injectés, 5 neurones identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques appartiennent à la classe B. Comme l'injection intracellulaire de ces neurones a donné lieu à des doubles marquages, il n'a pas été possible d'identifier précisément le neurone de classe B. Ces cellules n'ont donc pas été prises en considération dans notre analyse morphologique.

Les 32 neurones caractérisés et injectés sont localisés dans le **SLml** (figure 32).

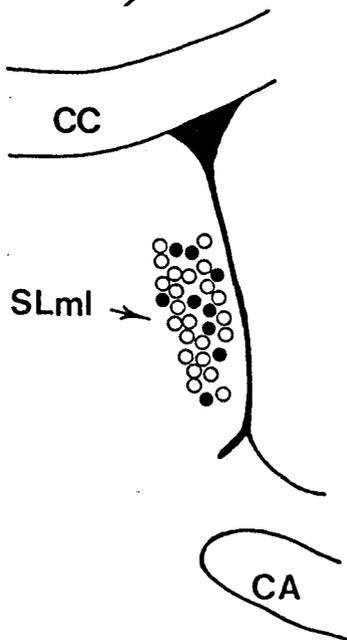
Tableau 7 : Répartition des cellules simplement marquées selon leur classe électrophysiologique.

	CLASSES	
	A	C
PEROXYDASE (n=28)		
Microscopie optique	14	7
Microscopie électronique	6	1
TOTAL	20	8
BIOCYTINE (n=8)		
Microscopie optique	3	1
TOTAL	23	9

Figure 32 : Dessins réalisés à la chambre claire des profils neuronaux des neurones de grande taille (**A**) et des neurones de petite taille (**B**) après injection intracellulaire de peroxydase ou de biocytine. **A1**. Première sous-population, **A2**. deuxième sous-population, **A3**. troisième sous-population des neurones de grande taille. Trente deux de ces neurones sont identifiés comme appartenant à l'une des classes électrophysiologiques (o : classe A, ● : classe C). La localisation des neurones est représentée sur une coupe frontale du SL. Barre de calibration : 40 μm .



(A)



1.2) Caractéristiques somato-dendritiques.

Les neurones injectés sont reconstruits grâce à des dessins réalisés à la chambre claire au grossissement 40, à partir de coupes de 40 μm .

Malgré l'apparente diversité des profils neuronaux (figure 32), 2 populations cellulaires ont pu être individualisées. Le critère de distinction choisi est la taille du péricaryon : 30 neurones présentent un péricaryon de grande taille et 6, un péricaryon de petite taille.

1.2.1) Neurones de grande taille

Cette population neuronale est constituée de 30 neurones caractérisés par un péricaryon de grande taille (longueur: $23,9 \pm 1,7 \mu\text{m}$; largeur: $14,7 \pm 2,2 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=30). Parmi ces 30 neurones, 3 sous-populations ont pu être individualisées en fonction de critères morphologiques particuliers (figure 32A). Les principales caractéristiques de ces neurones sont répertoriées dans le tableau 8.

- Première sous-population -

Le groupe cellulaire prédominant (n=20) est constitué de neurones ayant un corps cellulaire de grande taille, de forme ovoïde ou globulaire (longueur : $25,0 \pm 4,4 \mu\text{m}$; largeur $15,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=20) d'où émergent 2 à 5 dendrites. Les profils de ces cellules sont représentés sur la figure 32A₁. Treize de ces neurones appartiennent à la classe A et 7 à la classe C (figure 32A₁).

Ces 20 cellules présentent deux caractéristiques morphologiques particulières.

La première particularité est la présence de troncs dendritiques (ou dendrites primaires) élargis à la base jusqu'à atteindre une largeur de 4 à 8 μm (figures 33, 34A-B). Ces élargissements sont généralement dépourvus d'épines dendritiques. Pour 5 cellules, les troncs dendritiques élargis se prolongent sur une distance d'environ 60 μm avant de se ramifier en dendrites secondaires (figure 33). Ces cellules présentent donc un aspect pédonculé. Les dendrites primaires sont très épaisses sur toute leur longueur jusqu'à la bifurcation où elles se subdivisent en dendrites secondaires, généralement plus fines. Une cellule de cette sous-population (figure 35A) a une morphologie particulière qui la fait ressembler à une cellule "pieuvre". C'est une grande cellule avec plusieurs dendrites primaires orientées dans une seule direction. Les dendrites primaires des autres cellules se ramifient en dendrites secondaires soit à

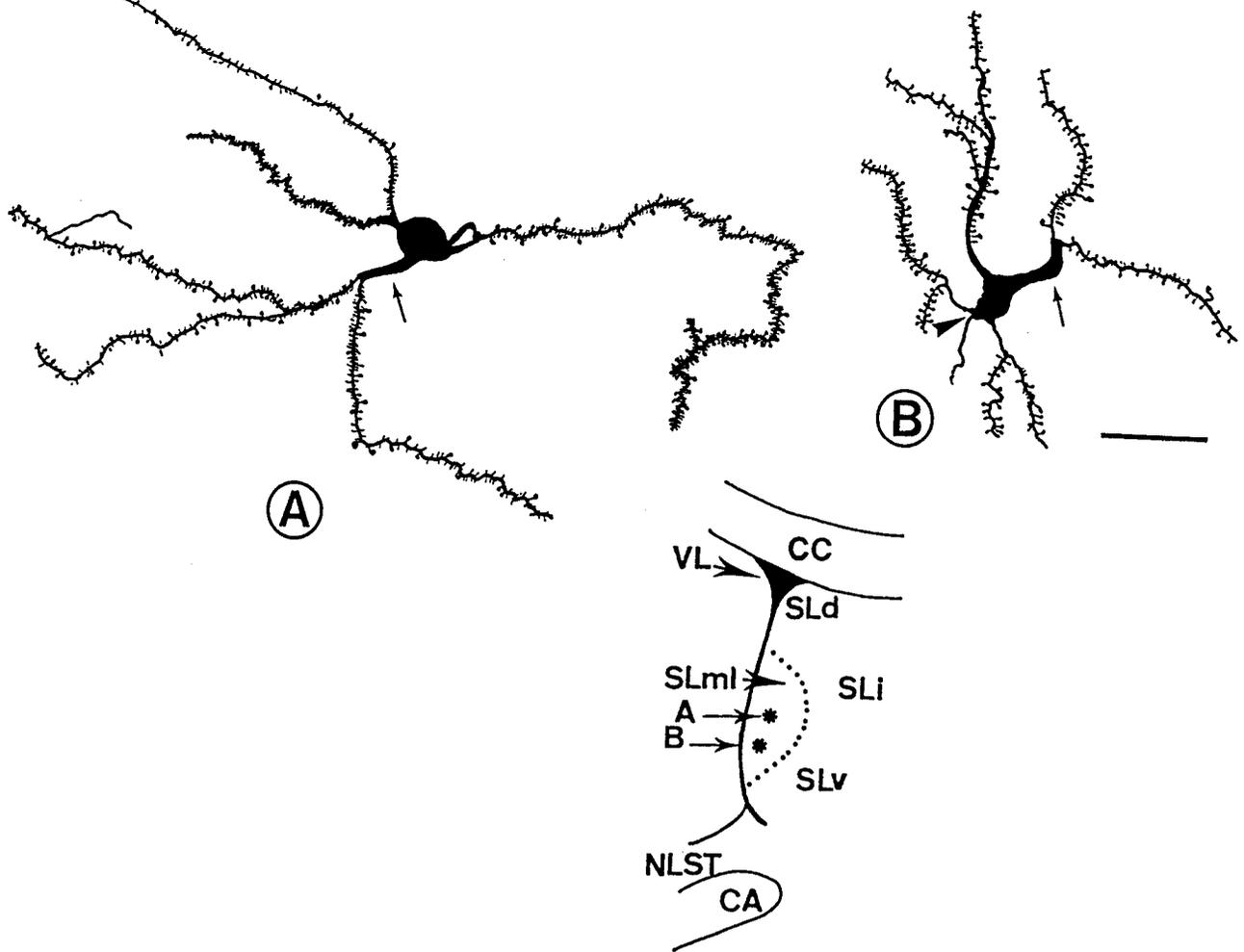
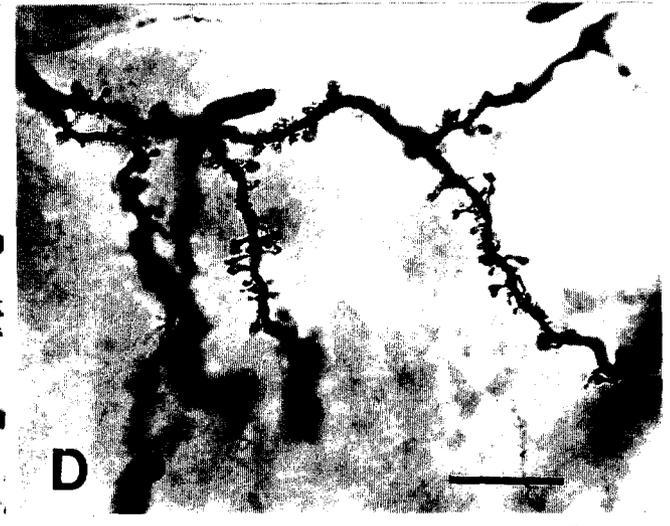
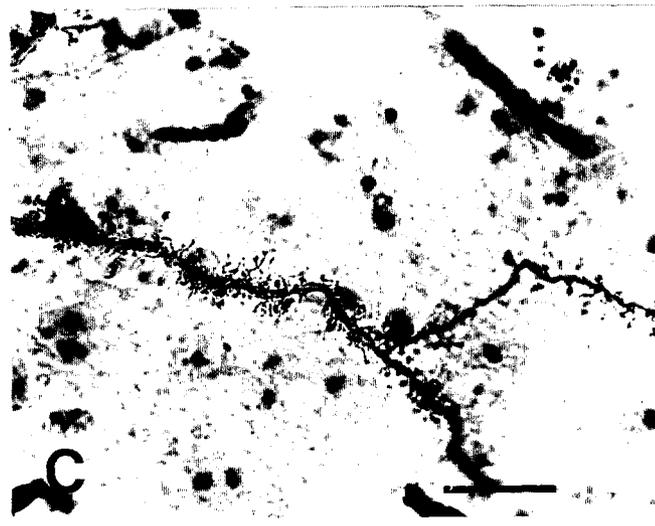
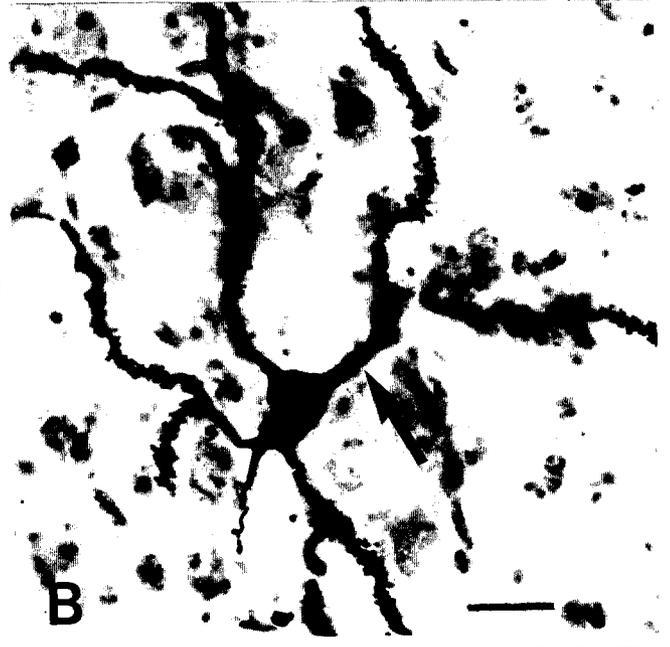


Figure 33 : Dessin réalisé à la chambre claire de 2 neurones marqués par injection intracellulaire de peroxydase et dont les microphotographies sont présentes sur la figure 34. Ces neurones sont des neurones de grande taille et appartiennent à la classe C (A) et à la classe A (B). Notez la présence de dendrites primaires élargies à la base (flèche). La pointe de flèche indique l'axone. Barre de calibration : 50 μm .

Figure 34 : Principales caractéristiques morphologiques des neurones de grande taille, injectés par la peroxydase. A, B. Ces neurones de classe C (A) et de classe A (B), dessinés sur la figure 33, présentent un élargissement de leur dendrite primaire (flèche), qui donne au corps cellulaire un aspect pédonculé. C, D. Fragments dendritiques de deux autres neurones, illustrant la diversité morphologique des épines. E. Exemple d'un autre neurone de classe A, présentant un tronc dendritique élargi à la base (flèche) et des épines somatiques (petites flèches). L'axone est également visible (pointe de flèche). F. Illustration du plexus axonique du neurone présenté en E. Notez la présence de nombreuses collatérales pourvues de "boutons en passant" (petites pointes de flèche). Un fragment d'axone de projection est visible (grande pointe de flèche). Les coupes A, B, C, E, et F ont été contrecolorées par la thionine, alors que la microphotographie D a été prise à partir d'une inclusion fine dans l'araldite. Barres de calibration : 50 μm .



proximité du péricaryon (n=6), soit à une distance comprise entre 4 et 15 μm du péricaryon (n=9). Le diamètre des dendrites s'amenuise à mesure que l'on s'éloigne du péricaryon (figure 35A) et leur orientation est variable, comme cela sera précisé plus loin.

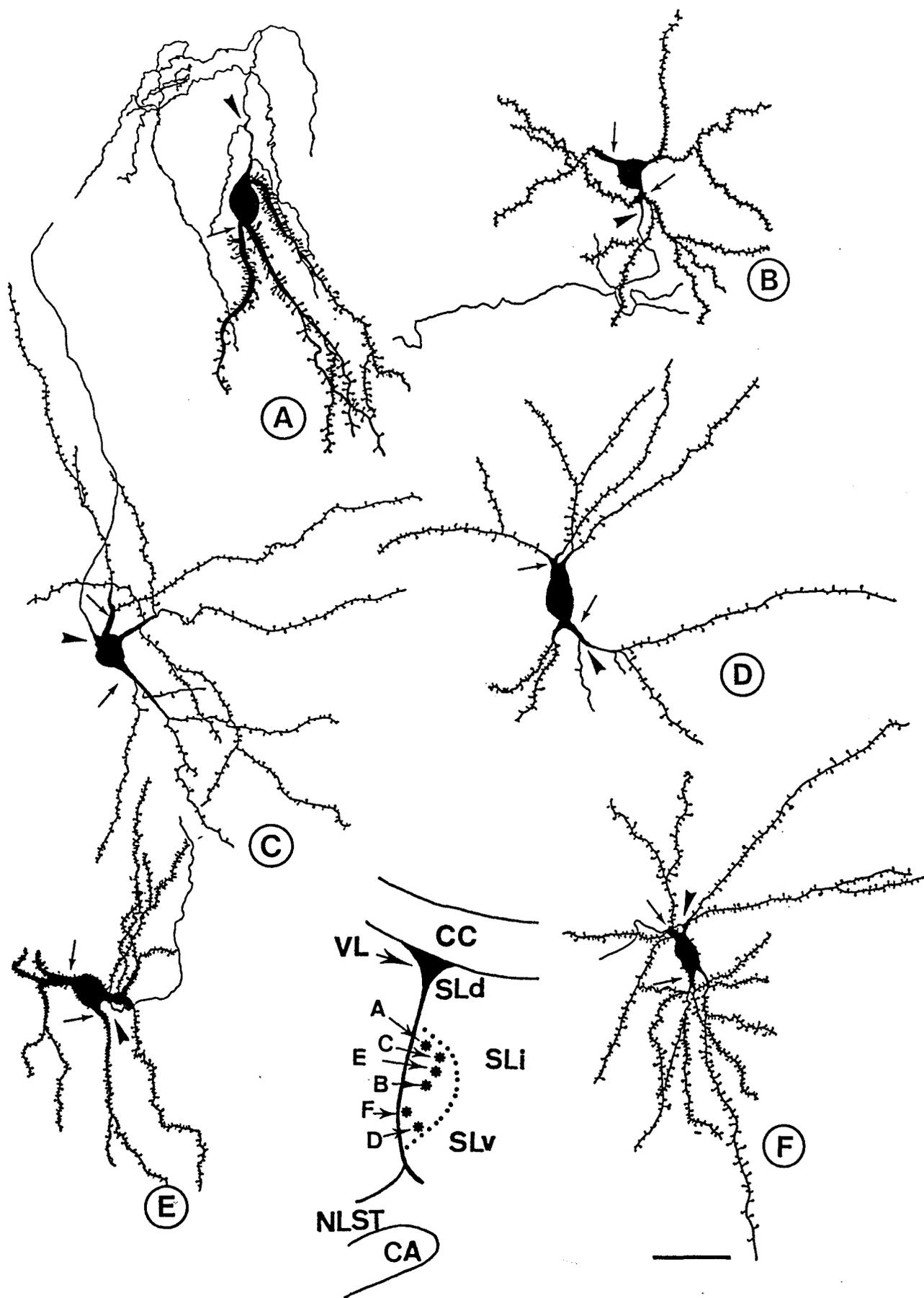
La deuxième particularité de ces 20 cellules est la présence d'un nombre important d'épines dendritiques, de forme et de taille variées (figure 34 C, D). Ces épines se présentent soit sous la forme d'une hampe, longue et fine sans sphérule terminale, soit sous la forme d'une hampe soit courte, soit longue, avec une sphérule terminale leur donnant l'aspect d'un champignon. Quelques expansions dendritiques ayant la forme de hampes longues et fines surmontées par de petites sphérules sont incurvées. Les différents types d'épines sont disposés de manière aléatoire le long des prolongements dendritiques où elles sont trouvées en nombre variable. Il est à noter que la densité des épines est plus importante dans la partie proximale et tend à décroître vers la partie distale de la dendrite (figure 35). Deux neurones, caractérisés par une dendrite primaire très large (8 μm), arborent des épines dendritiques dont la sphérule terminale est d'une taille beaucoup plus importante (figure 33B).

Les ramifications des dendrites primaires constituent le champ dendritique qui, mesuré à partir des dessins réalisés, s'échelonne entre 80 et 350 μm . La mesure du diamètre ou de l'extension du champ dendritique a été faite à partir de schémas réalisés à la chambre claire. Il est donc évident que cette valeur ne reflète pas l'exacte vérité car le champ dendritique n'est apprécié que dans deux plans au lieu de trois. De plus, l'appréciation de l'extension du champ dendritique est limitée également par l'utilisation de tranches, qui ne permettent pas la reconstruction totale de l'arborisation dendritique.

Les champs dendritiques présentent un contour et une orientation qui permettent de caractériser ces 20 cellules (figure 35). Ils peuvent être sphériques (n=7 ; figure 35B), coniques (n=8 ; les dendrites sont alors orientées vers le SLd (n=4) ou sont perpendiculaires au ventricule latéral (n=4) ; figure 35C), ou cylindriques (n=5 ; les dendrites sont alors parallèles au ventricule latéral ; figure 35D).

Enfin, 5 de ces 20 cellules se distinguent par la présence d'épines somatiques (figures 34E, 35B, E, F, 38, 40B). Ces appendices sont répartis au hasard sur le péricaryon et ont l'aspect d'une hampe sans sphérule terminale ou d'une hampe pourvue d'un élargissement distal ressemblant à une sphérule. Le nombre d'épines somatiques observé sur ces cellules est relativement faible, 5 à

Figure 35 : Dessins réalisés à la chambre claire de neurones de grande taille, injectés par la peroxydase. Ces neurones appartiennent à la première sous-population. Ils sont localisés dans le SLml. Les flèches pointent les dendrites primaires élargies à la base, les pointes de flèche indiquent l'axone. Ces cellules sont toutes pourvues de nombreuses épines dendritiques. **A**. Cellule "pieuvre". Notez l'orientation des dendrites dans la même direction. **B-D**. Illustration des différents contours des champs dendritiques, sphérique (**B**), conique (**C**), cylindrique (**D**). Les neurones **B**, **E**, **F**. présentent des épines somatiques. Notez les nombreuses collatérales de l'axone de projection des neurones **A** et **B** à proximité du corps cellulaire. Les neurones **C**, **D**, **E** et **F** ne présentent qu'un court fragment axonique correspondant probablement à un axone de projection. Barre de calibration : 50 μm .



10 épines sont en général dénombrées. Trois de ces cellules appartiennent à la classe A et une à la classe C.

- Deuxième sous-population -

La deuxième sous-population constituée à partir des 30 neurones de grande taille comporte 6 cellules. Leur péricaryon est ovoïde ($26,3 \pm 4,5 \times 13,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=6) et 2 à 5 dendrites en émergent. Leurs profils neuronaux sont représentés sur la figure 32A2. Ces neurones appartiennent tous à la classe A. Quatre de ces neurones présentent des troncs dendritiques élargis à la base (largeur maximale : 6 μm). Les dendrites primaires bifurquent à une distance de 10 μm à partir du péricaryon, sauf pour 2 neurones où la bifurcation s'effectue à une distance de 80 μm du péricaryon. Les 6 neurones de cette sous-population se distinguent des précédents par leur faible densité en épines dendritiques (figure 36A). En effet, 3 neurones ne présentent que quelques épines alors que les 3 autres en sont totalement dépourvus. Les épines dendritiques ne présentent pas de sphérule terminale.

Les ramifications des dendrites primaires sont peu nombreuses. Le champ dendritique de ces neurones est peu développé et il s'étend sur environ 150 à 200 μm . Il a un contour conique (n=3) ou cylindrique (n=3). Les dendrites ont plutôt une orientation parallèle au ventricule latéral.

- Troisième sous-population -

La troisième sous-population de cellules parmi les 30 neurones de grande taille, est la moins nombreuse et ne comporte que 4 neurones. Leur caractéristique principale est la forme du péricaryon qui est triangulaire ($22,0 \pm 2,8 \times 14,0 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=4). Les dendrites émergent de chaque pôle du péricaryon. Les profils neuronaux de cette sous-population sont représentés sur la figure 32A3. Deux cellules ont été identifiées électrophysiologiquement : elles appartiennent à la classe A. Les dendrites primaires sont généralement élargies à la base (largeur maximale : 4 μm). Elles bifurquent après un parcours de 5 à 10 μm , constituant ainsi un champ dendritique s'étendant sur environ 200 μm . Trois de ces cellules présentent un nombre varié d'épines dendritiques, dont les formes et la disposition sont semblables à ce qui a été décrit pour la première sous-population. Enfin, le contour dendritique est sphérique pour les 4 neurones injectés (figure 36B).

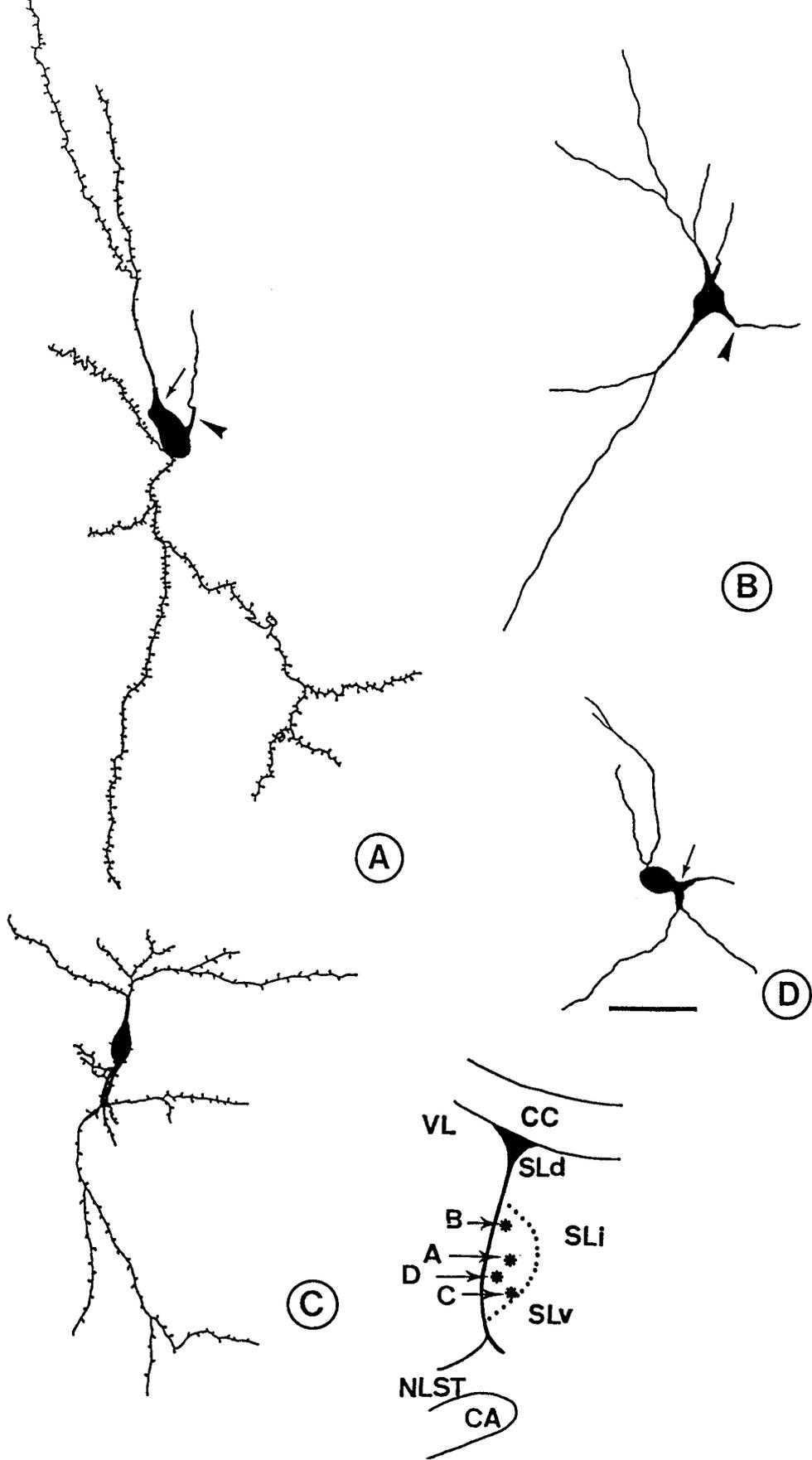


Figure 36 : Dessins réalisés à la chambre claire de neurones de grande taille (A, B) et de petite taille (C, D), injectés par la peroxydase. Ces 4 neurones sont localisés dans le SLml. Les flèches pointent les dendrites primaires épaissies, les pointes de flèche indiquent l'axone. A. Exemple de neurone de la deuxième sous-population. Notez le corps cellulaire ovoïde, la dendrite primaire épaisse, les épines dendritiques. B. Exemple de neurone de la troisième sous-population. Notez le corps cellulaire triangulaire et l'absence d'épines dendritiques. C. Neurone de petite taille présentant un corps cellulaire ovoïde, pourvu d'épines somatiques et d'épines dendritiques. D. Neurone de petite taille présentant un corps cellulaire globulaire et une dendrite primaire épaisse. Les cellules A et B présentent un court fragment axonique. Barre de calibration : 50 μm .

Tableau 8 : Récapitulatif des principales caractéristiques des cellules de grande taille.

Densité des épines dendritiques : + très dense ; - moyennement dense ; o absence d'épines.

Contour du champ dendritique : S sphérique ; Cy cylindrique ; Co conique.

Forme du péricaryon	ovoïde	globulaire	triangulaire	Total
Nombre de cellules	18	8	4	30
Nombre de cellules avec des épines somatiques	3	2	0	5
Nombre de dendrites primaires	2 à 5	2 à 5	3	
Nombre de cellules avec de larges troncs dendritiques	16	8	4	28
<u>Epines dendritiques</u> :				
+	12	7	1	20
-	2	1	2	5
o	3		1	4
<u>Contour du champ dendritique</u> :				
S	2	5	4	11
Cy	7	1	0	8
Co	9	2	0	11
<u>Classe électrophysiologique</u> :				
A	14	5	1	20
C	4	3	0	7

1.2.2) Neurones de petite taille.

Par rapport aux 30 neurones décrits précédemment, les 6 autres neurones injectés se caractérisent surtout par un péricaryon de petite taille (longueur: $17,3 \pm 2,7 \mu\text{m}$; largeur: $11,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=6). Les principales caractéristiques de ces neurones sont répertoriées dans le tableau 9. La forme du corps cellulaire est soit ovoïde ($18,5 \pm 1,0 \times 11,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=4), soit globulaire ($15,0 \pm 4,9 \times 13,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$, moyenne $\pm \sigma$, n=2) et 2 à 3 dendrites

primaires en émergent. Pour chaque neurone, au moins une de ces dendrites est élargie à la base (largeur maximale: 6µm). Les profils neuronaux sont représentés sur la figure 32B.

Tableau 9 : Récapitulatif des principales caractéristiques des cellules de petite taille.

Densité des épines dendritiques : + très dense ; - moyennement dense ; o absence d'épines.

Contour du champ dendritique : S sphérique ; Cy cylindrique .

Forme du péricaryon	ovoïde	globulaire	Total
Nombre de cellules	4	2	6
Nombre de cellules avec des épines somatiques	1	0	1
Nombre de dendrites primaires	2	2 à 3	
Nombre de cellules avec de larges troncs dendritiques	1	2	3
<u>Epines dendritiques</u> :			
-	2	1	3
o	2	1	3
<u>Contour du champ dendritique</u> :			
S	0	2	2
Cy	4	0	4
<u>Classe électrophysiologique</u> :			
A	2	1	3
C	1	1	2

Trois de ces cellules appartiennent à la classe A et les 2 dernières présentent les caractéristiques électrophysiologiques des neurones de classe C. Une des cellules de classe A présente des épines somatiques (figure 36C). Les dendrites primaires bifurquent à une distance d'environ 10µm du péricaryon (figure 36D) ; les dendrites d'ordre supérieur sont marquées sur une courte

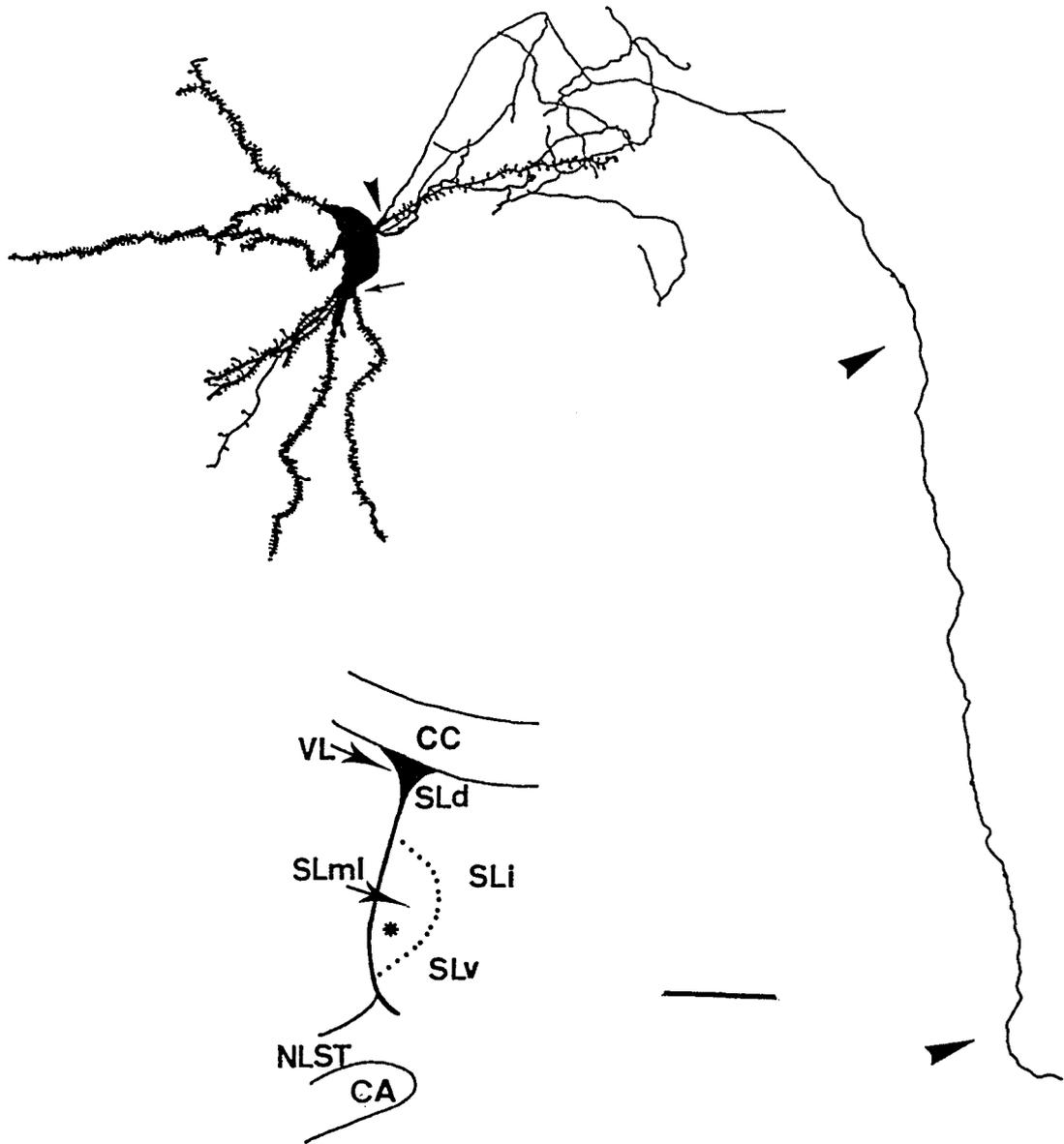


Figure 37 : Dessin réalisé à la chambre claire d'un neurone de grande taille injecté par la peroxydase, appartenant à la première sous-population. Le cône d'émergence de l'axone (petite pointe de flèche) se situe sur le corps cellulaire. Ce neurone localisé dans le SLml présente un axone de projection (grandes pointes de flèche) orienté vers la CA, qui se ramifie densément à proximité du corps cellulaire. La flèche pointe la dendrite primaire élargie à la base. Barre de calibration : 50 μm .

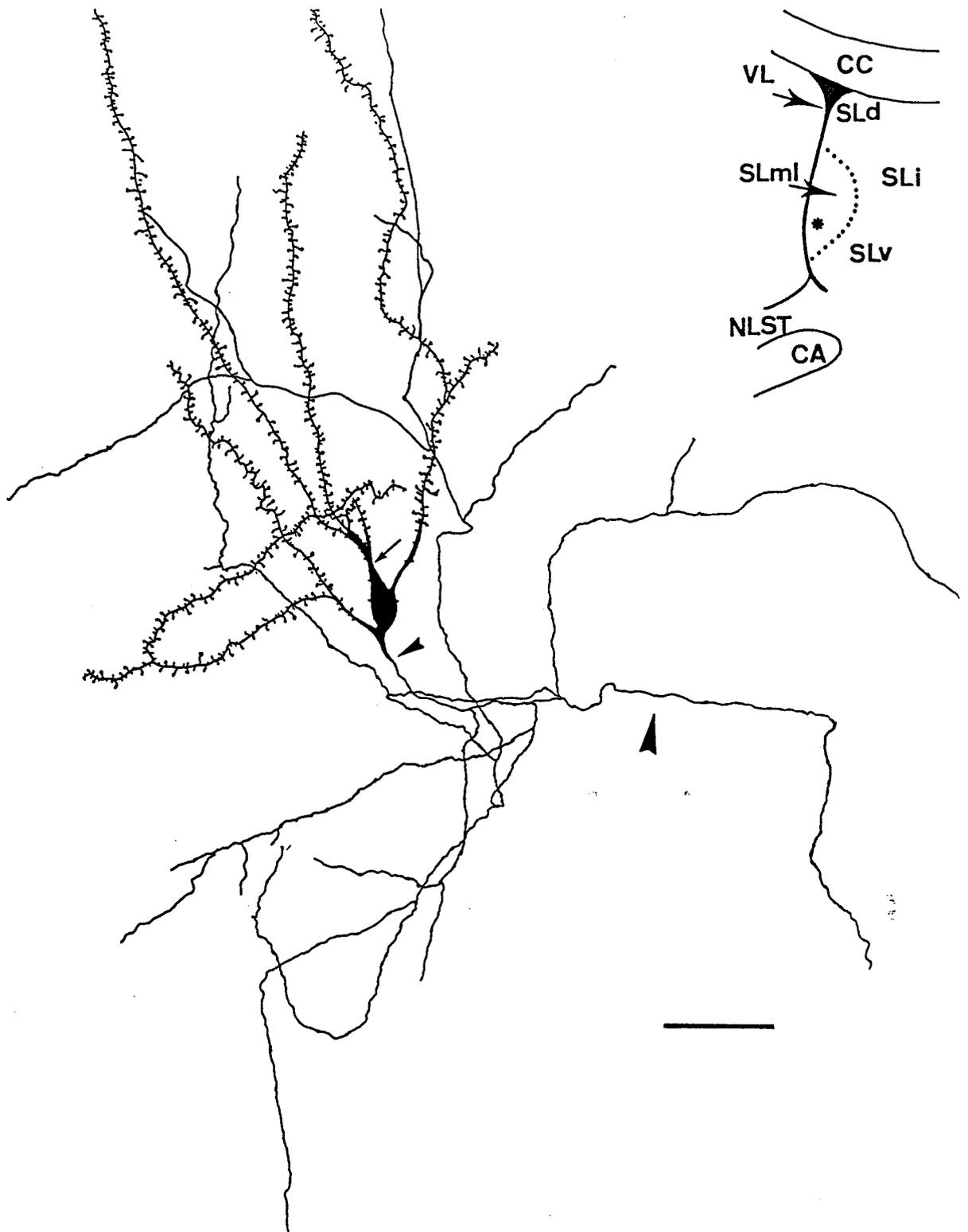


Figure 38 : Dessin réalisé à la chambre claire d'un neurone de grande taille injecté par la peroxydase, appartenant à la première sous-population. Le cône d'émergence de l'axone (petite pointe de flèche) se situe sur une dendrite primaire épaisse (flèche). Ce neurone localisé dans le SLml présente un axone de projection (grande pointe de flèche) orienté vers la CA. De nombreuses collatérales axoniques sont observées à proximité du corps cellulaire. Notez la présence d'épines somatiques. Barre de calibration : 50 μm .

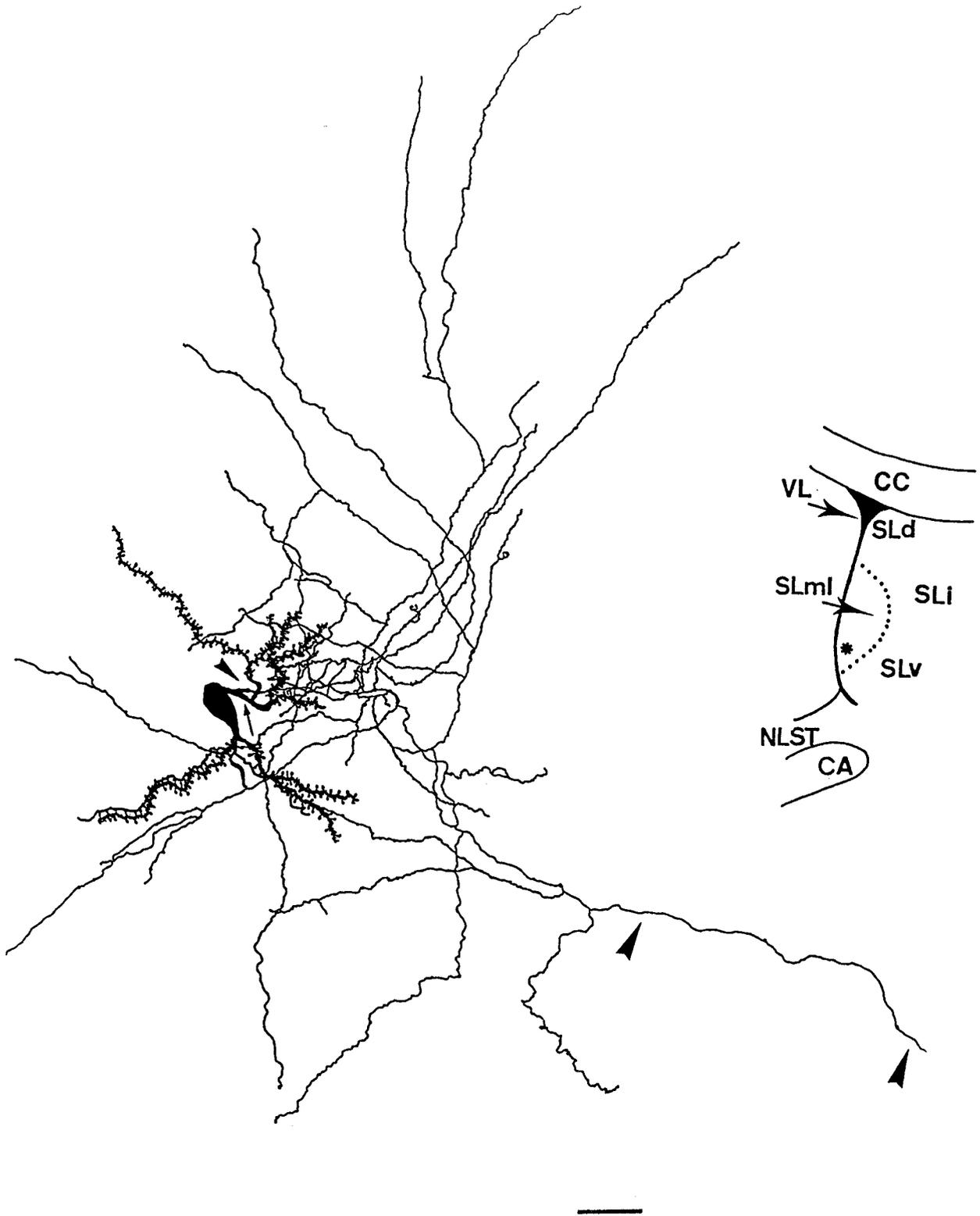


Figure 39 : Dessin réalisé à la chambre claire d'un neurone de grande taille injecté par la peroxydase, appartenant à la première sous-population. Le cône d'émergence de l'axone (petite pointe de flèche) se situe sur une dendrite primaire épaisse (flèche). Ce neurone localisé dans le SLml présente un axone de projection (grande pointe de flèche) orienté vers le SM ou vers la CA. De nombreuses collatérales axoniques sont observées à proximité du corps cellulaire et sont mêlées aux prolongements dendritiques. Barre de calibration : 50 μm .

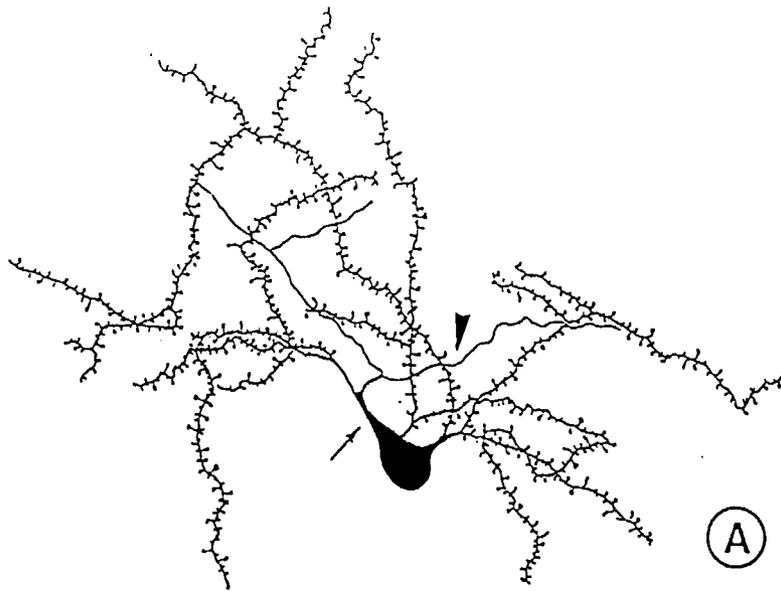
distance et possèdent peu (n=3) ou pas (n=3) d'épines dendritiques (figure 36D). Le champ dendritique de ces cellules est peu développé, il présente un contour sphérique (n=2) ou cylindrique (n=4). Les dendrites sont généralement parallèles au ventricule latéral.

1.3) Analyse du champ axonal

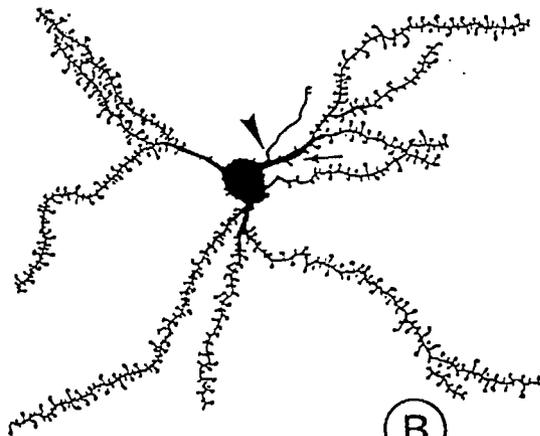
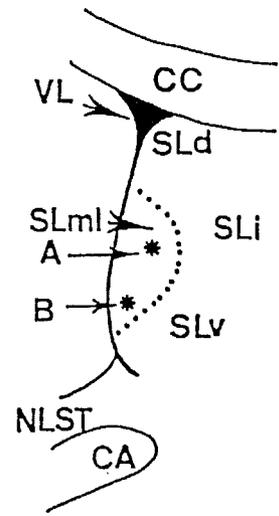
Le champ axonal de 27 cellules, parmi les 36 sélectionnées, a été analysé en microscopie optique. Il n'a pas été observé d'axones marqués pour les 9 autres cellules. Les cônes d'émergence des axones se situent soit sur le corps cellulaire (n=10), soit sur la portion proximale des dendrites primaires (n=17). Pour 11 cellules, seule une courte portion d'axone, dépourvue de collatérales, est marquée sur une distance inférieure à 100 μm (min : 10 μm ; max : 90 μm). Ces collatérales ne présentent pas de varicosités. Pour les 16 autres, les axones sont suivis sur des distances plus longues (min : 100 μm ; max : 600 μm). Généralement, ils sont formés d'un fragment long représentant un axone de projection (figures 37, 38, 39) et de fragments axoniques provenant de collatérales de l'axone de projection. La reconstruction des axones grâce aux dessins réalisés à la chambre claire a permis d'évaluer la trajectoire des axones de projection : 7 se dirigent vers la commissure blanche antérieure, 5 vers le septum médian et 4 vers le SLd. Lorsqu'elle existe (n=12), la collatéralisation de l'axone de projection s'établit à environ 20 μm du péricaryon et de multiples ramifications forment un plexus axonique plus ou moins développé, qui s'étend dans la proximité du péricaryon (figures 37, 38, 39). Des "boutons en passant" sont fréquemment observés le long des collatérales axoniques (figure 34F). Ces collatérales sont souvent mélangées avec les prolongements dendritiques. Certaines collatérales longues adoptent une orientation autre que celle de l'axone de projection et se ramifient vers le SM ou SLv (figure 39).

Parmi ces 27 neurones, 5 neurones de grande taille se distinguent par la présence d'épines somatiques (figure 38). Leur axone émerge d'un tronc dendritique. Un seul axone est suffisamment marqué pour le suivre sur une longue distance et il se dirige vers la commissure blanche antérieure. Il présente de nombreuses ramifications qui se développent à proximité du péricaryon et s'étendent sur un diamètre de 240 μm . Ces collatérales présentent de nombreux "boutons en passant". Un autre neurone montre un axone de projection long de 160 μm , orienté vers le septum médian ; cet axone se ramifie en de petites collatérales situées dans la proximité immédiate du péricaryon.

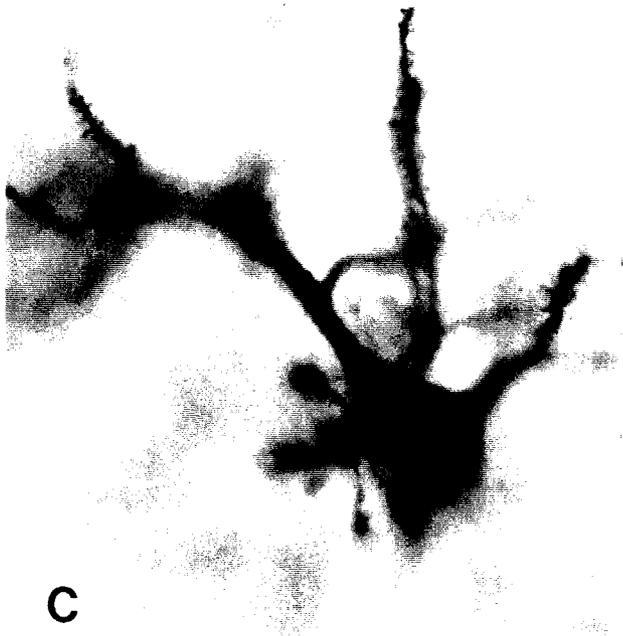
Figure 40 : Illustration des étapes préalables à l'examen ultrastructural de neurones injectés par la peroxydase, révélée par la DAB. **A, B.** Dessins réalisés à la chambre claire à partir des inclusions fines. Ces neurones de grande taille sont localisés dans le SLml. Les flèches pointent les dendrites primaires élargies à la base, les pointes de flèche indiquent l'axone. **C.** Microphotographie du neurone dessiné en A. Notez que la technique d'inclusion permet de visualiser les moindres détails du neurone. **D.** Microphotographie d'une coupe semi-fine (2 μm) du même neurone. Barre de calibration : 100 μm .



(A)



(B)



C



D

2 - Analyse à l'échelle ultrastructurale.

Parmi les 64 cellules injectées, 18 ont été incluses dans l'Araldite (tableau 6). La technique d'inclusion fine a permis d'établir leur profil au microscope optique avant de procéder à une inclusion définitive dans l'Araldite (figure 40). Sept d'entre elles sont simplement marquées, ont été caractérisées sur le plan électrophysiologique et ont fait l'objet d'un examen ultrastructural. Six ont les caractéristiques électrophysiologiques des neurones de classe A et la dernière de la classe C (tableau 7).

2.1) Caractéristiques somato-dendritiques

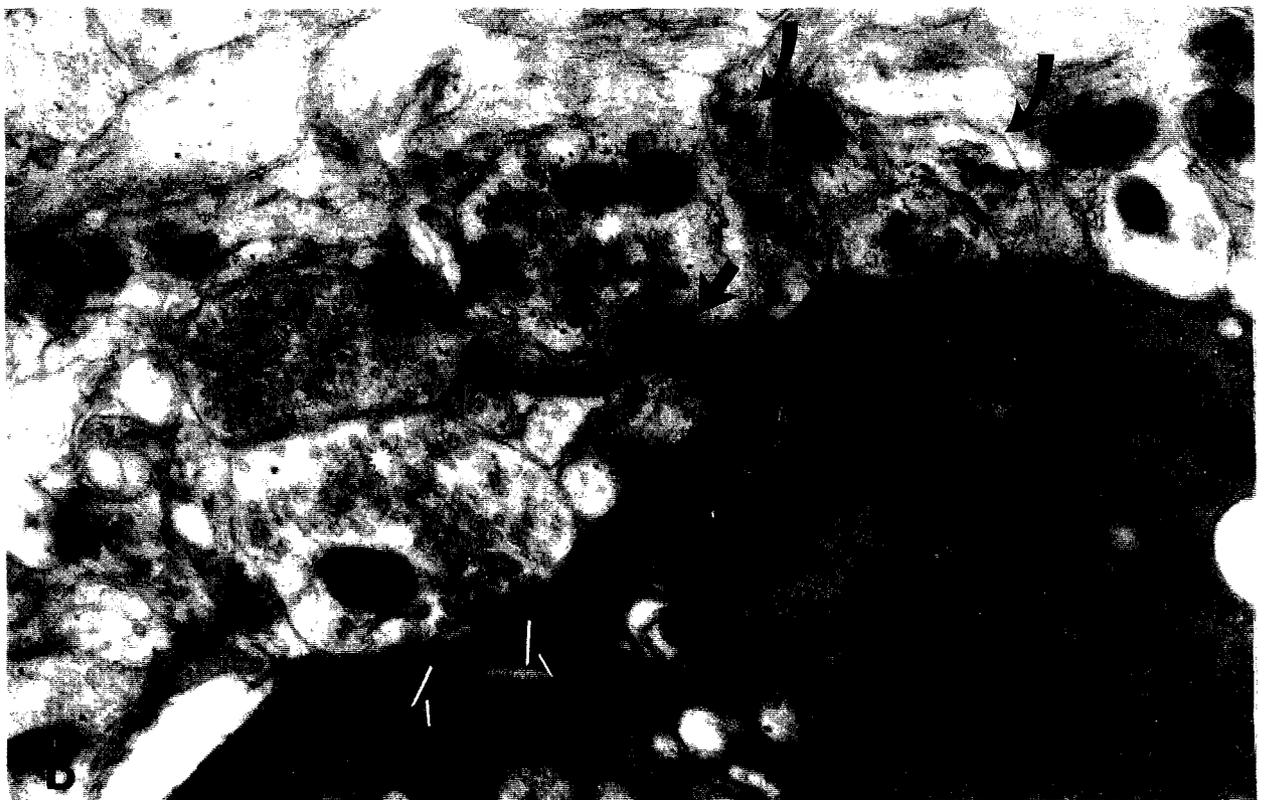
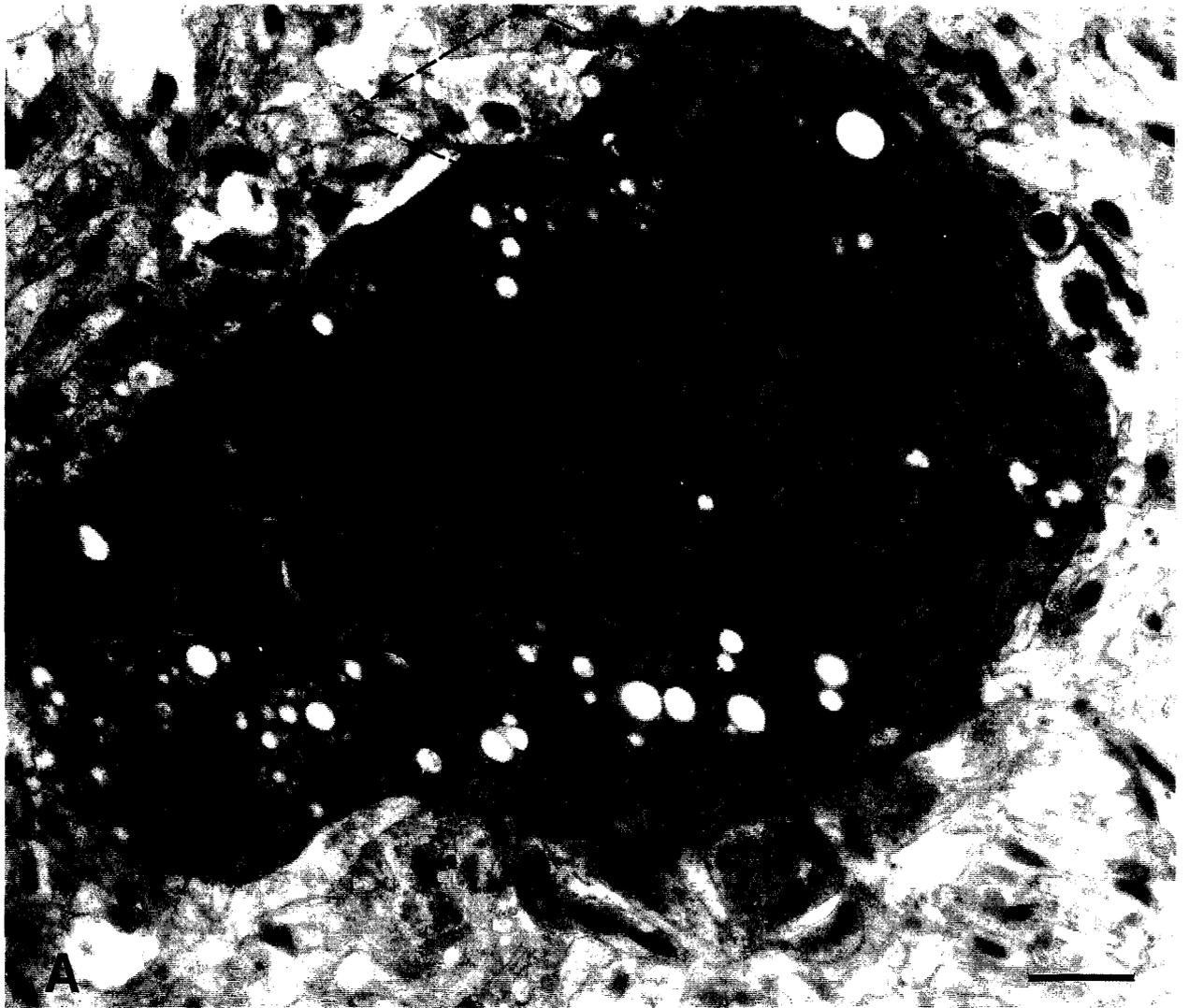
En tenant compte de la technique utilisée, l'examen ultrastructural révèle une bonne conservation du tissu, comme l'indiquent les figures 41-44. Le noyau présente de nombreuses indentations qui le traversent sur presque tout son diamètre (figures 41A, 43A). Dans le cytoplasme, les organites classiques sont observés (figure 44A). Le réticulum endoplasmique rugueux est dispersé au sein de la cellule. L'appareil de Golgi et les mitochondries sont regroupés à proximité du noyau. Des épines somatiques sont observées sur 6 cellules (figures 41A, 43A). Au microscope optique, l'observation des inclusions fines n'avait montré la présence d'épines somatiques que sur 3 de ces cellules. La taille (0,3 à 1,5 μ m) et la forme des épines somatiques sont variables. Elles se présentent le plus souvent comme de petits pédoncules surmontés ou non par une tête sphérique (figures 41B, 43A, C). A proximité du corps cellulaire rempli par la peroxydase, des sections de dendrites marquées sont également visibles (figure 42).

2.2) Caractéristiques des terminaisons nerveuses

Des terminaisons nerveuses sont observées en contact avec la cellule marquée : soit au contact des épines somatiques (figures 41B, 43C), soit au contact du corps cellulaire (figures 41B, 43B, 44B), soit au contact des dendrites (figure 42). En fonction de leur contenu, il est possible de distinguer deux types de terminaisons nerveuses : elles peuvent ne contenir que des petites vésicules claires (30 à 60 nm de diamètre) ou contenir en plus de ces vésicules, des granules denses de grande taille (80 à 100 nm de diamètre). Le premier type de terminaison est le plus couramment observé au contact de la cellule injectée (figures 41B, 42A). Bien que le produit de réaction obtenu par la

Figure 41 : Caractéristiques morphologiques à l'échelle ultrastructurale du neurone illustré en A, C, D dans la **figure 40**. A. A faible grossissement, notez les organites cellulaires et le noyau indenté (pointes de flèches). B. A fort grossissement (détail de l'aire encadrée sur la photographie A), les boutons terminaux établissent des synapses symétriques (larges flèches) sur le corps cellulaire et sur une épine somatique. Quelques boutons ne contiennent que des vésicules petites et claires (étoile), alors que d'autres contiennent de plus larges granules (flèches incurvées). Barres de calibration : 1 μm .

Figure 42 : Détails à l'échelle ultrastructurale de fragments dendritiques du neurone représenté **figure 41**. A. Un des fragments est contacté par une terminaison nerveuse comportant des vésicules claires. L'existence d'une synapse est suggérée par le regroupement de vésicules pointé par une flèche. B. Sur un autre fragment dendritique, une telle formation est également observée (flèche), dans l'espace créé par deux épines dendritiques. Barres de calibration : 0,5 μm .



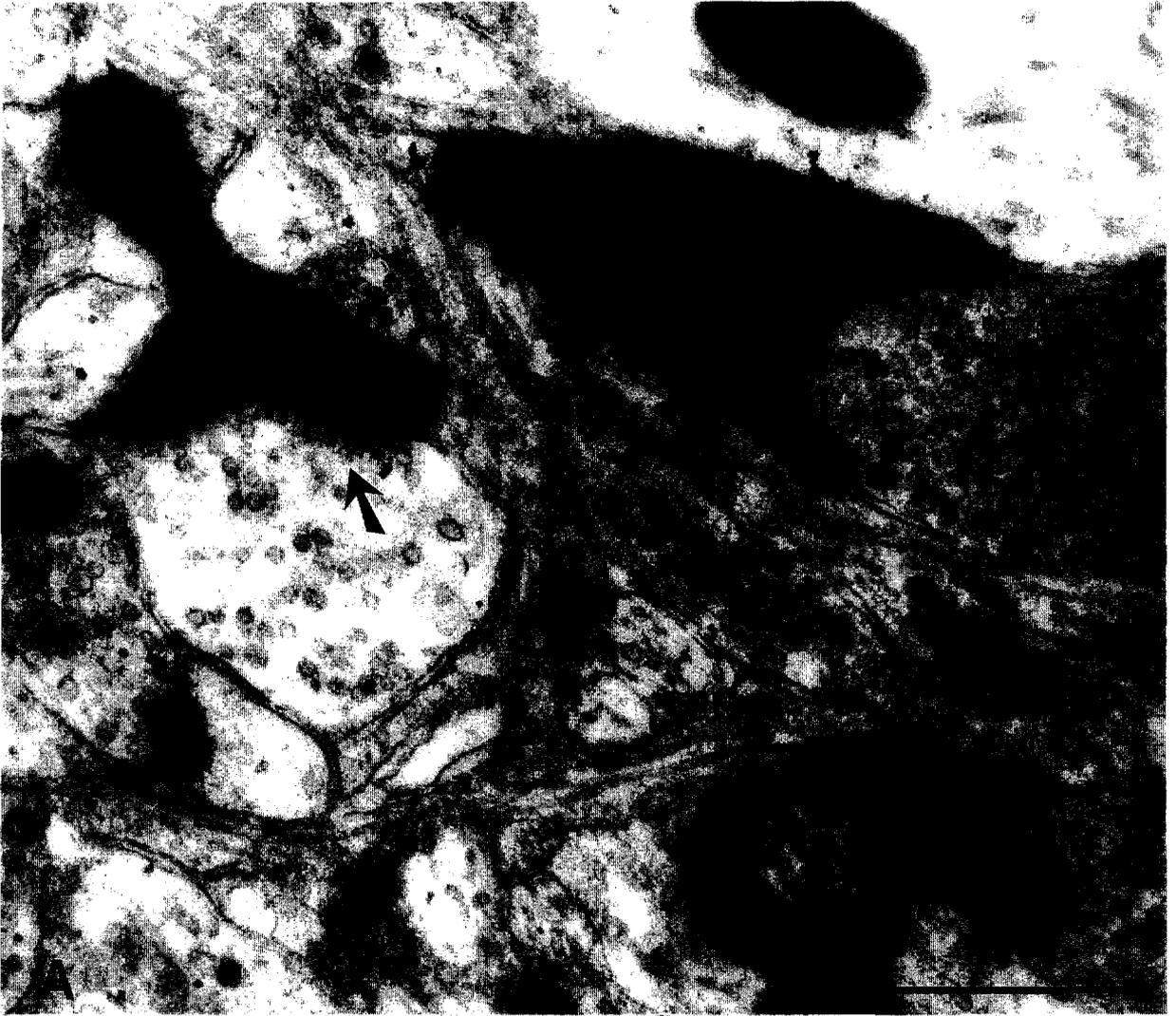
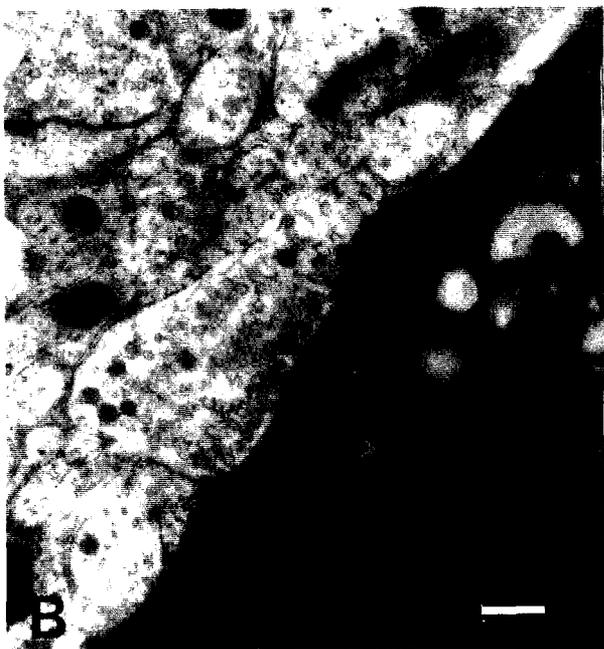


Figure 43 : Caractéristiques morphologiques à l'échelle ultrastructurale du neurone dessiné en **B** dans la **figure 40**, à faible grossissement (**A**), et détails à plus fort grossissement (**B**, **C**) des aires encadrées sur la photographie **A**. Une terminaison nerveuse comportant des petites vésicules claires et des granules denses est en contact avec le corps cellulaire (**B**). Une terminaison nerveuse recouvre une épine somatique (**C**). Barres de calibration : 1 μm .

Figure 44 : Caractéristiques morphologiques à l'échelle ultrastructurale d'un neurone injecté par la peroxydase, révélée par la technique au déoxyglucose. **A**. A faible grossissement, notez les organites cellulaires blancs noyés dans le fond hyaloplasmique noir. Barre de calibration: 1 μm . **B**. A fort grossissement une terminaison nerveuse est au contact de ce neurone. Notez que la conservation du tissu est beaucoup moins bonne que dans les exemples montrés dans les **figures 41-43**. Barre de calibration : 5 μm .



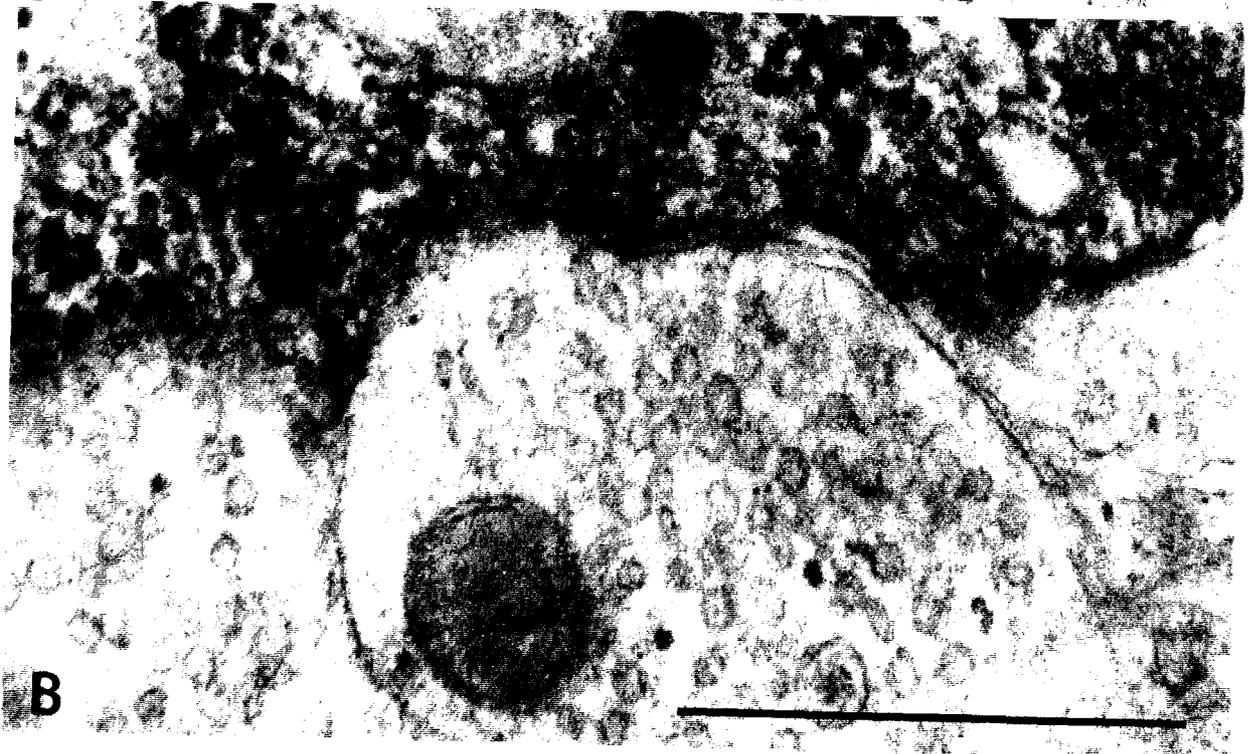
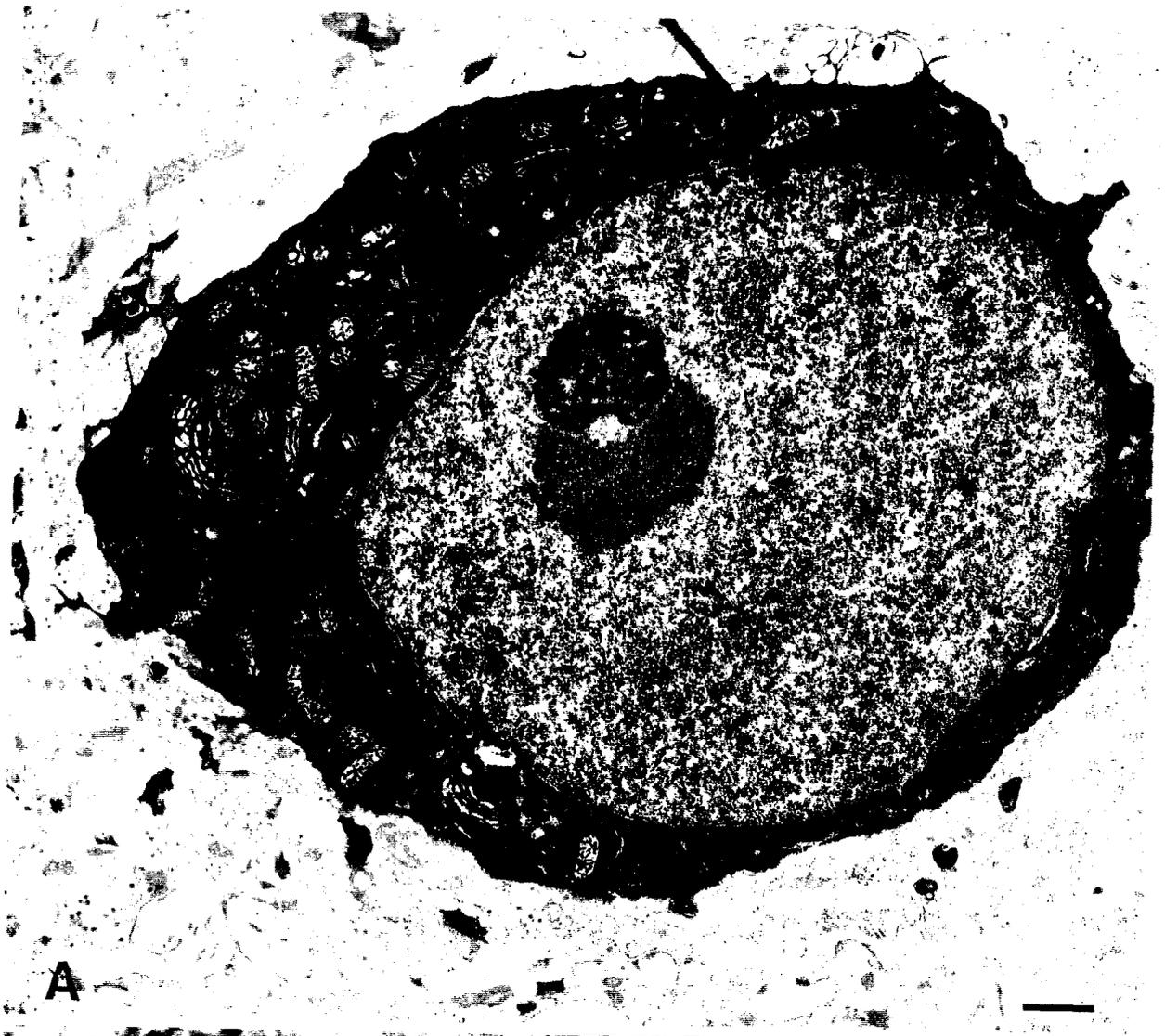
A



B



C



révélation de la peroxydase ne permette pas toujours de distinguer clairement la présence de synapses, il a été toutefois observé quelques contacts synaptiques symétriques sur le corps cellulaire de la cellule injectée (figure 41B). Ces contacts se distinguent par un net épaissement de la membrane post-synaptique (cellule injectée) et de la terminaison nerveuse. Dans quelques cas, lorsque le produit de réaction obtenu par la peroxydase est trop dense (figure 44B), l'existence de synapses est suggérée par la distribution particulière des vésicules dans les boutons. En effet, celles-ci sont regroupées à un pôle du bouton présynaptique (figure 42A, B).

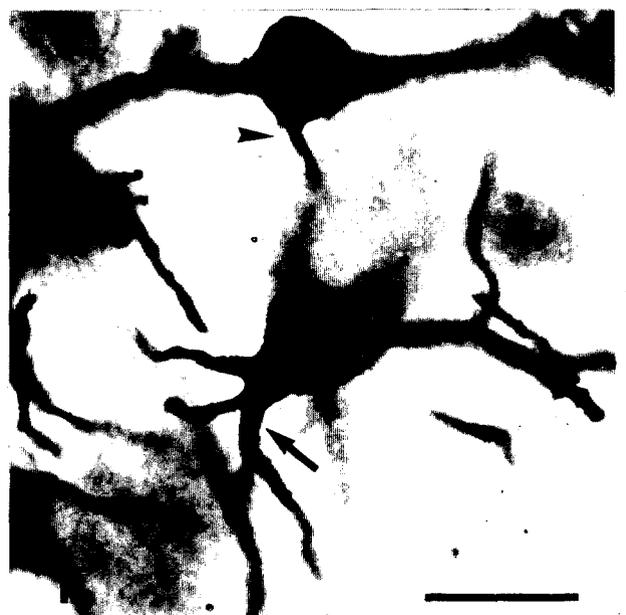
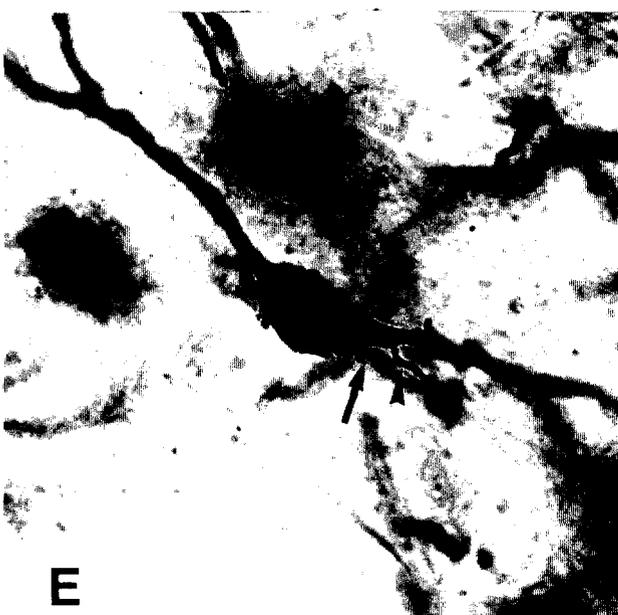
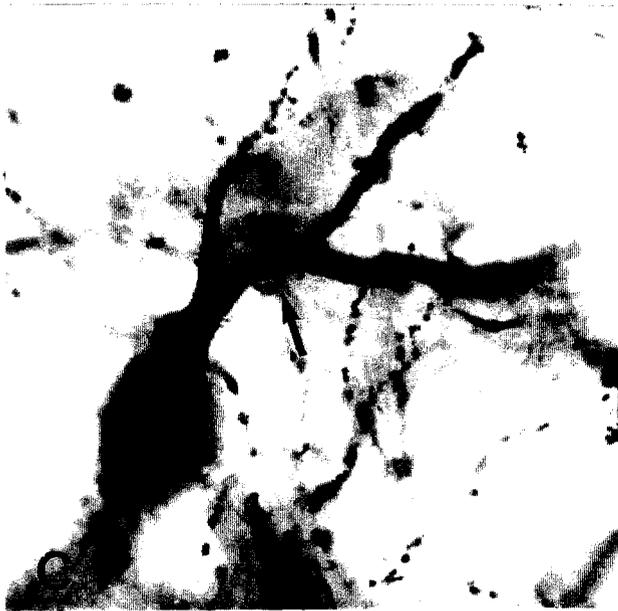
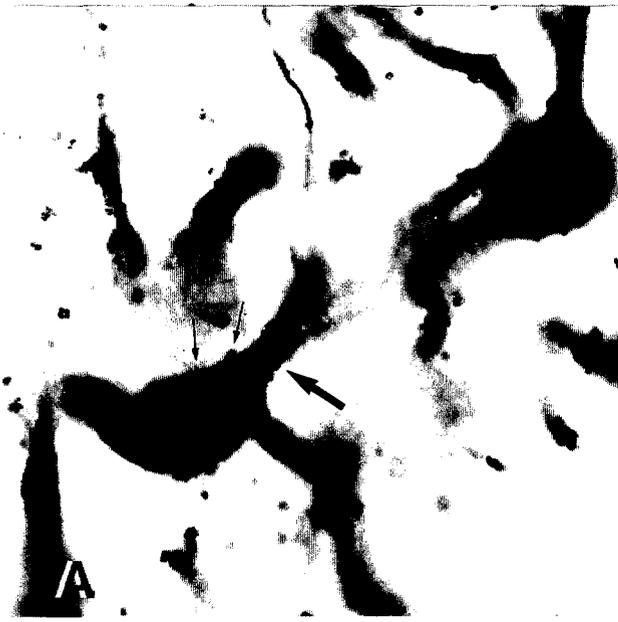
3 - Imprégnation argentique de Golgi

Il est possible que les injections intracellulaires ne soient obtenues qu'à partir de certains types de cellules qui se prêtent mieux que d'autres à l'empalement par la microélectrode. La technique d'imprégnation argentique de Golgi a été utilisée afin de vérifier quelle proportion représentent, dans le **SLml**, les neurones de grande taille pourvus de larges troncs dendritiques et les neurones présentant des épines somatiques. L'étude a été réalisée sur 5 cerveaux de cobayes femelles. Les trois cerveaux imprégnés selon la technique décrite par Tokuno et coll (1990) ont permis une analyse de qualité supérieure (figure 45), par rapport aux deux autres imprégnés selon la technique décrite par Doutrelant et coll (1992). En effet, les neurones sont plus densément marqués et l'absence de marquage de fond permet de mieux distinguer certains détails.

Le **SLml** contient une proportion importante de neurones de grande taille, représentant environ 80% de la totalité des neurones imprégnés. Des épines somatiques sont présentes sur environ 20% de la population neuronale marquée (figure 45A). Des troncs dendritiques élargis à la base sont observés en majorité sur les neurones de grande taille (figure 45A, B, C, E, F), mais également sur de plus petits neurones (figure 45D). Enfin, les épines dendritiques, qui constituent l'une des caractéristiques des neurones de grande taille, sont aussi abondantes et variées que celles observées sur les neurones injectés.

Ces données, volontairement succinctes, indiquent que les neurones décrits après l'injection intracellulaire de marqueurs n'appartiennent pas à des populations sélectivement marquées par ce type de technique, mais au contraire constituent un échantillon fiable des différents types cellulaires présents dans le **SL**.

Figure 45 : Neurones du SLml imprégnés selon la technique de Golgi en utilisant la technique décrite dans Doutrelant et coll, 1992 (A-D) et la technique de Tokuno et coll, 1990 (E, F) Notez que tous ces neurones présentent des dendrites primaires élargies à la base (grande flèche). A. Neurone de grande taille pourvus d'épines somatiques (petites flèches). B, C. Aspect pédonculé de neurones de grande taille. D. Neurone de petite taille présentant un tronc dendritique élargi. E. Exemple d'un neurone de grande taille, de forme ovoïde. F. Exemple d'un neurone de grande taille, globulaire. Les cônes d'émergence des axones sont apparents (pointe de flèche). Barre de calibration : 50 μ m.



III. Caractérisation immunocytochimique des neurones du septum latéral médio-latéral après enregistrement et injection intracellulaires

1 - Détection de terminaisons enképhalinerigiques au contact de neurones de classe A et C.

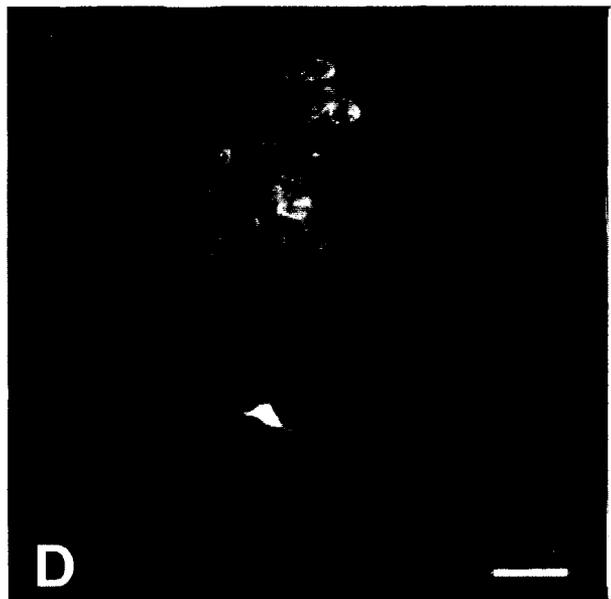
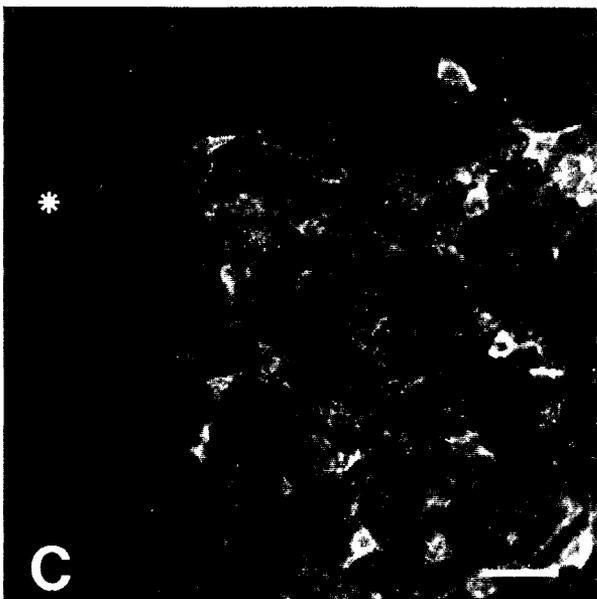
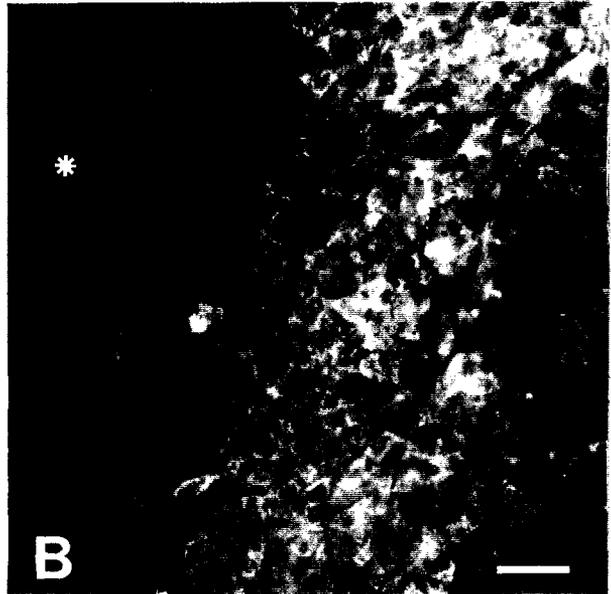
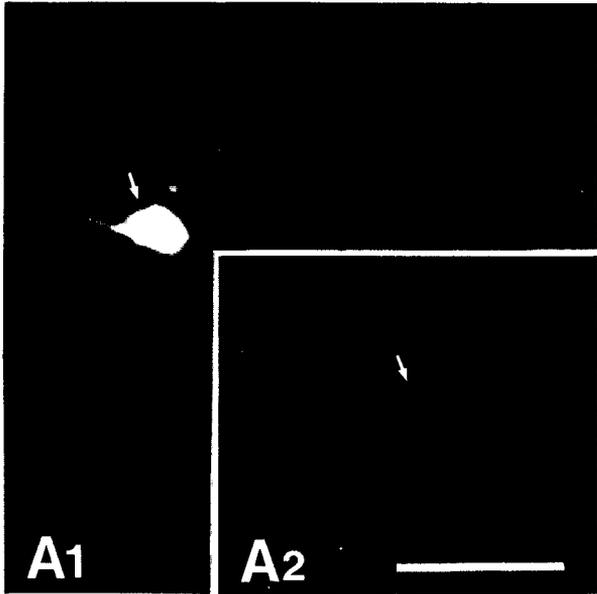
Cette étude a nécessité le couplage de trois techniques différentes : enregistrements électrophysiologiques, injections intracellulaires de marqueurs et marquage immunocytochimique. Les marqueurs intracellulaires utilisés ont été le LY et la biocytine.

1.1) Neurones injectés par le LY

Sur 5 neurones enregistrés et injectés par le LY, 1 appartient à la classe A et 1 à la classe C. Ce faible pourcentage de neurones identifiés et injectés est la conséquence de la résistance élevée des électrodes à LY, qui nuit à la qualité de l'enregistrement électrophysiologique et abaisse le taux de réussite des injections. Les cellules injectées par le LY sont des cellules de grande taille dont le corps cellulaire est ovoïde (n=4) ou triangulaire (n=1). Un exemple est représenté sur la figure 46A1. Deux à 3 dendrites primaires émergent du péricaryon et se ramifient rapidement en dendrites secondaires. De nombreuses épines dendritiques sont observées tout au long des prolongements dendritiques. L'axone est observé sur 4 cellules. Il prend naissance à partir du corps cellulaire (n=3) ou d'une dendrite primaire (n=1). Pour 3 cellules, l'axone est marqué sur une distance assez importante. Des collatérales axoniques, formant un plexus axonique dense, sont mêlées aux fragments dendritiques. Il est possible de suivre le parcours de ces trois axones et de constater qu'ils se dirigent vers la commissure blanche antérieure (n=2) ou vers le SLd (n=1). L'axone de la dernière cellule est marquée sur une trop faible distance pour pouvoir apprécier correctement son orientation.

Les terminaisons enképhalinerigiques autour des neurones injectés sont détectées par des anticorps secondaires couplés à la TRITC. Un seul de ces neurones est entouré par des terminaisons enképhalinerigiques (figure 46A2). Il est précisément localisé dans le **SLm1** et possède les propriétés électrophysiologiques des neurones de classe C.

Figure 46 : Détection simultanée de terminaisons met-enképhalinerigiques (Enk), révélées par le TRITC et de neurones du SLml enregistrés et injectés par le LY ou la biocytine. Coupes frontales. **A.** Neurone de classe C, injecté par le LY (**A1**) et entouré par les terminaisons met-enképhalinerigiques (**A2**). Observation en fluorescence. **B, C.** Observation en double exposition fluorescence/fond clair de neurones de classe A injectés par la biocytine, révélée par l'avidine-peroxydase (DAB), se situant dans la partie du SLml richement innervée par les fibres met-enképhalinerigiques. Notez en **B** la présence de deux neurones marqués suite à une seule injection de biocytine. Aucun de ces neurones n'est entouré par les terminaisons met-enképhalinerigiques. **D.** Neurone de classe A, injecté par la biocytine, révélé par l'avidine-FITC. Ce neurone est localisé à proximité du noyau stigmatique, reconnu par sa forte innervation met-enképhalinerigique. Le ventricule latéral, étoile, est à gauche. Barres de calibration : 50 μ m.



1.2) Neurones injectés par la biocytine

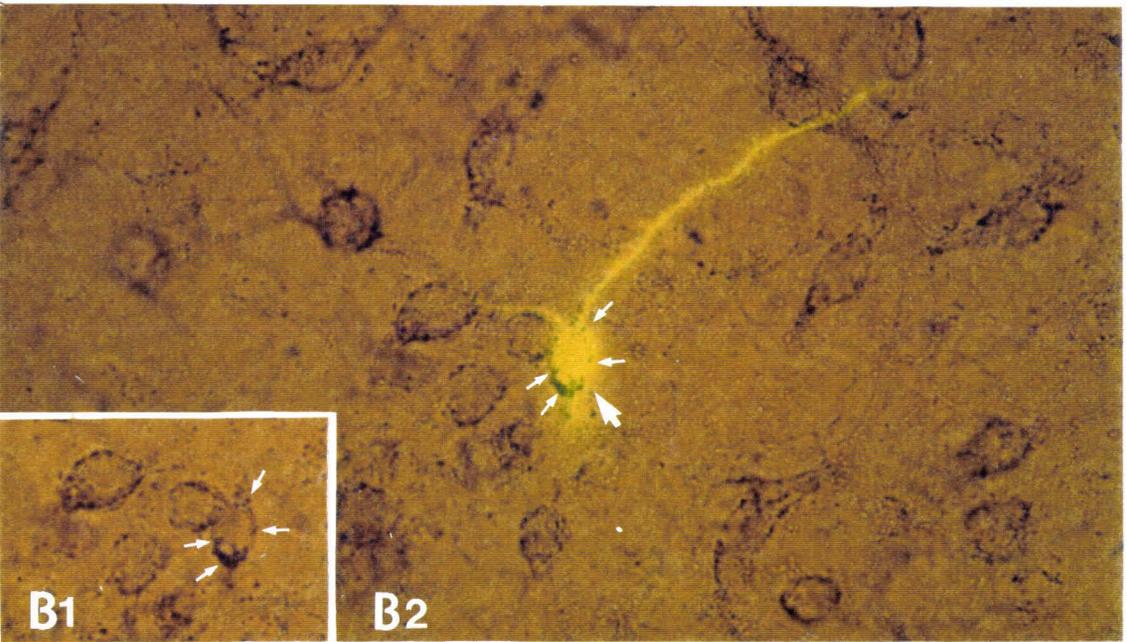
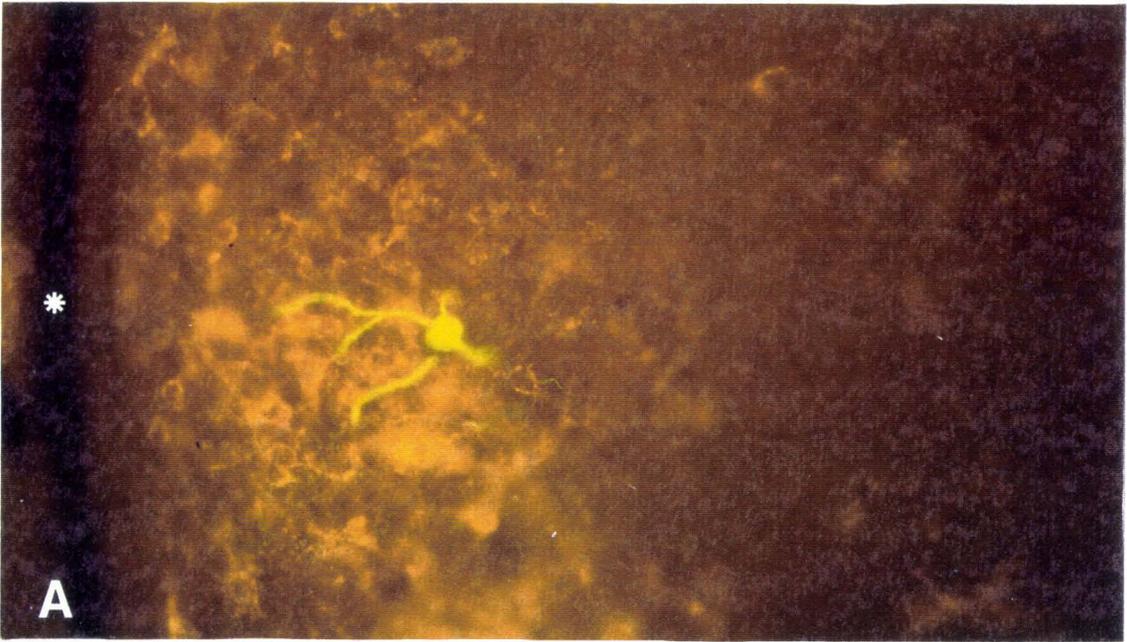
Etant donné les problèmes rencontrés par l'utilisation d'électrodes à LY, nous avons remplacé ce marqueur par la biocytine, ce qui a permis de réaliser une partie de l'étude morphologique décrite dans le paragraphe précédent. L'utilisation de cette substance s'est avérée fructueuse lorsqu'il a fallu réaliser des réactions immunocytochimiques complémentaires. Deux types de révélation ont été utilisés. Tout d'abord, la biocytine a été révélée par l'avidine-peroxydase (révélation par la DAB), alors que la met-enképhaline présente dans les terminaisons était détectée par des anticorps secondaires couplés à la FITC (figure 46B, C). Ce type de détection n'est pas très performant dans la mesure où il est difficile de distinguer nettement la présence de terminaisons au contact des neurones injectés. Cela est dû au produit de réaction obtenu au cours de la révélation de la peroxydase par la DAB, qui forme un précipité dense non compatible avec les techniques d'immunofluorescence.

Nous avons donc utilisé l'avidine couplée à la FITC (figures 46D, 47A,B1, 48A) pour mettre en évidence la biocytine et des anticorps secondaires couplés au TRITC (figures 46D, 47A) ou à la peroxydase (révélation par le chloro-naphtol : figures 47B1-2, 48B) pour révéler la met-enképhaline.

Le marquage immunocytochimique a été effectué sur 16 neurones enregistrés et injectés par la biocytine. Ces neurones, tous localisés dans le **SLml**, présentent les caractéristiques morphologiques des neurones de grande taille de la première sous-population. Neuf ont été identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques. Cinq appartiennent à la classe A et 4 à la classe C. Quatre d'entre eux possèdent des épines somatiques.

Les résultats obtenus après la réaction immunocytochimique indiquent que 2 neurones identifiés sont entourés par des fibres enképhalinergiques. Les terminaisons encapsulent complètement le neurone, entourant étroitement le corps cellulaire (figure 47B2). Ces deux neurones ont les propriétés électrophysiologiques des neurones de classe C et l'un d'entre eux possède des épines somatiques (figure 48B).

Figure 47 : Caractérisation immunocytochimique de neurones du SLml enregistrés et injectés par la biocytine, révélée par l'avidine-FITC. Coupes frontales. **A.** Neurone de classe A localisé dans la partie du SLml richement innervé par les fibres met-enképhalinergiques (révélation TRITC). Ce neurone n'est pas entouré par les terminaisons met-enképhalinergiques. **B, C.** Neurone de classe C soumis à une double réaction immunocytochimique dirigées contre la met-enképhaline, révélée par le chloro-naphtol et contre la calbindin-D28K (CaBP) révélée par le TRITC. **B1.** Observation en fond clair des arrangements périsonmatiques dont un encapsule le neurone injecté (petites flèches). **B2.** Double exposition fluorescence/fond clair montrant le neurone injecté entouré par les terminaisons nerveuses met-enképhalinergiques. **C.** Observation en fluorescence du même neurone, qui est IR-CaBP. Le ventricule latéral (étoile) est à gauche. Barre de calibration : 50 μm .

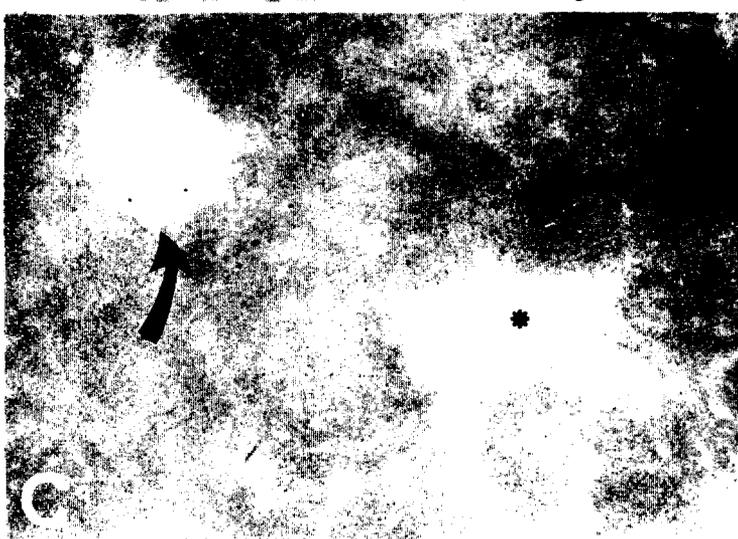
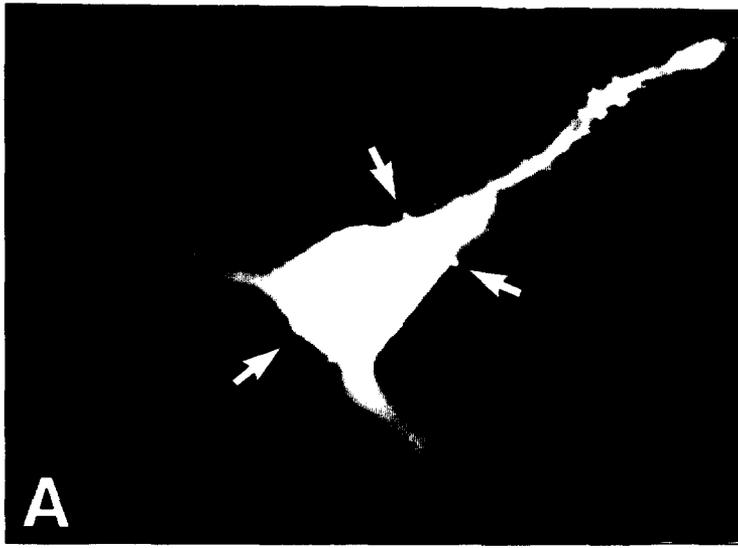


2 - Détection de la CaBP dans des neurones de classe A et C couplée à celle des terminaisons enképhalinerigiques

La détection immunocytochimique de la CaBP a été effectuée en parallèle avec la détection immunocytochimique des fibres enképhalinerigiques et porte donc sur les 16 neurones injectés par la biocytine et décrits précédemment. En conséquence, la biocytine est détectée par l'avidine-FITC, les fibres enképhalinerigiques sont révélées par le chloro-naphtol, et la CaBP est mis en évidence par des anticorps secondaires couplés à la TRITC. Trois neurones, parmi les 9 identifiés par leurs propriétés électrophysiologiques, sont immunoréactifs pour la CaBP. Deux neurones ont un corps cellulaire ovoïde et le dernier a un corps cellulaire triangulaire pourvu d'épines somatiques. Ces trois neurones présentent les caractéristiques électrophysiologiques des neurones de classe C.

Deux des 3 neurones immunoréactifs pour la CaBP sont la cible des terminaisons à enképhaline (figures 47C, 48C). Il s'agit des neurones dont les corps cellulaires sont ovoïde et triangulaire.

Figure 48 : Caractérisation immunocytochimique d'un neurone de classe C, injecté par la biocytine, révélée par l'avidine-FITC. Coupe frontale. Ce neurone est soumis à une double réaction immunocytochimique dirigée contre la met-enképhaline, révélée par le chloro-naphtol et contre la calbindin-D28K (CaBP) révélée par le TRITC. **A.** Observation en fluorescence de ce neurone de grande taille, présentant des épines somatiques (flèches). **B.** Double exposition fluorescence/fond clair révélant la présence des terminaisons met-enképhalinergiques (pointes de flèches), au contact du neurone injecté (étoile). **C.** Observation en fluorescence du même neurone, qui est IR-CaBP (étoile). Un autre neurone IR-CaBP est indiqué par la flèche incurvée. Barre de calibration : 25 μ m.



Discussion

I. Propriétés électrophysiologiques des neurones du septum latéral médio-latéral

L'étude électrophysiologique a permis de décrire dans le SLml trois classes de neurones dont les propriétés sont clairement distinctes.

1 - Neurones de classe A et de classe B

Le groupe prédominant de neurones, la classe A (59,2% du total), se caractérise par la genèse de PA calciques haut-seuil en milieu de perfusion normal. Pour les neurones de classe B (20,7% du total), les PA calciques ne sont observés que lorsque les canaux potassiques de la rectification retardée sont bloqués par du TEA.

En dépit de ces différences fondamentales, les neurones de classe A et de classe B présentent quelques propriétés en commun.

Premièrement, il est observé pour tous les neurones, une diminution rapide de l'amplitude des PA sodiques en réponse à des impulsions de courant dépolarisant de forte amplitude. Contrairement aux autres neurones du système nerveux central, la décharge tonique de PA sodiques de pleine amplitude est observée seulement lorsqu'est appliquée une impulsion de courant dépolarisant d'intensité faible ou modérée. Il s'agit d'une caractéristique des neurones du SL de cobaye, car elle n'a été reportée jusqu'à lors que pour les neurones du SLd dans la même espèce (Lopez-Barneo et coll, 1985 ; Alvarez de Toledo et Lopez-Barneo, 1988). La réduction d'amplitude du PA sodique est due, soit à l'activation d'une conductance de repolarisation, soit à l'inactivation d'une conductance sodique. C'est cette seconde possibilité qui doit être retenue à la lueur des travaux réalisés en patch-clamp sur des neurones du SL de cobaye en culture par Castellano et Lopez-Barneo (1991). Ces auteurs montrent que le processus d'inactivation du canal sodique comprend une composante rapide qui récupère excessivement lentement, de plus en plus lentement lorsque la membrane est dépolarisée. Cela explique que dans un train de PA évoqués par une dépolarisation de forte intensité, l'amplitude des PA est réduite en raison de la réduction des canaux sodiques disponibles.

Deuxièmement, pour les neurones de classe A et pour quelques neurones de classe B, nos observations ont clairement démontré que les conductances calciques étaient fortement impliqués dans les PA lors de l'application d'une impulsion dépolarisante de forte amplitude. L'intervention du Ca^{++} vient de la sorte compenser le phénomène d'inactivation sodique qui caractérise les neurones. Les PA obtenus par l'intervention combinée des flux entrants de sodium et de Ca^{++} (PA sodico-calciques) sont représentés par des événements plus petits et plus larges que les PA de pleine amplitude, qui apparaissent au cours d'une stimulation liminaire, ou en premier au cours d'une stimulation de forte intensité. La genèse de PA sodico-calciques met en jeu au moins deux phénomènes. D'une part, l'inactivation sodique conduit à une diminution de la vitesse de dépolarisation des PA et à une augmentation de leur durée. Il peut être spéculé, comme le suggèrent Lopez-Barneo et coll (1985), que ces effets favorisent l'entrée de Ca^{++} dans la cellule. D'autre part, comme nous l'avons démontré dans cette étude, les PA sodico-calciques sont suivis par des AHP dépendant du Ca^{++} . Les AHP pourraient servir à dé-inactiver les conductances sodiques, permettant ainsi aux canaux sodiques de participer au PA suivants (Barrett et Barrett, 1976 ; Galarraga et coll, 1989). Dans nos expériences, les degrés variables d'interaction entre la participation des courants calciques et l'inactivation sodique entraînent différents types de réponses aux impulsions de courant dépolarisant. Cette variété des types de décharge est plus frappante dans le cas des neurones de classe A. En milieu normal, ces neurones présentent, en plus des PA sodico-calciques, des PA purement calciques qui apparaissent dans le train de PA déclenché par une impulsion dépolarisante de forte amplitude et de longue durée.

Troisièmement, presque tous les neurones présentent une rectification anormale en réponse à une impulsion hyperpolarisante. Les caractéristiques de cette rectification l'apparentent à une rectification anormale dépendant du temps. Elle est bloquée par du Cs^+ extracellulaire mais non par le Ba^{++} , suggérant ainsi l'implication de courants K^+/Na^+ (Halliwell et Adams, 1982).

Quatrièmement, quelques neurones des deux classes présentent une rectification transitoire sortante. Dans nos expériences, la 4-AP n'altère pas cette rectification, contrairement à ce qui est observé dans d'autres préparations (Rudy, 1988).

L'étude détaillée des propriétés électrophysiologiques des neurones du SLd de cobaye (Lopez-Barneo et coll, 1985 ; Alvarez de Toledo et Lopez-Barneo, 1988), a permis d'individualiser un groupe de neurones ressemblant

aux neurones de classe A décrits dans notre étude. De même, les quelques neurones enregistrés dans le **SLml** du cobaye par ces auteurs présentent le même type de décharge. Nous démontrons que le groupe prédominant de neurones dans le **SLml** appartient à la classe A. Nous pouvons suggérer que la majorité des neurones du **SL** de cobaye ont des propriétés électrophysiologiques semblables, qu'ils soient localisés dans le **SLd** ou dans le **SLml**. Néanmoins, nos enregistrements dans le **SLml** se caractérisent par la présence des neurones de classe B, qui ne sont pas observés par Lopez-Barneo et coll (1985) et par Alvarez de Toledo et Lopez-Barneo (1988). De plus, certaines propriétés électrophysiologiques distinctes n'ont pas été reportées par ces auteurs telles que les rectifications transitoires sortantes et les décharges du type "olive inférieure" (Llinas et Yarom, 1981).

Il est à noter que, dans le **SLd** du rat, les propriétés intrinsèques des neurones semblent différentes ; notons, l'absence de courants calciques haut-seuil en milieu normal, l'absence d'inactivation sodique, l'absence de rectification anormale, mais la présence d'un courant calcique bas-seuil (Stevens et coll, 1984), courant qui n'existe pas dans les neurones du **SLml**.

2 - Neurones de classe C

La troisième classe de neurones, les neurones de classe C, correspond à 20,1% de la population totale des neurones enregistrés dans le **SLml**. Lopez-Barneo et coll (1985) ont obtenu dans le **SLd** du cobaye des enregistrements qui ressemblent fortement à ceux des neurones de classe C (voir leurs figures 2 C, D). Ce type d'enregistrement n'a pas été mis en évidence dans le **SL** du rat et représente une autre caractéristique des neurones du **SL** de cobaye. Les neurones de classe C montrent deux types distincts de PA : 1) des PA sodiques de courte durée et de très faible amplitude, 2) des PA calciques, de longue durée et de forte amplitude.

L'observation de PA sodiques de faible amplitude est généralement attribuée à un enregistrement de qualité médiocre. Or, dans notre étude, plusieurs arguments vont à l'encontre de cette possibilité. En effet, le bon empalement des neurones de classe C se vérifie par la présence de potentiels de repos élevés et stables, de rectifications anormales franches, cette dernière propriété traduisant le bon état du neurone (Mostfeldt-Laursen et Rekling, 1989). De plus, il n'est pas noté de dépôt extracellulaire de peroxydase autour de la cellule lorsque celle ci est injectée, ce qui serait l'indice d'une lésion par la microélectrode. La survenue de ces petits PA sodiques dans des neurones

non lésés pose alors le problème du site d'enregistrement. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- il est possible que les enregistrements des neurones de classe C soient réalisés au niveau de la dendrite. Deux arguments électrophysiologiques sont en faveur de cette première hypothèse. *Premièrement*, les petits PA sodiques sont suivis par des PA calciques à composants multiples. Or, il est connu que les dendrites offrent des sites multiples pour la genèse d'événements calciques unitaires, qui s'additionnent pour produire de larges PA calciques (Llinas et Nicholson, 1971). *Deuxièmement*, pour un tiers des neurones, des potentiels dépolarisants lents dépendants du Ca^{++} sont enregistrés et peuvent être comparés aux plateaux observés lors d'enregistrements intradendritiques (Llinas et Sugimori, 1980 ; Masukawa et Prince, 1984). Si l'hypothèse des enregistrements dendritiques se révèle exacte, les petits PA sodiques enregistrés dans ces neurones correspondraient à des PA émis au niveau de la région axo-somatique et conduits passivement dans les dendrites, en perdant leur amplitude.

- une autre possibilité est que les enregistrements des neurones de classe C soient réalisés à la jonction du corps cellulaire et de la dendrite primaire. Cette explication a été suggérée par Castellano et Coll (1991) pour expliquer les enregistrements obtenus dans le SLd par Lopez-Barneo et coll (1985). Il est établi que la base des dendrites des neurones peuvent contenir une forte concentration de canaux calciques, tel est le cas des neurones de l'hippocampe (Westenbroek et coll, 1990).

- pour la troisième et dernière hypothèse, moins probable car elle n'est pas supportée par les données de la littérature, nous pourrions considérer que les enregistrements des neurones de classe C soient réalisés au niveau du corps cellulaire. Dans ce cas, l'amplitude relative des PA sodiques et calciques pourrait refléter une localisation spécifique des canaux sodiques et des canaux calciques haut-seuil au niveau du corps cellulaire.

En résumé, les données originales provenant de cette étude électrophysiologique, focalisée sur le **SLml** du cobaye, montrent l'existence de trois populations cellulaires distinctes par leurs propriétés intrinsèques. Les neurones de classe A et de classe C représentent la majorité. Leurs profils électrophysiologiques les apparentent aux neurones du SLd de cobaye. Les neurones de classe B ont des caractéristiques électrophysiologiques distinctes de celles des neurones de classe A et de classe C et n'ont pas été observés dans le SLd du cobaye.

II. Caractéristiques morphologiques des neurones du septum latéral médio-latéral

1 - Considérations méthodologiques

1.1) Injections intracellulaires

Dans cette étude, la peroxydase fût dans un premier temps choisie comme marqueur intracellulaire, car cette substance donne des images très exploitables au microscope optique, avec une résolution comparable à celle obtenue après une imprégnation argentique. Le produit de réaction est dense aux électrons et permet une exploration des détails morphologiques à l'échelle du microscope électronique. Pour l'étude ultrastructurale, les techniques de révélation se sont révélées essentielles. La technique de révélation de Metz et coll (1989) qui est idéale pour la microscopie optique, car elle supprime le marquage peroxydasique endogène des hématies, n'est pas applicable en microscopie électronique. Il s'avère que le traitement aux alcools, inclus dans cette technique, occasionne une détérioration du tissu. La technique au déoxyglucose (Itoh et coll, 1979) donne en microscopie électronique des images surprenantes. Les organites des cellules injectées sont particulièrement bien visibles, ils apparaissent blancs sur le fond hyaloplasmique noir. Néanmoins, l'observation à des grossissements plus importants révèle une conservation du tissu imparfaite, qui empêche de distinguer précisément les contours membranaires de la cellule ainsi que les contacts synaptiques. Les techniques d'Adams (1977) et d'Hanker-Yates et coll (1977) donnent des résultats excellents tant à l'échelle du microscope optique que du microscope électronique et ont donc été principalement utilisées au cours de notre étude.

Comme le but de l'étude est d'associer les données morphologiques aux enregistrements électrophysiologiques, il est indispensable de s'assurer que la présence de peroxydase dans la microélectrode ne modifie pas les propriétés électriques du neurone enregistré. Nos expériences ont été réalisées alternativement avec des microélectrodes remplies de KCl 3M, d'acétate de potassium 3M, ou de peroxydase. Les trois types de décharges caractéristiques ont été observés dans chacun des cas et dans les mêmes proportions. Un autre écueil souvent signalé à propos de l'utilisation de la peroxydase pour de telles études est la nécessité de biseauter les microélectrodes afin de réduire leur résistance. Ce procédé conduit à augmenter la taille des pointes et à détériorer la membrane lors de l'empalement du neurone. Dans nos expériences, les

paramètres d'étirement ont été rigoureusement ajustés pour obtenir des microélectrodes fines, dont la résistance permettait toutefois une éjection iontophorétique correcte de la peroxydase sans qu'il soit nécessaire de biseauter les pointes.

L'utilisation de la biocytine correspond à un besoin différent : coupler une détection immunocytochimique à la caractérisation électrophysiologique et morphologique. Ce marqueur provient de la conjugaison d'une molécule de biotine avec la lysine. Sa haute solubilité dans des solutions aqueuses, sa facilité d'éjection à partir de microélectrodes non biseautées, ainsi que sa très forte affinité pour l'avidine, en font donc un marqueur intracellulaire de choix (Horikawa et Armstrong, 1988). Les injections intracellulaires réalisées avec la biocytine donnent des bonnes images en microscopie optique et électronique. Il faut noter cependant que certains détails, tels les épines dendritiques, sont plus distincts sur des neurones injectés par la peroxydase que par la biocytine. En ce qui concerne l'axone, aucune différence notable n'a été remarquée entre les deux substances. Enfin, il a été démontré que l'utilisation de la biocytine n'altérait en aucun cas les propriétés électrophysiologiques des neurones enregistrés en intracellulaire (Tseng et coll, 1991).

1.2) Imprégnations argentiques

Pour visualiser l'ensemble des différents types des neurones existant dans le SL, la méthode d'imprégnation argentique de Golgi semblait la plus adéquate. Nous avons donc utilisé dans un premier temps la technique de Mac Mullen et Almlı (1981). L'inconvénient de cette technique est de donner beaucoup de fond, ce qui gêne quelque peu les observations. Pour pallier à ce désavantage, nous avons utilisé une autre technique (Tokuno, 1990), qui supprime le marquage de fond et qui imprègne parfaitement bien les neurones. Shimono et Tsuji (1987) ont montré que la technique d'imprégnation argentique était non sélective au sein d'une même région. Nous supposons donc que tous les types cellulaires présents dans la région étudiée ont été imprégnés.

2 - Caractéristiques somatodendritiques

Chez le rat, diverses techniques de marquages telles que les colorations de Nissl (Swanson et Cowan, 1979), des techniques d'imprégnation argentique de Golgi (Brauer et coll, 1988 ; Alonso et Frotscher, 1989a, b ; Jakab et

Leranth, 1990a) et des techniques d'injection intracellulaire de peroxydase (Phelan et coll, 1989a, b) ou de LY (Twery et coll, 1992 ; Phelan et coll, 1993) ont apporté une description des différents types cellulaires présents dans le SL.

La présente étude décrit pour la première fois, chez le cobaye, les caractéristiques morphologiques des neurones du SL_{MI} injectés par la peroxydase ou la biocytine. Bien que ces neurones ne soient pas complètement identiques quant à leurs caractéristiques somatodendritiques ou par l'orientation de leur arbre dendritique, un type cellulaire prédominant apparaît cependant. En effet, un groupe relativement homogène de neurones se caractérise par un corps cellulaire de grande taille, des dendrites primaires présentant une base élargie et de nombreuses épines dendritiques. La comparaison de ce type de cellule avec ceux décrits par Alonso et Frotscher (1989a), dans leur étude des neurones du SL imprégnés par la technique de Golgi, indique un grand nombre de similitudes. Les cellules décrites dans notre étude ressemblent aux cellules de type II localisées dans le SL_I par leur corps cellulaire, rond ou triangulaire, par la variabilité de la longueur, de l'orientation des dendrites et par la présence d'épines dendritiques et somatiques en nombre variable. De plus, dans notre étude, d'autres cellules de grande ou de petite taille ressemblent également aux cellules décrites dans le SL_V par les mêmes auteurs.

La présence de troncs dendritiques élargis à la base constitue la caractéristique la plus frappante des cellules injectées. Des neurones présentant cette particularité ont été observés dans le SL suite au transport antérograde de *Phaseolus-vulgaris* (Staiger et Nürnberger, 1991b) et dans le SL_D après des injections intracellulaires de peroxydase ou de LY (Phelan et coll, 1989a, b, 1993 ; Twery et coll, 1992). Cette particularité n'a pas été mise en relief dans l'étude d'Alonso et Frotscher (1989a). La présence d'épaississements dendritiques sur un nombre relativement important de neurones pourrait être spécifique au cobaye. Cette hypothèse est corroborée par nos observations réalisées sur des coupes de SL imprégnées par la technique de Golgi. Nous y retrouvons, en effet, un nombre important de neurones pourvus de troncs dendritique élargis à la base.

En ce qui concerne l'orientation du champ dendritique des cellules injectées, il est intéressant de noter l'abondance de neurones ayant un contour dendritique sphérique (n=13). Ce type de neurones est rencontré principalement dans le noyau dorsal cochléaire du rat (Wouterlood et Mugnaini, 1984) et de la souris (Oertel et Wu, 1989), où il présente un corps

cellulaire rond d'où des dendrites primaires épaissies émergent et se subdivisent en dendrites d'ordre supérieur. Ces cellules, ayant un aspect "en roue de charrette" ("cartwheel cells"), sont supposées être des interneurons GABAergiques (Wouterlood et Mugnaini, 1984). Des observations réalisées dans le SL du cobaye (Beauvillain et coll, 1991) et du rat (Jakab et Leranth, 1990b) montrent que les neurones GABAergiques ont un contour sphérique. Sur des bases purement morphologiques, ces données nous laissent supposer que les neurones injectés présentant un aspect "en roue de charrette" puissent correspondre à des neurones GABAergiques.

Il est à noter que l'une des cellules injectées présente une orientation de ses dendrites tout à fait typique qui la fait ressembler ainsi aux cellules "pieuvres" décrites dans le noyau cochléaire du chat (Osen, 1969 ; Willott et Bross, 1990). Ce type cellulaire a également été décrit dans le SL par Alonso et Frotscher (1989a) et dans le SLd par Staiger et Nürnberger (1991b).

Enfin, les épines dendritiques constituent l'une des caractéristiques majeure des neurones étudiés. Elles ont, depuis la première description faite par Ramon y Cajal (1909), été observées en nombre plus ou moins important sur les neurones du SL de différentes espèces (Raisman, 1969 ; Dornig et coll, 1976 ; Brauer et coll, 1988 ; Alonso et Frotscher, 1989a, b). La signification fonctionnelle des épines dendritiques, en tant que structures cibles post-synaptiques d'axones provenant de l'hippocampe, a été suggéré par Leranth et Frotscher (1989). De nombreuses études, plus théoriques, se sont intéressées au rôle "d'amplificateur de signaux" joué par ces épines, ainsi qu'à leur intervention dans la plasticité synaptique. Les épines dendritiques pourraient jouer un rôle non négligeable dans l'augmentation de l'efficacité synaptique, par la présence de canaux calciques voltage-dépendants, et constitueraient une voie supplémentaire pour les échanges intercellulaires de métabolites et de composants membranaires (revue dans Calverley et Jones, 1990 ; Baer et Rinzel, 1991).

3 - Caractéristiques de l'axone

Le marquage intracellulaire de neurones présente certains avantages par rapport aux techniques d'imprégnation argentique de Golgi, dans le sens où il permet un marquage de l'axone de meilleure qualité. Cependant, l'inconvénient majeur de l'utilisation de tranches de cerveau est de ne pas pouvoir reconstruire, à l'aide de la chambre claire, la totalité de l'axone. Dans cette étude, quelques axones ont été marqués sur une assez longue distance,

suffisante pour nous renseigner sur leur orientation. Il s'avère que les axones des neurones du **SLml** sont orientés principalement vers la commissure antérieure, le **SM** et le **SLd**. Des études récentes relatant les orientations préférentielles des neurones du **SL** indiquent que les neurones du **SLml** projettent massivement vers l'hypothalamus et les **bdB**, alors que les projections vers le **SM** sont faibles, comme cela a été détaillé précédemment (voir dans Rappels Bibliographiques p 6). Nos observations sont donc en accord avec la démonstration de l'existence d'un trajet descendant ventral pour les neurones du **SLml**. Dans notre étude, quelques axones semblent se projeter vers le **SM**, mais comme il n'est pas possible de suivre leur trajet sur une longue distance, il n'est pas impossible qu'ils adoptent une trajectoire plus ventrale après incurvation, comme cela est clairement observé pour certains neurones injectés. Les neurones décrits dans notre étude présentent en plus d'un axone de projection, de nombreuses collatérales axoniques bien développées qui forment des réseaux denses caractérisés par de nombreux "boutons en passant". Ces réseaux établissent probablement des contacts synaptiques avec des neurones voisins. Cette observation est à mettre en relation avec l'exemple du neurone injecté par la peroxydase dans le **SLd** (Phelan et coll, 1989a), qui se caractérise par une arborisation axonique particulièrement bien développée à proximité du corps cellulaire. A l'instar de ce neurone du **SLd**, les neurones du **SLml** pourraient non seulement se projeter vers diverses régions du cerveau, mais en plus contrôler l'activité de neurones du **SL** par leurs réseaux de collatérales.

4 - Neurones à épines somatiques

A l'échelle du microscope optique, chez le rat, les épines somatiques sont observées sur 20% des neurones imprégnés selon la technique de Golgi (Jakab et Leranthy, 1990a). A la même échelle, lors de notre étude, nous avons observé des épines somatiques sur 6 des 36 cellules injectées. L'étude des neurones imprégnés par la technique d'imprégnation argentique de Golgi a révélé une proportion identique de neurones à épines somatiques. Il n'est pas à exclure que la présence de petites épines somatiques puisse échapper à l'observation au microscope optique. Cette supposition est vérifiée car, à l'échelle du microscope électronique, six cellules sur sept possèdent des épines somatiques. Ces résultats démontrent que des neurones à épines somatiques sont abondants dans le **SLml** de cobaye.

Nous n'avons pas observé de différences fondamentales entre les neurones présentant des épines somatiques et ceux qui en sont démunis, tant du point de vue des caractéristiques somatodendritiques que de l'axone. Il est intéressant de noter que Jakab et Leranath (1990a) ont décrit une orientation dorso-ventrale du champ dendritique, alors que nos résultats sont plutôt en faveur d'un contour dendritique plutôt sphérique et conique.

5 - Observations ultrastructurales

L'observation à l'échelle du microscope électronique de 7 neurones marqués par la peroxydase a donné des informations concernant leur ultrastructure et a permis la description des terminaisons nerveuses trouvées au contact des éléments marqués. Les cellules injectées présentent des caractéristiques morphologiques semblables à celles des neurones GABAergiques décrits chez le cobaye (Beauvillain et coll, 1991) et à celles des neurones à épines somatiques décrits dans le SLml du rat (Jakab et Leranath, 1990a) : elles présentent des épines somatiques, un noyau indented, un réticulum endoplasmique rugueux dispersé au sein de la cellule et des mitochondries à proximité du noyau. Nous avons observé des terminaisons non-marquées établissant des synapses symétriques avec les neurones injectés. Cette constatation ne retire rien au fait qu'il puisse également exister des synapses de type assymétriques, observées par ailleurs dans le SL de cobaye (Beauvillain et coll, 1983, 1991) et dans le SLml de rat (Jakab et Leranath, 1990a). Quelques boutons, en apposition directe avec les éléments injectés, contiennent exclusivement des petites vésicules claires qui pourraient correspondre à des terminaisons nerveuses GABAergiques, comme cela a été observé dans le SL du cobaye (Beauvillain et coll, 1991) et dans le SLml du rat (Jakab et Leranath, 1990b). D'autres boutons contiennent en plus des granules plus larges. Dans le SL du cobaye, les enképhalines ont été détectées dans ce genre de terminaisons (Beauvillain et coll, 1991). Il reste désormais à clarifier la nature chimique des boutons observés ici, mais il est hautement probable que les neurones à épines somatiques sont la cible des afférences enképhalinergiques provenant du NMD.

6 - Corrélation entre propriétés électrophysiologiques et caractéristiques morphologiques

Notre étude comparative a porté sur les neurones de classe A et de classe C, étant donné que les neurones de classe B, en nombre plus réduit, ne se prêtent pas à une identification individuelle après l'injection intracellulaire. Trois conclusions peuvent être tirées de nos résultats :

- la morphologie des neurones du **SLml** révèle un type prédominant de neurones de grande taille possédant des caractéristiques précises. Il apparaît que les neurones de classe A et de classe C se répartissent indifféremment dans ce groupe décrit sur des critères morphologiques. Cela signifie que la morphologie des neurones de classe A est semblable à celle des neurones de classe C. Les neurones de plus petite taille, qui constituent un groupe distinct de faible effectif, possèdent également les propriétés électriques des neurones de classe A ou de classe C.

- d'après les remarques précédentes, il peut être suggéré que les propriétés électrophysiologiques différentes des deux classes reflètent davantage des enregistrements réalisés à différents niveaux de la cellule plutôt que des enregistrements réalisés sur des cellules de types différents. Les neurones de classe A seraient des neurones où les enregistrements ont été réalisés au niveau du péricaryon, alors que pour les neurones de classe C, les enregistrements auraient été effectués au niveau des dendrites ou à la jonction somato-dendritique. Cette suggestion est en accord avec les données morphologiques concernant le nombre particulièrement important de neurones pourvus de troncs dendritiques élargis à la base. Ces élargissements pourraient représenter des sites préférentiels pour des pénétrations intradendritiques. Or, il existe cependant quelques neurones de classe C dépourvus de troncs dendritiques épais. Une explication de ce phénomène serait que l'élargissement de la dendrite primaire ne soit pas toujours visible sur nos préparations, selon le plan de coupe.

- Enfin, sur l'ensemble des neurones présentant des épines somatiques, observés au niveau du microscope optique et électronique, 8 appartiennent à la classe A et un à la classe C. Ces données suggèrent fortement que ce type de neurones ne possède pas des propriétés morphologiques et électriques différentes de celles des autres neurones du **SLml**.

En résumé, cette étude morphologique couplée à une caractérisation électrophysiologique nous a permis d'individualiser, dans le **SLml**, deux

populations de neurones. L'explication des enregistrements de classe A et C, qui sont fondamentalement différents par les types de décharges, peut être trouvée dans le fait que ces enregistrements soient réalisés à des emplacements différents pour les mêmes neurones. Les neurones à épines somatiques, bien que peu nombreux (16,6% du total), ne constituent pas un groupe à part. Ils sont indifféremment observés dans les deux types de populations. De même, ils n'appartiennent pas préférentiellement à l'une ou l'autre des classes électrophysiologiques décrites dans cette étude.

III. Caractérisation immunocytochimique de neurones du septum latéral médio-latéral après identification électrophysiologique et injection intracellulaire

Le couplage de trois techniques, électrophysiologie, marquage intracellulaire et détection immunocytochimique de la nature du neurone injecté, ainsi que de ses afférences, a nécessité l'emploi d'un marqueur intracellulaire adéquat. La peroxydase, bien que donnant des images exploitables aux microscopes optique et électronique, ne peut convenir pour révéler, par des techniques immunocytochimiques, ni le contenu du neurone, ni la nature de ses afférences, à cause du précipité obtenu après la réaction histochimique. Le LY permet de réaliser plus facilement ce type de techniques. Bien que le marquage soit compatible avec des techniques utilisant l'immunofluorescence (Reaves et Hayward, 1979) ou l'immunoperoxydase (Smithson et coll, 1984), nous avons rapidement abandonné ce marqueur au profit de la biocytine. La biocytine s'est révélée être le marqueur de choix pour ce type d'étude. Sa révélation avec de l'avidine couplé à la FITC ou la TRITC a permis de visualiser facilement les afférences au contact du neurone injecté ainsi que de déterminer sa nature chimique.

Les résultats de ce travail démontrent que dans le SLml, des neurones présentant des propriétés électrophysiologiques semblables peuvent être distingués par la présence ou par l'absence de CaBP. La présence de CaBP dans un neurone a été parfois liée à un type de décharge donné. Par exemple, différents types de neurones, présentant des potentiels d'action calciques haut-seuil, ont été signalés comme contenant la CaBP (Baimbridge et coll, 1992). Il est clairement établi que la CaBP intervient dans la régulation des taux de Ca^{++} intracellulaire, ainsi que dans la modulation des flux d'ions Ca^{++} des

compartiments extracellulaires vers les compartiments intracellulaires, par une action sur des canaux dépendants du voltage (Köhr et coll, 1991). Néanmoins, l'expression de PA calciques ne nécessite pas forcément la présence de CaBP dans la cellule. Nos résultats sont en accord avec cette donnée, car ils montrent que les neurones identifiés sur le plan électrophysiologique comme possédant des propriétés électriques semblables contiennent ou non la CaBP. La détection de CaBP dans un neurone pourrait toutefois être le signe d'une intense activité métabolique, liée au besoin pour le neurone de répondre à des augmentations des concentrations de Ca^{++} intracellulaire qui surviennent en réponse à une activation soutenue de récepteurs conduisant à une entrée massive de Ca^{++} . Il est connu que les agonistes des acides aminés excitateurs, appliqués expérimentalement à forte dose, ont une action neurotoxique par l'augmentation de la concentration en Ca^{++} intracellulaire qu'ils provoquent (Choi, 1988a, b ; Batini et coll, 1993). Dans ce sens, la présence de CaBP dans le neurone serait plus à relier à la nature de ses récepteurs et de ses afférences. Dans le cas du SLml, elle pourrait caractériser les neurones recevant l'innervation glutamatergique provenant de l'hippocampe, et les protéger spécifiquement des atteintes excitotoxiques qu'ils pourraient subir. En accord avec cette hypothèse, des résultats récents ont montré que certains neurones du SLml présentaient une réponse excitatrice exacerbée lors d'application de glutamate (B. Carette, communication personnelle)

Nos résultats concernant l'innervation enképhalinergique des neurones identifiés sur le plan électrophysiologique appuient nos observations ultrastructurales qui laissaient supposer qu'ils reçoivent l'innervation provenant des fibres du tractus hypothalamo-septal. Ils montrent toutefois que ce n'est pas le cas pour tous les neurones identifiés. Les neurones recevant l'innervation enképhalinergique sont ou non IR-CaBP. Ils possèdent ou non des épines somatiques. Ces observations mettent le point sur la diversité des types cellulaires contactés par les fibres du tractus hypothalamo-septal.

Discussion Générale

L'identification et la caractérisation de populations neuronales distinctes au sein d'une structure du système nerveux central constituent un des objectifs de la neurobiologie. La définition d'un type neuronal à partir de l'étude de ses afférences nerveuses, de ses propriétés électriques membranaires, de ses caractéristiques morphologiques et de son contenu immunocytochimique, permet d'accéder aux bases nécessaires pour appréhender son intervention dans certains phénomènes physiologiques ou comportementaux, si l'on admet que des particularités physiologiques ou morphologiques correspondent à des propriétés fonctionnelles spécifiques.

Dans une première partie du présent travail, nous avons utilisé les méthodes immunocytochimiques pour localiser, chez le cobaye, les territoires du SL différenciellement innervés par les afférences SOM, TH, NT, VP et Enk. Des méthodes immunocytochimiques et histochimiques ont été aussi employées pour déterminer dans les neurones du SL la présence de GABA, de PV, de CaBP et de ND. L'étude de ces trois dernières substances dans le système nerveux central connaît actuellement un grand essor, d'une part à cause de leur nature neuroprotectrice, d'autre part parce qu'elles représentent dans certaines structures un moyen efficace de caractérisation de populations neuronales.

Dans une deuxième partie du travail, l'effort méthodologique a porté sur le couplage des techniques électrophysiologiques et des techniques morphologiques, qui constitue un outil de tout premier ordre pour tenter de relier, à l'échelon individuel, la physiologie et la morphologie du neurone. La combinaison de ces deux techniques est difficilement réalisable sur l'animal entier. Par contre, l'utilisation de tranches de cerveau se prête bien à ce genre d'investigation. Les préparations conservent une relative intégrité du tissu nerveux et les circuits neuronaux locaux restent fonctionnels. Le traitement immunocytochimique réalisé sur des neurones identifiés, tant au point de vue électrophysiologique qu'au point de vue morphologique, apporte des renseignements complémentaires en révélant la nature de leurs afférences et en identifiant leur contenu neurochimique. Nous avons développé et appliqué cette méthodologie à l'étude de neurones individuels du SLml, structure qui se situe à l'interface des centres cérébraux supérieurs et de l'hypothalamus. Une attention particulière a été portée dans cette étude à l'innervation enképhalinergique du SL, pris dans son ensemble et à celle des neurones

identifiés dans le **SLml**, car les neurones recevant cette innervation sont la cible du tractus hypothalamo-septal originaire du NMD.

Nos résultats, obtenus chez le cobaye, apportent la première description complète des propriétés électriques des neurones du **SLml** (Carette et coll, 1992). Ils mettent en relief leur homogénéité relative. Il s'avère en effet que la majorité des neurones (classes A et C : 79,3%) présentent des décharges électriques typiques, comportant des PA calciques haut-seuil dans des conditions d'enregistrement normal. Des caractéristiques électrophysiologiques semblables ont été mises en évidence pour la plupart des neurones du SLd dans la même espèce (Alvarez de Toledo et Lopez-Barneo, 1988). Nos observations étendent au **SLml** ces observations originales et suggèrent que les propriétés électrophysiologiques décrites dans la présente étude caractérisent non seulement les neurones du **SLml** mais aussi l'ensemble des neurones du SL. Force est de constater que les études réalisées chez le rat, bien que très fragmentaires, suggèrent une différence d'espèce radicale quant aux propriétés électriques intrinsèques des neurones du **SLml**. Cette constatation, si elle s'affirme, est troublante dans la mesure où l'on tend à supposer que les rôles du SL sont comparables dans les deux espèces.

Les techniques de marquage intracellulaire nous ont permis d'apporter la première description détaillée des caractéristiques morphologiques des neurones du **SLml** (Doutrelant et coll, 1993c). Une réserve doit être faite car notre étude morphologique ne s'adresse, pour des raisons purement techniques, qu'aux seuls neurones des classes A et C, mais, rappelons-le, ces groupes sont largement majoritaires dans la structure considérée. Si on exclut certaines particularités morphologiques mineures, notre étude révèle une certaine homogénéité dans la morphologie des neurones. La majorité de ceux-ci (83%) sont en effet des neurones de grande taille, reconnaissables à leurs épaissements dendritiques parfois spectaculaires et à leurs nombreuses épines dendritiques. Ces résultats ont été confortés par les observations effectuées après imprégnation argentique de Golgi. Contrairement à l'opposition des propriétés électriques qui semble se manifester entre le rat et le cobaye, les neurones du **SLml** décrits dans cette étude présentent de nombreuses similitudes avec les neurones de type II décrits chez le rat par Alonso et Frotscher (1989a).

Le rapprochement des données électrophysiologiques et morphologiques montre donc que les neurones de classe A et C forment un groupe morphologique relativement homogène. Cette constatation nous a amené à



suggérer que les deux classes de neurones correspondent à un même type morphologique mais qu'ils diffèrent en fonction du site d'enregistrement, soit le corps cellulaire pour les neurones de classe A, soit la limite soma/dendrite, voire même la dendrite, pour les neurones de classe C.

En définitive, le **SLml**, tout au moins chez le cobaye, est constitué d'un ensemble prépondérant de neurones possédant des propriétés électriques et morphologiques communes. Il est intéressant de mettre en parallèle cette conclusion avec les observations que nous avons réalisées par ailleurs dans le NMD. Bien que ce noyau présente un aspect extrêmement homogène et qu'il soit très spécialisé - par ses neurones uniquement enképhalinerigiques et par sa projection massive vers le SL - des injections intracellulaires ont montré qu'il était constitué de types morphologiques très différents (Doutrelant et coll, 1992). Des études électrophysiologiques du même noyau ont récemment révélé une forte hétérogénéité dans les propriétés électriques des neurones qui le constituent (I. Niespodziani, communication personnelle). Cet exemple montre bien que l'association des techniques d'enregistrement et d'injection intracellulaires apportent un éclairage original lorsqu'il s'agit de juger l'homogénéité ou l'hétérogénéité d'une région donnée du système nerveux, afin d'en tirer des conséquences fonctionnelles.

L'apparente homogénéité qui apparaît pour les neurones du **SLml** et par extension pour le **SL** entier, est difficilement conciliable avec la diversité des nombreuses fonctions remplies par ces structures, fonctions qui ont été rappelées dans une première partie de la thèse. Des indices de cette diversité peuvent toutefois être trouvés dans la variété des afférences qui contactent les neurones, ainsi que dans leur contenu neurochimique.

La diversité des rôles attribués au **SL** est éclairée par la mise en évidence de fibres et terminaisons nerveuses immunoréactives pour diverses substances neuroactives. Nos résultats chez le cobaye ne montrent pas de différences frappantes avec ce qui est observé chez le rat. Les substances identifiées peuvent exercer une action synergique en tant qu'agonistes ou antagonistes et déterminer ainsi l'activité des neurones contactés. Nous avons montré la présence de nombreux arrangements périsonmatiques pour la **SOM**, la **TH**, la **NT** et l'**Enk**. Cette disposition tout à fait particulière des terminaisons semble caractériser l'innervation des neurones du **SL**. Elle peut être le reflet d'une répétition nécessaire de l'information synaptique. L'ensemble de ces données, certes purement descriptives, suggère que par l'extrême variété de ses afférences, les neurones du **SL** peuvent être impliqués dans des fonctions

diverses. Chez le rat, les travaux de l'équipe de Jakab ont montré que les neurones du **SLml** avaient un rôle potentiel dans l'intégration de messages multiples. L'étude réalisée chez le cobaye ne permet pas de conclure en des termes identiques, mais le recoupement de territoires innervés par des terminaisons de différents types indique de toute évidence que les neurones du **SLml**, comme chez le rat, peuvent recevoir des afférences multiples et convergentes. De même, la coexistence de TH/NT et TH/SOM, clairement démontrée chez le rat par les mêmes auteurs, est suggérée chez le cobaye par la distribution de ces mêmes terminaisons dans le **SLml**.

La diversité des populations neuronales du SL est notable lorsque l'on examine la répartition des neurones contenant le GABA, la CaBP et le ND. Ces populations sont en effet diversement réparties sur l'ensemble du SL. Si la répartition des neurones à CaBP telle que nous le démontrons chez le cobaye est comparable à celle observée chez le rat, nos résultats apportent des données originales concernant, dans le SL, l'existence de neurones à ND, l'existence d'un fort contingent de fibres à ND et une colocalisation CaBP/ND (Doutrelant et coll, 1993a, b). De plus, nos expériences réalisées sur des neurones individuels du **SLml** montrent que la présence de CaBP ne reflète pas ici des propriétés électriques particulières. En effet, la CaBP est détectée ou non dans des neurones ayant les mêmes propriétés membranaires intrinsèques. L'existence de neurones contenant la ND, parfois associée à la CaBP, constitue une particularité du SL du cobaye, dont les conséquences fonctionnelles restent à déterminer. L'action neuroprotectrice de la CaBP et de la ND est maintenant bien démontrée. Nous avons avancé l'hypothèse selon laquelle, dans le SL et plus particulièrement dans le **SLml**, la CaBP pourrait jouer un rôle protecteur pour les neurones recevant les afférences excitatrices glutamatergiques provenant de l'hippocampe. De même, la présence de ND dans des populations spécifiques de neurones pourraient avoir un rapport avec une protection de ces derniers vis-à-vis d'actions excitotoxiques.

Nos travaux effectués sur des neurones individuels du **SLml** permettent d'établir un parallèle avec les données concernant les neurones à épines somatiques qui, selon les résultats de l'équipe de Jakab, caractérisent cette subdivision particulière du SL du rat.

Les neurones à épines somatiques existent dans la même proportion chez le cobaye, lorsqu'ils sont examinés à l'échelle du microscope optique. L'examen ultrastructural nous révèle en effet un nombre plus important de neurones présentant des épines somatiques, bien sûr de plus petite taille. Si les

épines somatiques visibles en microscopie optique qualifient chez le rat les neurones recevant les afférences glutamatergiques provenant de l'hippocampe, nous pouvons suggérer qu'il en est de même chez le cobaye. Cette observation appuierait l'hypothèse formulée précédemment sur le rôle neuroprotecteur de substances, qui devraient être trouvées spécifiquement dans les neurones innervés par ces afférences. Cela est en partie confirmé par notre démonstration que des neurones à épines somatiques contiennent la CaBP.

En tout état de cause, il apparaît dans notre étude que les neurones à épines somatiques ne peuvent être reconnus par leurs propriétés électriques, qui ne diffèrent pas de celles des autres neurones du SLml.

Chez le rat, la plupart des neurones à épines somatiques sont GABAergiques. Notre étude immunocytochimique montre que le SL de cobaye contient un nombre important de neurones GABAergiques. La détection du GABA dans des neurones injectés est difficile à obtenir en microscopie optique (Scharfman et coll, 1989). Pour définir la nature GABAergique des neurones identifiés, nous avons utilisé la CaBP et la PV comme marqueurs du GABA. Dans notre étude, les neurones IR-PV sont très rares et la distribution des neurones GABAergiques et des neurones à CaBP est relativement distincte. Ce dernier point est quelque peu en désaccord avec les données de Jakab et coll (1991b), dans le sens où ces auteurs considèrent la CaBP comme un marqueur fiable des neurones GABAergiques.

Il est bien établi que les neurones GABAergiques du SL ont une importance fonctionnelle dans la boucle de régulation septo-hippocampo-septale. Etant donné sa nature de neurotransmetteur inhibiteur, les neurones GABAergiques du SL sont directement impliqués dans des mécanismes inhibiteurs. De France et coll (1972, 1973, 1975) ont montré que la stimulation de la fimbria entraînait une inhibition des neurones du SL précédée d'une courte période d'excitation. Cette inhibition est de nature GABAergique (Stevens et coll, 1987). Comme la fimbria convoie des afférences purement excitatrices, l'observation d'une inhibition utilisant le GABA comme neurotransmetteur nécessite la présence d'interneurones locaux. Notre étude électrophysiologique a montré, lors de l'application de bicuculline, l'existence d'une transmission GABAergique fonctionnelle, nécessitant la présence d'interneurones GABAergiques dans la tranche. Ces interneurones, ou interneurones Golgi de type II, n'existent pas dans le SL (Ramon y Cajal, 1909). Toutefois, nos injections intracellulaires ont révélé l'existence de neurones de projection qui se ramifiaient densément à proximité du corps cellulaire. La présence de "boutons en passant" suggère l'existence de contacts

locaux. Il est possible que ce soient ces neurones qui réalisent l'innervation GABAergique du **SLml** lui-même, tout en innervant d'autres territoires, comme le montre la direction des axones de projection. La mise en évidence de GABA dans les corps cellulaires et dans les terminaisons nerveuses des neurones injectés, réalisable à l'échelon ultrastructural par la méthode décrite par Somogyi et Freund (1989), permettrait d'asseoir définitivement cette hypothèse. Si l'on tient compte de la projection massive des neurones de **SLml** vers l'aire préoptique et l'hypothalamus, la démonstration de l'existence de neurones de projection GABAergiques originaires du **SLml** peut être fondamentale. Actuellement de nombreuses questions restent en suspens quant à la régulation GABAergique de populations de neurones impliquées dans les fonctions neuroendocrines. Il peut être supposé que ce soient les neurones GABAergiques du **SLml** qui relaient l'influence inhibitrice provenant de l'hippocampe, sur les neurones préoptiques et hypothalamiques directement impliqués dans ces fonctions.

En dernier lieu, notre étude apporte des renseignements originaux sur la multiplicité des types cellulaires contactés par les terminaisons enképhalinerigiques du tractus hypothalamo-septal. Il est clair que cette diversité ne s'exprime pas par une morphologie ou des propriétés électriques particulières. Nos expériences de marquage intracellulaire couplé à l'immunocytochimie des fibres enképhalinerigiques établissent clairement que les propriétés membranaires intrinsèques des neurones ne constituent pas une base qui permette de les identifier en tant que neurones-cibles du tractus. Les mêmes expériences montrent en outre que la présence d'épines somatiques visibles en microscopie optique n'est pas en rapport avec l'innervation enképhalinerigique. La diversité des types cellulaires contactés par les fibres enképhalinerigiques s'exprime dans notre étude par le contenu des neurones en CaBP et en ND. L'exemple du noyau stigmoïde l'illustre bien car ce petit groupe de neurones, situé dans la partie la plus dorsale et la plus ventrale du **SLml**, contient une forte population de neurones à CaBP, à ND et de neurones colocalisant les deux substances. Ces trois populations distinctes de neurones sont innervées par les fibres enképhalinerigiques. Il en est de même pour les neurones du **SLml** pris dans son ensemble. Ces résultats laissent pressentir que le tractus hypothalamo-septal intéresse des neurones impliqués dans des régulations diverses, dont les particularités doivent plutôt être recherchées dans leur contenu neurochimique, dans leurs types d'afférences mais aussi dans leurs projections spécifiques.

Le rôle du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal est encore inconnu. La recherche de ce rôle chez le cobaye constitue un des thèmes développés dans notre laboratoire d'accueil. L'hypothèse de travail est que les enképhalines exerceraient dans le **SLml** une modulation de l'activité des neurones situés à l'articulation hippocampo-hypothalamique. Nos résultats d'ordre morphologique indiquent que des neurones, par leurs épines somatiques, par leur contenu en CaBP, sont comparables à ceux qui reçoivent chez le rat la projection de l'hippocampe. Ils montrent que ces mêmes neurones sont la cible du tractus enképhalinergique. Ils laissent supposer qu'ils reçoivent des afférences multiples de même nature que celles qui sont décrites chez le rat. Nos résultats d'ordre électrophysiologique apportent les connaissances nécessaires pour développer l'étude des mécanismes d'action des enképhalines et d'autres substances neuroactives sur les propriétés membranaires intrinsèques et les propriétés synaptiques des neurones du **SLml**. L'ensemble des résultats apporte les bases d'une étude précise des modulations nerveuses qui s'exercent sur un système potentiellement impliqué dans de nombreuses fonctions, dont les fonctions neuroendocrines.

Bibliographie

- Adams J.C.** (1977) Technical consideration on the use of HRP as a neuronal marker. *Neuroscience* 2 : 141-145.
- Adler B., Goodman R.R., Pasternak G.W.** (1990) Opioid peptide receptors. In "Handbook of chemical neuroanatomy" vol 9, Neuropeptides in the CNS, Part II. Björklund A., Hökfelt T., Kuhar M.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Albert D.J., Richmond D.S.E.** (1976) Hyper-reactivity and aggressiveness following infusion of local anesthetic into the lateral septum or surrounding structures. *Behav. Biol.* 18 : 211-226.
- Alonso J.R., Frotscher M.** (1989a) Organization of the septal region in the rat brain : a golgi/EM study of lateral septal neurons. *J. Comp. Neurol.* 286 : 472-487.
- Alonso J.R., Frotscher M.** (1989b) Hippocampal-septal fibers terminate on identified spiny neurons in the lateral septum : a combined Golgi/electron-microscopic and degeneration study in the rat. *Cell Tissue Res.* 258 : 243-246.
- Alonso J.R., Covenas R., Lara J., Aijon J.** (1990) Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the rat septal area. *Brain Res. Bull.* 24 : 41-48.
- Alonso J.R., Sanchez F., Arevalo R., Carretero J., Aijon J., Vazquez R.** (1992) CaBP D-28k and NADPH-diaphorase coexistence in the magnocellular neurosecretory nuclei. *Neuroreport* 3 : 249-252.
- Alvarez de Toledo G., Lopez-Barneo J.** (1988) Ionic basis of the differential neuronal activity of guinea pig septal nucleus studied in vitro. *J. Physiol.* 396 : 399-415.
- Amaral D.G., Kurz J.** (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and non cholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 240 : 37-59.
- Andersen P., Blackstad T.W., Lomo T.** (1966) Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.* 1 : 236-248.
- Anderson W.A., Bruni J.E., Kaufmann A.** (1990) Afferent connections of the rat's supraoptic nucleus. *Brain Res. Bull.* 24 : 191-200.
- Andy O.J., Stephan H.** (1959) The nuclear configuration of the septum of the Galago demidorii. *J. Comp. Neurol.* 111 : 503-545.
- Antal M., Polgar E., Chalmers J., Minson J.B., Llewellyn-Smith I., Heizmann C.W., Somogyi P.** (1991) Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate ³H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 314 : 114-124.
- Assaf S.Y., Miller J.J.** (1977) Excitatory action of mesolimbic dopamine system on septal neurones. *Brain Res.* 129 : 353-360.
- Baer S.M., Rinzel J.** (1991) Propagation of dendritic spikes mediated by excitable spines : a continuum theory. *J. Neurophysiol.* 65 : 874-890.
- Baimbridge K.G., Celio M.R., Rogers J.H.** (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *TINS* 15 : 303-308.
- Barrett E.F., Barrett J.N.** (1976) Separation of two voltage-sensitive potassium currents and demonstration of a tetrodotoxin-resistant calcium current in frog motoneurons. *J. Physiol. (Lond.)* 255 : 737-774.
- Barry J., Dubols M.P., Poulain P.** (1973) LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. *Z. Zellforsch.* 146 : 351-366.
- Batini C., Palestini M., Thomasset M., Vigot R.** (1993) Cytoplasmic calcium buffer, calbindin-D28k is regulated by excitatory amino acids. *Neuroreport* 4 : 927-930.
- Beauvillain J.C., Mitchell V., Tramu G., Mazzuca M.** (1991) GABA and enkephalin in the lateral septum of the guinea pig : light and electron microscopic evidence for interrelations. *J. Comp. Neurol.* 308 : 103-114.
- Beauvillain J.C., Poulain P., Tramu G.** (1983) Immunocytochemical localization of enkephalin in the lateral septum of the guinea pig brain. *Cell Tissue Res.* 228 : 265-276.
- Beauvillain J.C., Tramu G., Poulain P.** (1982) Enkephalin-immunoreactive neurons in the guinea pig hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 224 : 1-13.

- Bell C.C., Finger T.E., Russell C.J.** (1981) Central connection of the posterior lateral line lobe in mormyrid fish. *Exp. Brain Res.* 42 : 9-22.
- Berk M.L., Finkelstein J.A.** (1981) Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience* 6 : 1601-1624.
- Bialowas J., Frotscher M.** (1987) Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons and terminals in the rat septal complex : a combined light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 259 : 298-307.
- Blanchard D.C., Blanchard R.J., Takahashi L.K., Takahashi T.** (1977) Septal lesions and aggressive behavior. *Behav. Biol.* 21 : 157-161.
- Bland S.K., Bland B.H.** (1986) Medial septal modulation of hippocampal theta cell discharges. *Brain Res.* 375 : 102-116.
- Blatz A.L., Magleby K.L.** (1987) Calcium-activated potassium channels. *TINS* 10 : 463-467.
- Bleier R.** (1983) The hypothalamus of the guinea pig. A cytoarchitectonic atlas. The University of Wisconsin Press : 30.
- Bliss T.V.P., Lomo T.** (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbits following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232 : 331-356.
- Boorsma D.M.** (1984) Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies. *Histochemistry* 80 : 103-106.
- Borer K.T., Kelch R.P., White M.P., Dolson L., Kuhns L.R.** (1977) The role of the septal area in the neuroendocrine control of growth in the adult golden hamster. *Neuroendocrinology* 23 : 133-150.
- Brauer K., Schober W., Werner L., Winkelmann E., Lungwitz W., Hajdu F.** (1988) Neurons in the basal forebrain complex of the rat: a Golgi study. *J.Hirnforsch.* 29 : 43-71.
- Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H.** (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7 : 615-624.
- Brück K., Zeisberger E.** (1987) Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis. *Pharmacol. Ther.* 35 : 163-215.
- Brutus M., Shaikh M.B., Siegel H.E., Siegel A.** (1984) An analysis of the mechanisms underlying septal area control of hypothalamically elicited aggression in the cat. *Brain Res.* 310 : 235-248.
- Buijs R.M.** (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192 : 423-435.
- Buijs R.M., Swaab D.F., Dogterom J., Van Leeuwen F.W.** (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res.* 186 : 423-433.
- Caffé A.R., Van Leeuwen F.W., Luiten P.G.M.** (1987) Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 261 : 237-252.
- Calaresu F.R., Ciriello J., Mogenson G.J.** (1976) Identification of pathways mediation cardiovascular responses elicited by stimulation of the septum in the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 260 : 515-530.
- Calverley R.K.S., Jones D.G.** (1990) Contribution of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res. Rev.* 15 : 215-249.
- Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W.** (1992a) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 324 : 143-179.
- Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W.** (1992b) Projections of the ventral premammillary nucleus. *J. Comp. Neurol.* 324 : 195-212.
- Canteras N.S., Swanson L.W.** (1992) Projections of the ventral subiculum, to the amygdala, septum, and hypothalamus : a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324 : 180-194.
- Carette B., Poulain P.** (1982) Post-synaptic inhibitory effect on met- and leu-enkephalin on endocrine and adjacent neurons in the preoptic-septal region of the guinea-pig. *Reg. Peptides* 3 : 125-133.

- Carette B., Poulain P., Doutrelant O.** (1992) Electrical properties of neurons in the mediolateral part of the lateral septum : intracellular recordings from guinea pig brain slices. *Exp. Brain Res.* 91 : 105-114.
- Castellano O., Lopez-Barneo J.** (1991) Sodium and calcium currents in dispersed mammalian septal neurons. *J. Gen. Physiol.* 97 : 303-320.
- Celio M.R.** (1986) Parvalbumin in most γ -aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231 : 995-997.
- Celio M.R.** (1990) Calbindin D-28K and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35 : 375-475.
- Choi D.W.** (1988a) Glutamate neurotoxicity and disease of the central nervous system. *Neuron* 1 : 623-624.
- Choi D.W.** (1988b) Calcium-mediated neurotoxicity : relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 11 : 465-469.
- Cioffi P., Tramu G.** (1990) Distribution of cholecystokinin-like-immunoreactive neurons in the guinea-pig forebrain. *J. Comp. Neurol.* 300 : 82-112.
- Cirino M., Renaud L.P.** (1985) Influence of lateral septum and amygdala stimulation on the excitability of hypothalamic supraoptic neurons. An electrophysiological study in the rat. *Brain Res.* 326 : 357-361.
- Collingridge G.L., Kehl S.J., Mc Lennan H.** (1983) Excitatory aminoacid in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway in the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 334 : 33-46.
- Compaan J.C., Buijs R.M., Pool C.W., DeRuiter A.J.H., Koolhaas J.M.** (1993) Differential lateral septal vasopressin innervation in aggressive and non aggressive male mice. *Brain Res. Bull.* 30 : 1-6.
- Conrad L.C.A., Leonard C.M., Pfaff D.W.** (1974) Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 156 : 179-206.
- Cooper K.E.** (1987) The neurobiology of fever : thoughts on recent developments. *Ann. Rev. Neurosci.* 10 : 297-324.
- Costa E., Panula P., Thompson H.K., Cheney D.L.** (1983) The transynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci.* 32 : 165-179.
- Cullinan W.E., Zaborszky L.** (1991) Organization of ascending hypothalamic projections to the rostral forebrain with special reference to the innervation of cholinergic projection neurons. *J. Comp. Neurol.* 306 : 631-667.
- Decavel C., Lescaudron L., Mons N., Calas A.** (1987) First visualization of dopaminergic neurons with a monoclonal antibody to dopamine : a light and electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 35 : 1245-1251.
- DeFrance J.F., Kitai S.T., Shimono T.** (1973) Electrophysiological analysis of the hippocampo-septal projections : I response and topographical characteristics. *Exp. Brain Res.* 17 : 447-462.
- De France J.F., Shimono T., Kitai S.T.** (1972) Hippocampal inputs to the lateral septal nucleus : patterns of facilitation and inhibition. *Brain Res.* 37 : 333-339.
- De France J.F., Yoshihara H., McRea R.A., Kitai S.T.** (1975) Pharmacology of the inhibition in the lateral septal region. *Exp. Neurol.* 48 : 502-523.
- De France J.F., Yoshihara H., Chronister R.B.** (1976) Electrophysiological studies in the septal nuclei : the lateral septal region. *Exp. Neurol.* 53 : 399-419.
- De Vries G.J., Buijs R.M.** (1983) The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res.* 273 : 307-317.
- De Vries G.J., Buijs R.M., Swaab D.F.** (1981) Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain-presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Res.* 218 : 67-78.
- De Vries G.J., Buijs R.M., Van Leewen F.W., Caffé A.R., Swaab D.F.** (1985) The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *J. Comp. Neurol.* 233 : 236-254.
- Dinopoulos A., Dori I., Parnavelas J.G.** (1993) Serotonergic innervation of the mature and developing lateral septum of the rat: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. *Neuroscience* 55 : 209-222.

- Dornig F., Nitzscheke B., Frotscher M., Wenzel J.** (1976) Untersuchungen über die Neuronenstruktur des Septum telencephali der Ratte. *J.Hirnforsch.* 17 : 365-385.
- Doutrelant O.** (1988) Caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones du noyau magnocellulaire dorsal enregistré en intracellulaire à partir de tranches d'hypothalamus de cobaye "in vitro". DEA Sciences de la Vie et de la Santé (Lille).
- Doutrelant O., Martin-Bouyer L., Poulain P.** (1992) Morphological analysis of the neurons in the area of the hypothalamic magnocellular dorsal nucleus of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 269 :107-117.
- Doutrelant O., Ciofi P., Poulain P.** (1993a) CaBP-D28K and NADPH-diaphorase coexistence in the guinea pig lateral septum. 23rd Annual Meeting of the Society of Neuroscience, Washington, November 7-12 (Abstract 589-16).
- Doutrelant O., Poulain P., Carette B.** (1993b) Comparative distribution of calbindin and met-enkephalin immunoreactivities in the guinea pig lateral septum, with reference to electrophysiologically characterized neurons in the mediolateral part. *Brain Res.* 615 : 335-341.
- Doutrelant O., Poulain P., Carette B.** (1993c) Light and electron microscopic study of electrophysiologically-characterized neurons in the mediolateral part of the lateral septum of guinea-pig (*Cell Tissue Res.*, sous presse).
- Dubois-Dauphin M., Tribollet E., Dreifuss J.J.** (1989) Distribution of neurohypophysial peptides in the guinea pig brain. I. An immunocytochemical study of the vasopressin-related glycopeptide. *Brain Res.* 496 : 45-65.
- Epelbaum J., Tapia-Arancibia L., Kordon C., Enjalbert A.** (1982) Characterization, regional distribution and subcellular distribution of 125 I-Tyr1-somatostatin binding sites in rat brain. *J. Neurochem.* 38 : 1515-1523.
- Ericson H., Blomqvist A., Köhler C.** (1991) Origin of neuronal inputs to the region of the tubero-mammillary nucleus of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 311 : 45-64.
- Everett J.W.** (1965) Ovulation in rats from preoptic stimulation through platinum electrodes : importance of duration and spread of stimulus. *Endocrinology* 76 : 1195-1201.
- Ferris C.F., Gold L., DeVries G.J., Potegal M.** (1990) Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behavior in golden hamsters. *J. Comp. Neurol.* 293 :476-485.
- 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.
- Flerko B.** (1966) Control of gonadotropin secretion in the female. In "Neuroendocrinology". Martini L., Ganong W.F. (Eds). Academic Press, New York, London, pp 613-625.
- Freund T.F.** (1989) GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res.* 478 : 375-381.
- Freund T.F., Antal M.** (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336 : 170-173.
- Freund T.F., Gulyas A.I.** (1991) GABAergic interneurons containing calbindin-D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *J. Comp. Neurol.* 314 : 187-199.
- Frontera J.** (1964) Improved Golgi-type impregnation of nerve cells (abstract). *Anat. Rec.* 148 : 371-372.
- Fuxe K.** (1965) Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. IV The distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 64 (Suppl. 247) 39-85.
- Galarraga E., Bargas J., Sierra A., Aleves J.** (1989) The role of calcium in the repetitive firing of neostriatal neurons. *Exp. Brain Res.* 75 : 157-168.
- 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 : 212-227.
- Gallagher J.P., Hasuo H.** (1989a) Excitatory amino acid-receptor mediated EPSPs in the rat dorsolateral septal nucleus neurones in vitro. *J. Physiol.* 418 : 353-365.
- Gallagher J.P., Hasuo H.** (1989b) Bicuculline- and phaclofen-sensitive components of N-methyl-D-aspartate induced hyperpolarizations in rat dorsolateral septal nucleus neurones. *J. Physiol.* 418 : 367-377.

- Gallagher J.P., Stevens D.R., Shinninck-Gallagher P.** (1984) Actions of GABA and baclofen on neurons of the dorsolateral septal nucleus (DLSN) in vitro. *Neuropharmacol.* 23 :825-826.
- Garcia R., Jaffard R.** (1992) The hippocampo-septal projection in mice : long-term potentiation in the lateral septum. *Neuroreport* 3 : 193-196.
- Garcia-Segura L.M., Baetens D., Roth J., Norman A.W., Orci L.** (1984) Immunohistochemical mapping of calcium-binding protein immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res.* 296 : 75-86.
- Garris D.R.** (1979) Direct septo-hypothalamic projections in the rat. *Neurosci. Lett.* 13 : 83-90.
- Gaspar P., Berger B., Alvarez C., Vigny A., Henry J.P.** (1985) Catecholaminergic innervation of the septal area in man : immunocytochemical study using TH and DBH antibodies. *J. Comp. Neurol.* 241 : 12-33.
- 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.
- Geula C., Schatz C.R., Mesulam M.M.** (1993) Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28K within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience* 54 : 461-476.
- Goddard J.C., Behrens U.D., Wagner H.J., Djamgoz M.B.A.** (1991) Biocytin : intracellular staining, dye-coupling and immunocytochemistry in carp retina. *Neuroreport* 2 : 755-758.
- Gouardères C., Tellez S., Tafani J.A.M., Ajac J.M.** (1993) Quantitative autoradiographic mapping of delta-opioid receptors in the rat central nervous system using (¹²⁵I) (D-Ala²) deltorphin-I. *Synapse* 13 : 231-240.
- Graham R.C., Karnovsky M.J.** (1966) The early stages of absorption of injected HRP tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 44 : 291-302.
- Gray E.G.** (1959) Electron microscopy of synaptic contacts on dendritic spines of the cerebral cortex. *Nature* 183 : 1592.
- Gray J.A.** (1982) *The neuropsychology of anxiety : an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system.* Oxford, Oxford University Press.
- Gray J.A., McNaughton N.** (1983) Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions : a review. *Neurosci. Biobehavior Rev.* 7 : 119-188.
- Greenwood R.S., Bodar S.E., Reaves T.A.Jr, Hayward J.N.** (1981) Cholecystokinin in hippocampal pathway. *J. Comp. Neurol.* 203 : 335-350.
- Grossman S.P.** (1976) Behavioral functions of the septum : a re-analysis. In "The septal nuclei". *Advances in Behavior Biology*, vol 20. DeFrance (Ed). Plenum Press, New York, pp 361-422.
- Grossman S.P.** (1984) Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Rev.* 5 : 435-455.
- Gulyas A.I., Toth K., Danos P., Freund T.F.** (1991) Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 312 : 371-378.
- Hagino N., Yamaoka S.** (1976) A neuroendocrinological approach to the investigation of septum. In "The septal nuclei". *Advances in Behavior Biology*, vol 20. DeFrance (Ed). Plenum Press, New York, pp 283-335.
- Hagino N., Kosava S.B., Flerko B.** (1977) Septal projection arcuate nucleus of the hypothalamus. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 28 : 235-238.
- Halasz B., Kiss J., Molnar J.** (1989) Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system : morphological aspects. *J. Steroid. Biochem.* 33 : 663-668.
- Hallitwell J.V., Adams P.R.** (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250 : 71-92.
- Hanker J.S., Yates P.E., Metz C.B., Rustioni A.** (1977) A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochemical J.* 9 : 789-792.
- Hasuo H., Gallagher J.P.** (1988) Comparison of antagonism by phaclofen and baclofen induced hyperpolarisations and synaptically mediated late hyperpolarizing potentials recorded intracellularly from rat dorsolateral septal neurons. *Neurosci. Lett.* 29 : 243-248.

- Hasuo H., Phelan K.D., Twery M.J., Gallagher J.P.** (1990) A calcium-dependent slow afterdepolarization recorded in rat dorsolateral septal nucleus neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 64 : 1838-1846.
- Heizmann C.W., Braun K.** (1992) Changes in Ca⁺⁺-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *TINS* 15 : 259-264.
- Herman J.P., Cullinan W.E., Young E.A., Akil H., Watson S.J.** (1992) Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Res.* 592 : 228-238.
- Hökfelt T., Everitt B.J., Theodorsson-Norheim E., Goldstein M.** (1984) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulation of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J. Comp. Neurol.* 222 : 543-559.
- Hökfelt T., Skirboll L., Rehfeld J.H., Goldstein M., Markey K., Dann O.** (1980) A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic areas containing a cholecystokinin-like peptide : evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *Neuroscience* 5 : 2093-2124.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.** (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 : 2811-2814.
- Horikawa K., Armstrong W.E.** (1988) A versatile means of intracellular labeling : injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Meth.* 25 : 1-11.
- Huwylar T., Felix D.** (1980) Angiotensin II-sensitive neurons in septal areas of the rat. *Brain Res.* 195 : 187-195.
- Ishikawa K., Taniguchi Y., Kurosumi K., Suzuki M.** (1986) Origin of septal thyrotropin-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 44 : 54-58.
- Itoh K., Koniski A., Nomura S., Mizumo N., Nakamura Y., Sugimoto T.** (1979) Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of HRP : cobalt-glucose-oxidase method. *Brain Res.* 175 : 341-346.
- Izumi Y., Clifford D.B., Zorumski C.F.** (1992) Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 257 : 1273-1276.
- Jacobowitz D.M., Palkovits M.** (1974) Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 157 : 13-28.
- Jakab R.L., Leranath C.** (1990a) Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamposeptal fibers : a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6 : 10-22.
- Jakab R.L., Leranath C.** (1990b) Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamposeptal innervation of GABAergic "somatospiny" neurons in the rat lateral septal area. *J. Comp. Neurol.* 302 : 305-321.
- Jakab R.L., Leranath C.** (1991) Synaptology and origin of somatostatin fibers in the rat lateral septal area : convergent somatostatinergic and hippocampal inputs of somatospiny neurons. *Brain Res.* 565 : 123-134.
- Jakab R.L., Naftolin F., Leranath C.** (1991a) Convergent vasopressinergic and hippocampal input onto somatospiny neurons of the lateral septal area. *Neuroscience* 40 : 413-421.
- Jakab R.L., Deller T., Leranath C.** (1991b) Calbindin-containing somatospiny neurons of the rat lateral septal area project to the medial amygdala and the anterior hypothalamic area. *IBRO International Congress of Neuroscience, Montréal (Abstract n° 49-20).*
- Jakab R.L., Leranath C.** (1993) Presence of somatostatin or neurotensin in lateral septal dopaminergic axon terminals of distinct hypothalamic and midbrain origins : convergence on the somatospiny neurons. *Exp. Brain Res.* 92 : 420-430.
- Jaskiw G.E., Tizabi Y., Lipska B.K., Kolachana B.S., Wyatt R.J., Gilad G.M.** (1991) Evidence for a frontocortical-septal glutamatergic pathway and compensatory changes in septal glutamate uptake after cortical and fornix lesions in the rat. *Brain Res.* 550 : 7-10.
- Joels M., Gallagher J.P.** (1988) Actions of serotonin recorded intracellularly in rat dorsal lateral septal neurons. *Synapse* 2 : 45-53.
- Joels M., Urban I.J.A.** (1982) The effect of microiontophoretically applied vasopressin and oxytocin on single neurones in the septum and dorsal hippocampus of the rat. *Neurosci. Lett.* 33 : 79-84.

- Joels M., Urban I.J.A.** (1984a) Amino acid neurotransmission between fimbria-fornix fibers and neurons in the lateral septum of the rat: a microiontophoretic study. *Exp. Neurol.* 84 : 126-139.
- Joels M., Urban I.J.A.** (1984b) Electrophysiological and pharmacological evidence in favor of amino acid neurotransmission in fimbria-fornix fibers innervating the lateral septal complex of rats. *Exp. Brain Res.* 54 : 455-462.
- Joels M., Urban I.J.A.** (1985) Monoamine-induced responses in lateral septal neurons : influence of iontophoretically applied vasopressin. *Brain Res.* 344 : 120-126.
- Joels M., Shinnick-Gallagher P., Gallagher J.P.** (1987a) Effect of serotonin and serotonin analogues on passive membrane properties of lateral septal neurons in vitro. *Brain Res.* 417 : 99-107.
- Joels M., Vanveldhuizen M., Urban I.J.A., DeKloet E.R.** (1987b) N-acetyl-aspartyl glutamate : binding sites and excitatory action in the dorsolateral septum of rats. *Brain Res.* 403 : 192-197.
- Joseph S.A.** (1980) Immunoreactive adrenocorticotropin in rat brain : a neuroanatomical study using antiserum generated against synthetic ACTH. *An. J. Anat.* 158 : 533-548.
- Kalra S.P.** (1986) Neural circuitry involved in the control of LHRH secretion : a model for preovulatory LH release. In *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol 9. Martini L., Garong W.F. (Eds). Raven Press, New York, pp 31-75.
- Kalsbeek A., Teclemariam-Mesbah R., Pevet P.** (1993) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.* 332 : 293-314.
- Katsumaru H., Hosaka T., Heizmann C.W., Hama K.** (1988) Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* 72 : 347-362.
- Kawaguchi Y., Kubota Y.** (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin D28K-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol.* 70 : 387-396.
- Kawakami M., Yoshioka E., Konda N., Arita J., Visessuvan S.** (1978) Data on the sites of the stimulatory feedback action of gonadal steroids indispensable for luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 102 : 791-798.
- King T.R., Nance D.M.** (1985) The effects of unilateral frontolateral hypothalamic knife cuts and asymmetrical unilateral septal lesions on lordosis behavior of rats. *Physiol. Behav.* 35 : 955-959.
- King T.R., Nance D.M.** (1986a) Differential effects of neurotoxic lesions on psychoneuroendocrine functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 : 107-114.
- King T.R., Nance D.M.** (1986b) Neuroestrogenic control of feeding behavior and body weight in rats with kainic acid lesions of the lateral septal area. *Physiol. Behav.* 37 : 475-481.
- Kiss J., Pattel A.J., Freund T.F.** (1990) Distribution of septohippocampal neurons containing parvalbumin or choline acetyltransferase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 298 : 362-372.
- Kiss J., Pattel A.J.** (1991) Organisation and synaptic interconnections of parvalbumin and calbindin containing neurons in the rat septum. *IBRO International Congress of Neuroscience, Montréal (Abstract n° 49-18)*.
- Kirk I.J., Mc Naughton N.** (1991) Cell firing and hippocampal rhythmic slow activity. *Neuroreport* 2 : 723-725.
- Kita H., Armstrong W.** (1991) A biotin-containing compound N-(2-aminoethyl) biotinamide for intracellular labeling and neuronal tracing studies : comparison with biocytin. *J. Neurosci. Meth.* 37 : 141-150.
- Köhler C., Chan-Palay V.** (1983) Distribution of gamma aminobutyric acid containing neurons and terminals in the septal area. *Anat. Embryol.* 167 : 53-65.
- Köhler C., Chan-Palay V., Steinbush H.** (1982) The distribution and origin of serotonin containing fibers in the septal area : a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in rat. *J. Comp. Neurol.* 209 : 91-111.
- Köhler C., Eriksson L.G.** (1984) An immunohistochemical study of somatostatin and neurotensin positive neurons in the septal nuclei of the rat brain. *Anat. Embryol.* 170 : 1-10.
- Köhr G., Lambert C.E., Mody I.** (1991) Calbindin-D28K (CaBP) levels and calcium currents in acutely dissociated epileptic neurons. *Exp. Brain Res.* 85 : 543-551.

- Koolhaas J.M., Moor E., Hiemstra Y., Bohus B.** (1991) The testosterone-dependent vasopressinergic neurons in the medial amygdala and lateral septum : involvement in social behavior in male rats. In "Vasopressin". Jard S., Jamison R. (Eds). INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, Paris, Londres, 213-219.
- Kosaka T., Katsumaru H., Hama K., Wu J.Y., Heizmann C.W.** (1987) GABAergic neurons containing the Ca⁺⁺-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* 419 : 119-130.
- Krantic S., Martel J.C., Weissmann D., Pujol J.F., Quirion R.** (1990) Quantitative radioautographic study of somatostatin receptors heterogeneity in the rat extrahypothalamic brain. *Neuroscience* 39 : 127-137.
- Lambert R. C., Moss F.C., Ingram C.D., Wakerley J.B., Kremarik P., Guerne Y., Richard P.** (1993) Electrical activity of neurons in the ventrolateral septum and bed nuclei of the stria terminalis in suckled rats : statistical analysis gives evidence for sensitivity to oxytocin and for relation to the milk-ejection reflex. *Neuroscience* 54 : 361-376.
- Lebrun C.J., Poulain D.A.** (1982) Electrical activity of septal neurones during suckling and the milk ejection reflex in the lactating rat. *Exp. Brain Res.* 47 : 203-208.
- Lebrun C.J., Poulain D.A., Theodosis D.T.** (1983) The role of the septum in the control of the milk ejection reflex in the rat: effects of lesions and electrical stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* 339 : 17-31.
- Lee T.F., Nürnberger F., Jourdan M.L., Wang L.C.H.** (1989) Possible involvement of septum in seasonal changes in thermoregulatory responses to met-enkephalinamide in ground squirrel. In "Thermoregulation : research and clinical applications". Lomax P. et coll (Eds). Karger, Basel.
- Leranth C., Frotscher M.** (1989) Organization of the septal region in the rat brain : cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *J. Comp. Neurol.* 289 : 304-314.
- Leranth C., Deller T., Buzsaki G.** (1992) Intraseptal connections redefined : lack of a lateral septum to medial septum path. *Brain Res.* 583 : 1-11.
- Lopez-Barneo J., Alvarez de Toledo G., Yarom Y.** (1985) Electrophysiological properties of guinea-pig septal neurons in vitro. *Brain Res.* 347 : 358-362.
- Lorente de No R.** (1934) Studies of the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46 : 113-177.
- Lindvall O.** (1975) Mesencephalic dopaminergic afferents to the lateral septal nucleus of the rat. *Brain Res.* 87 : 89-95.
- Lindvall O., Stenevi U.** (1978) Dopamine and noradrenaline neurons projecting to the septal area in the rat. *Cell Tissue Res.* 190 : 383-407.
- Ljungdahl A., Hökfelt T., Nilsson G.** (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3 : 861-943.
- Llinas R., Nicholson C.** (1971) Electrophysiological properties of dendrites and somata in alligator Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 34 : 534-551.
- Llinas R., Sugimori M.** (1980) Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cells dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* 305 : 197-213.
- Llinas R., Yarom Y.** (1981) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol. (Lond.)* 315 : 549-567.
- Lopez-Barneo J., Alvarez de Toledo G., Yarom Y.** (1985) Electrophysiological properties of guinea pig septal neurons in vitro. *Brain Res.* 347 : 358-362.
- Luiten P.G.M., Kuipers F., Schuitmaker H.** (1982) Organization of diencephalic and brainstem afferent projection to the lateral septum in the rat. *Neurosci. Lett.* 30 : 211-2216.
- McDonald A.J.** (1989) Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal polypeptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res.* 500 : 37-45.
- McMullen N.T., Almlı C.R.** (1981) Cell-types within the medial forebrain bundle : a Golgi study of preoptic and hypothalamic neurons in the rat. *Am. J. Anat.* 161 : 323-340.
- Malinow R., Tsien R.W.** (1990) Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices. *Nature* 346 : 177-182.

- Malthe-Sorensen D., Odden E., Walaas I.** (1980) Selective destruction by kainic acid of neurons innervated by putative glutaminergic afferents in septum and nucleus of the diagonal band. *Brain Res.* 182 :461-465.
- Mansour A., Meador-Woodruff J.H., Zhou Q., Civelli O., Akil H., Watson S.J.** (1992) A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 46 : 959-971.
- Manzoni O., Prezeau L., Marin P., Deshager S., Bockaert J., Fagni L.** (1992) Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 8 : 653-662.
- Marcinkiewicz M., Morcos R., Chretien M.** (1989) CNS connections with the median raphe nucleus : retrograde tracing with WGA-*apo* HRP-gold complex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 289 : 11-35.
- Marchand J.E., Hagino N.** (1982) Effect of iontophoresis of vasopressin on lateral septal neurons. *Exp. Neurol.* 78 : 790-795.
- Masukawa L.M., Prince D.A.** (1984) Synaptic control of excitability in isolated dendrites of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 4 : 217-227.
- Meibach C.R., 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.
- Merchantaler I., Görcs T., Setalo G., Petrusz P., Flerko B.** (1984) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res.* 237 : 15-29.
- Merker G., Blähler S., Zeiberger E.** (1980) Reactivity pattern of vasopressin-containing neurons and its relation to the antipyretic reaction in the pregnant guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 212 : 47-61.
- Metz C.B., Schneider S.P., Fyffe R.E.** (1989) Selective suppression of endogenous peroxidase activity : application for enhancing appearance of HRP-labeled neurons in vitro. *J. Neurosci. Meth.* 26 : 181-188.
- Meynert T.** (1867) Der Bau der Grosshirnrinde und seine örtlichen Verschiedenheiten, nebst einem pathologisch-anatomischen Collarium. *Vierteljahresschrift Psychiatr.* 1 : 77-93.
- Miczek K.A., Grossman S.P.** (1972) Effects of septal lesions on inter- and intraspecies aggression in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 79 : 37-45.
- Mizukawa K., McGeer P.L., Vincent S.R., Mc Geer E.G.** (1988) Ultrastructure of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase-positive neurons in the cat cerebral cortex, amygdala and caudate nucleus. *Brain Res.* 452 : 286-292.
- Moos F., Ingram C.D., Wakerley J.B., Guerne Y., Freund-Mercier M.J., Richard P.** (1991) Oxytocin in the bed nucleus of the stria terminalis and lateral septum facilitates bursting of hypothalamic oxytocin neurons in suckled rats. *J. Neuroendocrinol.* 3 : 163-171.
- Moore R.Y.** (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 177 : 665-684.
- Mostfeldt-Laursen A., Rekling J.C.** (1989) Electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons of guinea pig studied in vitro. *Neuroscience* 30 : 619-637.
- Mugnaini E., Oertel W.H.** (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In "Handbook of chemical Neuroanatomy", vol 4. Björklund A., Hökfelt T. (Eds). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp 436-608.
- Nadler J.V., White W.F., Vaca K.W., Perry B.W., Cotman C.W.** (1978) Biochemical correlates of transmission mediated by glutamate and aspartate. *J. Neurochem.* 133: 147-155.
- Nakane P.K.** (1968) Simultaneous localization of multiple tissue antigens utilizing the peroxidase-labeled antibody method : a study on pituitary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 16 : 557-560.
- Nance D.M.** (1976) Sex differences in the hypothalamic regulation of feeding behavior in the rat. In "Advances in Psychobiology", vol 3. Riesen A.H., Thompson R.F. (Eds). Wiley New York, pp 75-123.
- Nance D.M.** (1983) Psychoneuroendocrine effects of neurotoxic lesions in the septum and striatum of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 : 605-609.
- Nance D.M., Shryne J., Gorsky R.A.** (1974) Septal lesions : effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. *Horm. Behav.* 5 : 73-81.

- Nance D.M., Shryne J., Gorsky R.A. (1975) Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm. Behav.* 6 :59-64.
- Nance D.M., Shryne J., Gordon J.H., Gorsky R.A. (1977) Examination of some factors that control the effects of septal lesions on lordosis behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6 : 227-234.
- 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.
- Neumann I., Landgraf R. (1989) Septal and hippocampal release of oxytocin, but not vasopressin, in the conscious lactating rat during suckling. *J. Neuroendocrinol.* 1 : 305-308.
- Nowicki J.P., Duval D., Poignet D.H., Scatton B. (1991) Nitric oxide mediates neuronal death after cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204 : 339-340.
- Numan R., Quaranta J.R. Jr (1990) Effects of medial septal lesions on operant delayed alternation in rats. *Brain Res.* 531 : 232-241.
- Oertel D., Wu S.H. (1989) Morphology and physiology of cells in slice preparations of the dorsal cochlear nucleus of mice. *J. Comp. Neurol.* 283 : 228-247.
- Oldfield B.J., Hou-Yu A., Silverman A.J. (1985) A combined electron microscopic HRP and immunocytochemical study of the limbic projections to rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons. *J. Comp. Neurol.* 231 :221-231.
- Oldfield B.J., Silverman A.J. (1985) A light microscopic HRP study of limbic projections to the vasopressin-containing nuclear groups of the hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 14 : 143-157.
- Olshowka J.A., O'Donohue T.L., Mueller G.P., Jacobowitz D.M. (1982) The distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides* 3 : 995-1015.
- Onteniente B., Geffard M., Calas A. (1984) Ultrastructural immunocytochemical study of the dopaminergic innervation of the rat lateral septum with anti-dopamine antibodies. *Neuroscience* 13 : 385-393.
- Onteniente B., Kimura H., Maeda T. (1982) Electron microscopic study of met-enkephalin-like immunoreactivity in the rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 596
- Onteniente B., Menetrey D., Ryohachi A., Calas A. (1989) Origin of the met-enkephalinergic innervation of the lateral septum in the rat. *Cell Tissue Res.* 256 : 585-592.
- Onteniente B., Simon H., Taghzouti K., Geffard M., Le Moal M., Calas A. (1987) Dopamine-GABA interactions in the nucleus accumbens and lateral septum of the rat. *Brain Res.* 421 : 391-396.
- Onteniente B., Tago H., Kimura H., Maeda T. (1986) Distribution of γ -aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the septal region of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 248 : 422-430.
- Osen K.K. (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J. Comp. Neurol.* 136 : 453-484.
- Panula P., Revuelta A.V., Cheney D.L., Wu J.Y., Costa E. (1984) An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in the rat septum. *J. Comp. Neurol.* 222 : 69-80.
- Phelan K.D., Hasuo H., Twery M.J., Gallagher J.P. (1989a) Projection neurons to the dorsolateral septal nucleus possess recurrent axon collaterals. *Neurosci. Lett.* 97 :259-265.
- Phelan K.D., Sacaan A., Hasuo H., Twery M.J., Wong L.A., Gallagher J.P. (1989b) The morphology and intraseptal connectivity of dorsolateral septal nucleus neurons in the rat. *Anat. Rec.* 223 : 90A.
- Phelan K.D., Twery M.J., Gallagher J.P. (1993) Morphological and electrophysiological evidence for electrotonic coupling of rat dorsolateral septal nucleus neurons *in vitro*. *Synapse* 13 : 39-49.
- Platt J.L., Michael A.F. (1983) Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* 31 : 840-842.
- Poulain D.A., Ellendorf F., Vincent J.D. (1980) Septal connections with identified oxytocin and vasopressin neurones in the supraoptic nucleus of the rat. An electrophysiological investigation. *Neuroscience* 5 : 379-387.
- Poulain D.A., Lebrun C.J., Vincent J.D. (1981) Electrophysiological evidence for connections between septal neurons and the supraoptic nucleus of the hypothalamus of the rat. *Exp. Brain Res.* 42 : 260-268.

- Poulain P.** (1974) L'hypothalamus et le septum de cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 63 : 37-50.
- Poulain P.** (1983) Hypothalamic projection to the lateral septum in the guinea pig. An HRP study. *Brain Res. Bull.* 10 : 309-313.
- Poulain P., Martin-Bouyer L., Beauvillain J.C., Tramu G.** (1984) Study of the efferent connections of the enkephalergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea pig hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunocytochemistry: evidence for a projection to the lateral septum. *Neuroscience* 11 : 331-343.
- Poulin P., Lederis K., Pittman Q.J.** (1988) Subcellular localization and characterisation of vasopressin binding sites in the ventral septal area, lateral septum, and hippocampus of the rat brain. *J. Neurochem.* 50 : 889-898.
- Racine R.J., Milgram N.W., Hafner S.** (1983) Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain. *Brain Res.* 260 : 217.
- Raggenbass M., Dubois-Dauphin M., Tribollet E., Dreifuss J.J.** (1988) Direct excitatory action of vasopressin in the lateral septum of the rat brain. *Brain Res.* 459 :60-69.
- Raggenbass M., Tribollet E., Dreifuss J.J.** (1987) Electrophysiological and autoradiographical evidence of V1 receptors in the lateral septum of the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 7778-7782.
- Raisman G.** (1966) The connections of the septum. *Brain* 89 : 317-348.
- Raisman G.** (1969) A comparison of the mode of termination of the hippocampal and hypothalamic afferents to the septal nuclei as revealed by electron microscopy degeneration. *Exp. Brain Res.* 7 : 317-343.
- Ramon y Cajal** (1909) *Histologie du système nerveux.* Maloine (Ed), Paris, pp 783-797.
- Ramon Moliner E.** (1957) A chlorate-formaldehyde modification of the Golgi method. *Stain Technol.* 32 : 105-116.
- Reaves T.A.J., Hayward J.N.** (1979) Intracellular dye-marked enkephaline neurons in the magnocellular preoptic nucleus of the goldfish hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 6009-6011.
- Rogers J.H.** (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex : co-localization of calretinin and calbindin-D28K with neuropeptides and GABA. *Brain Res.* 587 : 147-157.
- Rogers S.W., Hughes T.E., Hollman M., Gasic G.P., Deneris E.S., Helnemann S.** (1991) The characterization and localization of the glutamate receptor subunit Glu R1 in the rat brain. *J. Neurosci.* 11 : 2713-2724.
- Roland B.L., Sawchenko P.E.** (1993) Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 332 : 123-143.
- Rosenfeld M.G., Mermod J.J., Amara S.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W., Evans R.M.** (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature* 304 : 129-135.
- Rudy B.** (1988) Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neuroscience* 25 : 729-749.
- Sakanaka M., Magari S.** (1989) Reassessment of enkephalin (ENK)-containing afferents to the rat lateral septum with reference to the fine structures of septal ENK fibers. *Brain Res.* 479 : 205-216.
- Sakanaka M., Magari S., Shibasaki T., Lederis K.** (1988) Corticotropin releasing factor-containing afferents to the lateral septum of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 270 : 404-415.
- Sakanaka M., Shibasaki T., Lederis K.** (1987) Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose-oxidase-diaminobenzidine method. *J. Comp. Neurol.* 260 : 256-298.
- Sakanaka M., Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki S., Takagi H., Senba E., Kawai Y., Hara Y., Iio H., Minagawa H., Matsuzaki T., Tohyama M.** (1981) Evidence for the existence of a substance P-containing pathway from the nucleus laterodorsalis tegmenti (Castaldi) to the lateral septal area of the rat. *Brain Res.* 230 : 351-355.
- Sakanaka M., Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki S., Hara Y., Kawai Y., Senba E., Tohyama M.** (1982) Origins of substance-P-containing fibers in the lateral septal area of young rats : immunohistochemical analysis of experimental manipulations. *J. Comp. Neurol.* 212 : 268-277.

- Sakuma Y.** (1992) Suppression of lordosis reflex in the female rat by electrical stimulation of the forebrain and ventral mid-brain. *J. Physiol. (Lond.)*. 446 : 84P.
- Saper C.B., Swanson L.W., Cowan W.M.** (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169 : 409-442.
- Saper C.B., Swanson L.W., Cowan W.M.** (1978) The afferent connections of the anterior hypothalamic area of the rat, cat, and monkey. *J. Comp. Neurol.* 184 :205-242.
- Saper C.B., 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.
- Saphier D., Fellman S.** (1987) Effects of septal and hippocampal stimuli on paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience* 20 : 749-755.
- Sawchenko P.E., Swanson L.W.** (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 218 : 121-144.
- Schwartzkroin P.A., Mathers L.H.** (1978) Physiological and morphological identification of a non-pyramidal hippocampal cell type. *Brain Res.* 154 : 1-10.
- Scharfman H.E., Kunkel D.D., Schwartzkroin P.A.** (1989) Intracellular dyes mask immunoreactivity of hippocampal interneurons. *Neurosci. Lett.* 96 : 23-28.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G.** (1983) Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Meth.* 9 : 229-234.
- Segal M., Landis S.C.** (1974) Afferents to the septal area of the rat studied with the method of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 82 : 263-268.
- Seggie J., Brown G.M.** (1971) Septal lesions and resting adrenal function, a possible explanation of conflicting findings. *Neuroendocrinology* 8 : 367-374.
- Seggie J., Brown G.M.** (1976) The effects of ablation of the septal nuclei in the rat on circadian variation and stress pattern of corticosterone, growth hormone and prolactin. In " the Septal Nuclei". DeFrance J.F. (Ed). Plenum Press, New York, pp 335-344.
- Seggie J., Uhlir I., Brown G.M.** (1973) Adrenal stress responses following septal lesions in the rat. *Neuroendocrinology* 16 : 225-236.
- Seroogy K., Ceccatelli S., Schalling M., Hökfelt T., Frey P., Walsh J., Dockray G., Brown J., Buchan A., Goldstein M.** (1988) A subpopulation of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin. *Brain Res.* 455 : 88-98.
- Seroogy K.B., Fallon J.H.** (1989) Forebrain projections from cholecystokinin like-immunoreactive neurons in the rat midbrain. *J. Comp. Neurol.* 279 : 415-435.
- Seroogy K.B., Mehta A., Fallon J.H.** (1987) Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon : projections to forebrain. *Exp. Brain Res.* 68 : 277-289.
- Sharif N.A., Hughes J.** (1989) Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides : quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides* 10 : 499-522.
- Shimono M., Tsuji N.** (1987) Study of the selectivity of the impregnation of neurons by the Golgi method. *J. Comp. Neurol.* 259 : 122-130.
- Simerly R.B., Swanson L.W.** (1986) The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 246 : 312-342.
- Skotfitsch G., Jacobowitz D.M.** (1985) Calcitonin gene-related peptide : detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides* 721-725.
- Smith B.N., Armstrong W.E.** (1990) Tuberal supraoptic neurons I-Morphological and electrophysiological characteristics observed with intracellular recording and biocytin filling *in vitro*. *Neuroscience* 38 : 469-483.
- Smithson K.G., Cobbett P., McVicar B.A., Hatton G.I.** (1984) A reliable method for immunocytochemical identification of Lucifer yellow injected, peptide containing mammalian central neurons. *J. Neurosci. Meth.* 10 :1-59.

- Sofroniew M.V., Weindl A. (1978)** Projections from the parvocellular vasopressin- and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Anat.* 153 : 391-430.
- Somogyi P., Freund T.F. (1989)** Immunocytochemistry and synaptic relationships of physiologically characterized HRP-filled neurons. In "Neuroanatomical Tract-Tracing Methods 2 - Recent Progress". Heimer L., Zaborszky L. (Eds). Plenum Press, New York, London, pp 239-264.
- Southam E., Garthwaite J. (1991)** Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neurosci. Lett.* 130 :107-111.
- Squirres R.F., Braestrup C. (1997)** Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266 : 732-734.
- Staiger J.F., Nürnberger F. (1989)** Pattern of afferents to the lateral septum of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 257 : 471-490.
- Staiger J.F., Nürnberger F. (1991a)** The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig : projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res.* 264 : 391-413.
- Staiger J.F., Nürnberger F. (1991b)** The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig : intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas. *Cell Tissue Res.* 264 : 415-426.
- Staiger J.F., Wouterlood F.G. (1990)** Efferent projections from the lateral septal nucleus to the anterior hypothalamus in the rat : a study combining Phaseolus-vulgaris-leucoagglutinin tracing with vasopressin immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 261 : 17-23.
- Stefanini M., De Martino C. Zamboni L. (1967)** Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216 : 173-174.
- Stengaard-Pedersen K., Larsson L.I. (1983)** Met-and Leu-enkephalinergic innervation of the lateral septal nucleus. *Brain Res.* 264 : 152-156.
- Stevens D.R., Cotman C.W. (1986)** Excitatory amino acid antagonists depress transmission in hippocampal projections to the lateral septum. *Brain Res.* 382 : 437-440.
- Stevens D.R., Cotman C.W. (1991)** Long-term potentiation of excitatory and slow inhibitory synaptic potentials in the hippocampo-septal projection of the rat. *Brain Res.* 558 : 120-122.
- Stevens D.R., Gallagher J.P., Shinnick-Gallagher P. (1984)** Intracellular recordings from rat dorsolateral septal neurons, in vitro. *Brain Res.* 305 : 353-356.
- Stevens D.R., Gallagher J.P., Shinnick-Gallagher P. (1985)** Further studies on the action of baclofen on neurons of the dorsolateral septal nucleus of the rat in vitro. *Brain Res.* 358 : 360-363.
- Stevens D.R., Gallagher J.P., Shinnick-Gallagher P. (1987)** In vitro studies of the role of γ aminobutyric acid in inhibition in the lateral septum of the rat. *Synapse* 1 : 184-190.
- Stewart M. (1978)** Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* 14 : 741-759.
- Stewart M., Fox S.E. (1990a)** Firing relations of lateral septal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized rats. *Exp. Brain Res.* 79 : 92-96.
- Stewart M., Fox S.E. (1990b)** Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm ? *TINS* 13 :163-169.
- Stoddard-Apter S.L., McDonnell M.F. (1983)** Septal and amygdala efferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamically elicited intra-specific aggression and associated hissing in the cat. An autoradiographic study. *Brain Res.* : 19-32.
- Storm-Mathisen J. (1977)** Localization of transmitter candidates in the brain ; the hippocampal formation as a model. *Prog. Neurobiol.* 8 : 119-185.
- Storm-Mathisen J., Ottersen O.P. (1984)** Neurotransmitters in the hippocampal formation. In "Cortical integration". Reinoso-Swartz F., Ajmone-Marsan C. (Eds). Raven Press, New York, pp 105-130.
- Storm-Mathisen J., Woxen-Opsahl M. (1978)** Aspartate and/or glutamate may be transmitters in hippocampal efferents to septum and hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 9 : 65-70.
- Stuart D.G., Kawamura Y., Hemingway A. (1961)** Activation and suppression of shivering during septal and hypothalamic stimulation. *Expl. Neurol.* 4 :485-506.

- Swanson L.W., Cowan W.M. (1977)** An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172 : 49-84.
- Swanson L.W., Cowan W.M. (1979)** The connections of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 186 : 621-656.
- Swanson L.W., Sawchenko P.E., Cowan W.M. (1980)** Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Res.* 197 : 207-212.
- Taleisnik S., Velasco M.E., Astrada J.J. (1970)** Effect of hypothalamic deafferentation on the control of luteinizing hormone secretion. *J. Endocrinol.* 46 :1-7.
- Thomas E. (1988)** Forebrain mechanisms in the relief of fear : the role of the lateral septum. *Psychobiology* 16 : 36-44.
- Thomas E., Yadin E. (1987)** Neural correlates of conditioning assessed by extracellular unit recording : implications for neuroplasticity. In "Neuroplasticity, learning and memory". Milgram N.W., McCleod C.M., Petit T.L. (Eds). Allan R. Liss, New York, pp 199-229.
- Thomas E., Yadin E., Strickland C.E. (1991)** Septal unit activity during classical conditioning : a regional comparison. *Brain Res.* 547 : 303-308.
- Toth K., Freund T.F. (1992)** Calbindin D28k-containing non pyramidal cells in the rat hippocampus : their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49 : 793-805.
- Tokuno H., Nakamura Y., Kudo M., Kitao Y. (1990)** Effect of Triton X-100 in the Golgi-Kopsch method. *J. Neurosci. Meth.* 35 : 75-77.
- 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 : 2354-237.
- Tribollet E., Dreifuss J.J. (1981)** Localization of neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat: a horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 6 :1315-1328.
- Tribollet E., Armstrong W.E., Dubois-Dauphin M., Dreifuss J.J. (1985)** Extra-hypothalamic afferent inputs to the supraoptic nucleus area of the rat as determined by retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience* 15 : 135-148.
- Tseng G.F., Parada I., Prince D.A. (1991)** Double-labeling with rhodamine beads and biocytin : a technique for studying corticospinal and other projection in vitro. *J. Neurosci. Meth.* 37 : 121-131.
- Twery M.J., Gallagher J.P. (1989)** Somatostatin hyperpolarizes neurons and inhibits spontaneous activity in the rat dorsolateral septal nucleus. *Brain Res.* 497 : 315-324.
- Twery M.J., Gallagher J.P. (1990)** Somatostatin depresses GABA receptor-mediated inhibition in the rat dorsolateral septal nucleus. *Brain Res.* 519 : 277-286.
- Twery M.J., Phelan K.D., Gallagher J.P. (1992)** Spontaneous bursting and non-bursting activity in morphologically identified neurons of the rat dorsolateral septal nucleus in vitro. *Neuroscience* 46 : 669-679.
- Uhl G.R. (1990)** Neurotensin receptors. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol 9, Neuropeptides in the CNS, Part II. Björklund A., Hökfelt T., Kuhar M.J. (Eds), Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp 359-393.
- Unger J.W., Lange W. (1992)** NADPH-diaphorase-positive cell population in the human amygdala and temporal cortex : neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 83 : 636-646.
- Van den Hoof P., Urban I.J.A. (1990)** Vasopressin facilitates excitatory transmission in slices of the rat dorsolateral septum. *Synapse* 5 : 201-206.
- Van den Hoof P., Peppelenbosch M., Urban I.J.A. (1989a)** N-methyl-D-aspartate component in hippocampal transmission to the lateral septum in the rat. *Neurosci. Res. Commun.* 5 : 111-115.
- Van den Hoof P., Urban I.J.A., DeWied D. (1989b)** Vasopressin maintains long-term potentiation in rat lateral septum slices. *Brain Res.* 505 : 181-186.
- Van den Hoof P., Peppelenbosch M., Urban I.J.A. (1990a)** Vasopressin raises the excitability of dorsolateral septum neurons in vitro. *Neurosci. Res. Commun.* 6 : 173-180.

- Van den Hoof P., Seger M.A., Burdach J.P.H., Urban I.J.A. (1990b)** The C-terminal glycopeptide of prorepressophysin potentiates excitatory transmission in the rat lateral septum. *Neuroscience* 37 : 647-653.
- Varoqueaux F. (1991)** Etude des projections du septum latéral vers l'hypothalamus par transport antérograde de Fluoro-Ruby chez le cobaye. DEA Sciences de la Vie et de la Santé (Lille).
- Verney C., Gaspar P., Alvarez C., Berger B. (1987)** Postnatal sequential development of dopaminergic and enkephalinergic perineuronal formations in the lateral septal nucleus of the rat correlated with local neuronal maturation. *Anat. Embryol.* 176 : 463-475.
- Vincent S.R., McIntosh C.H.S., Buchan A.M.J., Brown J.C. (1985)** Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 238 : 169-186.
- Visilakis G.J., Kunz H.W., Gill T.J. (1974)** The effect of gonadectomy on antibody production by inbred rats. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 43 : 109-117.
- Walaas I., Fonnum F. (1980)** Biochemical evidence for glutamate as a transmitter in hippocampal efferents to the basal forebrain and hypothalamus in the rat brain. *Neuroscience* 5 : 1691-1698.
- Wamsley J.K., Gehlert D.R., Filloux F.M., Dawson T.M. (1989)** Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 2 : 119-137.
- Wamsley J.K., Young W.S., Kuhar M.J. (1980)** Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. *Brain Res.* 190 : 153-174.
- Warembourg M., Jolivet A., Milgrom E. (1989)** Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* 480 : 1-15.
- Watts A.G., Swanson L.W., Sanchez-Watts G. (1987)** Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus : I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258 : 204-229.
- Westenbroek R.E., Ahljanian M.K., Catterall W.A. (1990)** Clustering of L-type Ca⁺⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurones. *Nature* 347 : 281-284.
- Wetmore L., Nance D.M. (1991)** Differential and sex-specific effects of kainic acid and domoic acid lesions in the lateral septal area of rats on immune function and body weight regulation. *Exp. Neurol.* 113 : 226-236.
- Willott J.F., Bross L.S. (1990)** Morphology of the octopus cell area of the cochlear nucleus in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *J. Comp. Neurol.* 300 : 61-81.
- Witter M.P., Daelmans H.E.M., Jorritsma-Byham B., Staiger J.F., Wouterlood F.G. (1992)** Restricted origin and distribution of projections from the lateral to the medial septal complex in rat and guinea pig. *Neurosci. Lett.* 148 : 164-168.
- Woodhams P.L., Roberts G.W., Polak J.M., Crow T.J. (1983)** Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat : the bed nucleus of the stria terminalis, septum and preoptic area. *Neuroscience* 8 : 677-703.
- Wouterlood F.G., Gaykema R.P.A., Steinbush H.W.M., Watanabe T., Wada H. (1988)** The connections between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Neuroscience* 26 : 827-845.
- Wouterlood F.G., Mugnaini E. (1984)** Cartwheel neurons of dorsal cochlear nucleus : a Golgi-electron microscopic study in rat. *J. Comp. Neurol.* 227 : 136-157.
- Yadin E., Thomas E. (1981)** Septal correlates of conditioned inhibition and excitation. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95 : 331-340.
- Yadin E., Thomas E., Grishkat H.L., Strickland C.E. (1993)** The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol. Behav.* 53 : 1077-1083.
- Yamanouchi K., Arai Y. (1990)** The septum as origin of a lordosis-inhibiting influence in female rats : effects of neural transection. *Physiol. Behav.* 48 : 351-355.
- Yamamoto C. (1973)** Propagation of after discharges elicited in thin brain sections in artificial media. *Exp. Neurol.* 40 : 183-188.

Zaczek R., Hedreen J.C., Coyle J.T. (1979) Evidence for a hippocampal-septal glutamatergic pathway in the rat. *Exp. Neurol.* 65 : 145-156.

Zheng F., Gallagher J.P. (1991) Trans-ACPD (trans-D, L-1-amino-1, 3-cyclopentanedicarboxylic) elicited oscillation of membrane potentials in rat dorsolateral septal nucleus neurons recorded intracellularly in vitro. *Neurosci. Lett.* 125 : 147.

Zheng F., Gallagher J.P. (1992) Metabotropic glutamate receptors are required for induction of long-term potentiation. *Neuron* 9 : 163-172.

Résumé

Par leur situation au sein du complexe hippocampo-septo-hypothalamique, les neurones du septum latéral sont potentiellement impliqués dans la modulation d'informations nerveuses provenant des centres cérébraux supérieurs et dans le transfert de ces informations vers des régions impliquées dans des fonctions neuroendocrines. L'étude de ces neurones a été réalisée chez le cobaye en associant des techniques morphologiques et électrophysiologiques.

La diversité des fibres et des terminaisons nerveuses afférentes au septum latéral, démontrée par immunocytochimie avec des anticorps dirigés contre la somatostatine, la neurotensine, la tyrosine hydroxylase, la vasopressine, la met-enképhaline, traduit les influences multiples relayées par cette structure. Des populations spécifiques de neurones contenant le GABA, la calbindin-D28K, la NADPH-diaphorase ont été détectées par des méthodes immunocytochimiques et histochimiques. La présence des deux dernières substances dans les neurones est à relier à une action protectrice qu'elles exerceraient vis-à-vis des influences glutamatergiques provenant de l'hippocampe.

Des techniques d'enregistrement et de marquage intracellulaires ont été utilisées sur des tranches de septum latéral maintenues en survie. Les résultats électrophysiologiques (n=174) montrent l'existence de 3 catégories principales de neurones. Les 2 classes majoritaires (79,3%) sont caractérisées par des potentiels d'action calciques haut-seuil qui apparaissent sans que les conductances potassiques entrantes n'aient à être bloquées. Les décharges d'une de ces deux classes suggèrent des enregistrements intradendritiques. Les résultats morphologiques ont été obtenus à l'échelle optique et électronique après injection de peroxydase ou de biocytine dans les neurones étudiés (n=36). Ils permettent d'associer les neurones identifiés sur le plan électrophysiologique comme appartenant aux 2 classes majoritaires à un type neuronal commun, caractérisé par des corps cellulaires de grande taille, des épaissements dendritiques et des épines dendritiques (83% des neurones injectés). Une sous-population de ces neurones présente des épines somatiques et est immunoréactive pour la calbindin-D28K. En cela, ils sont semblables aux neurones décrits chez le rat comme recevant l'innervation de l'hippocampe. Certains neurones sont entourés par des terminaisons enképhalinerigiques, provenant de neurones hypothalamiques, ce qui suggère le rôle modulateur des enképhalines dans les processus d'intégration nerveuse à l'articulation hippocampo-hypothalamique.

MOTS-CLÉS :

Septum Latéral

Immunocytochimie

Injections intracellulaires

Cobaye

Electrophysiologie