50376 1993 368 50376 1993 368

## UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

#### ANNEE UNIVERSITAIRE 1992-1993

Nº d'ordre 1232

## THESE

présentée à

#### L'UNIVERSITE DE LILLE I

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE OPTION: Neurosciences

par

HILLE \*

# Isabelle DUTRIEZ

## DISTRIBUTION DES RECEPTEURS DE LA GALANINE DANS LE CERVEAU DE COBAYE: ARGUMENTS MORPHOLOGIQUES EN FAVEUR D'UNE ACTION LOCALE AU NIVEAU DE L'EMINENCE MEDIANE.

Soutenue le 16 Décembre 1993 devant le Jury composé de:

Rapporteurs:

Directeur de thèse:

Examinateurs:

Madame le Professeur Nicole SALES Monsieur le Docteur Jacques EPELBAUM Monsieur le Professeur André DHAINAUT Monsieur le Professeur Marc-Pierre MAZZUCA Monsieur le Docteur Jean-Claude BEAUVILLAIN

# AVANT PROPOS

A mes Grands-Parents, A mes Parents, Et à tous mes proches,

Qui par leur présence, leur gentillesse et leurs paroles, m'ont permis de réaliser ce que j'avais entrepris. "La Recherche est le facteur essentiel des progrès humains et de la lutte contre tous les fléaux" - Jacques Servier (1991).

Depuis le début du XXème siècle, le domaine des neurosciences a été marqué par la découverte de nouveaux groupes de médicaments et l'explosion des connaissances sur le fonctionnement du cerveau. Ces deux axes sont intimement liés.

Aujourd'hui, il est clair que la neurotransmission résulte d'un transfert d'information entre des macromolécules neuronales constitutives capables de reconnaître des messagers chimiques et de traduire le contenu du message.

L'une des plus grandes découvertes de ces dernières années est la profusion de neuropeptides dans le système nerveux central. De multiples expérimentations sont envisagées pour définir la signification fonctionnelle de ces neuropeptides.

L'étude que j'ai entreprise dans le cadre de ce travail à l'Unité de Neuroendocrinologie Cellulaire INSERM 156 du Professeur M. Mazzuca s'inscrit dans ce contexte.

Un peu à l'image de Solomon Snyder, "j'ai appris par quels sentiments de frustration il fallait passer avant de maîtriser l'exécution d'un morceau de musique et, plus tard, je n'ai pas été surpris de rencontrer des obstacles analogues au cours de mes recherches. J'ai aussi appris la joie transcendante que l'on éprouve lorsque l'on réussit à formuler une idée nouvelle. Cette joie existe aussi bien en musique qu'en science." - 1987. Au moment où s'achève cette thèse, j'aimerais adresser mes remerciements les plus vifs,

- A Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain, pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour les compétences scientifiques dont il m'a fait profiter et pour son suivi qui a permis l'achèvement de ce passionnant travail.

- A Monsieur le Professeur Marc Mazzuca, qui m'a accueillie au sein de son unité de Recherche et très gentiment prodigué aide et conseils.

- A Madame le Professeur Nicole Salès, qui a accepté de s'intéresser une nouvelle fois à mon travail et me fait l'honneur et la très grande joie d'être mon rapporteur.

- A Monsieur le Docteur Jacques Epelbaum, qui a été l'un des catalyseurs de ce travail en permettant une collaboration avec l'Unité INSERM 159 et qui a eu la gentillesse d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.

- A Monsieur le Professeur André Dhainaut, qui après m'avoir transmis sa passion pour les Sciences et la Recherche pendant mon cursus universitaire, me fait l'honneur de juger ce travail.

- A Monsieur le Professeur Bernard Lassalle, qui a permis de donner un sens aux images.

- A Monsieur le Professeur Pierre Formstecher, pour tous les conseils qu'il m'a apportés quant à l'analyse biochimique de mon travail.

- A Madame Danièle Deneux et à Monsieur André Pillez qui m'ont apporté leur aide précieuse en participant à la réalisation de ce travail et à qui j'exprime ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

- A l'éminent Monsieur Noé dont la sagesse légendaire est pour une grande part dans la réalisation de ce travail.

- Enfin, j'exprime toute ma sympathie aux membres: chercheurs, étudiants et personnel technique et administratif du laboratoire, mais aussi de l'ex-Unité 16 et du laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine.

# SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	20
GENERALITES	28
1 - Les différentes formes de la galanine	29
1-1. Découverte	29
1-2. Synthèse	29
1-3. Structure	31
1-4. Formes moléculaires	31
2 - Les récepteurs de la galanine	34
2-1. Identification	34
2-2. Caractérisation	35
2-3. Relation structure-activité	35
2-4. Transduction membranaire du signal lié à la galanine	36
2-5. Mécanismes moléculaires d'action de la galanine sur	
les récepteurs de type GAL-R <sub>1</sub>	38
3 - Distribution de la galanine et de ses récepteurs	41
3-1. Distribution du peptide galanine	41
3-2. Distribution des récepteurs de la galanine	45
3-3. Corrélation des données anatomiques et	
radioautographiques	50
4 - Coexistence de la galanine avec d'autres neuropeptides	
et neurotransmetteurs: Notions d'actions biologiques	51
4-1. Cerveau basal antérieur	51
4-2. Hypothalamus	53
4-3. Tronc cérébral	54
4-4. Moëlle épinière	55

MATERIELS ET METHODES 5		
1 - Sujets expérimentaux		
1-1. Animaux, conditions d'élevage	58	
1-2. Sacrifice	58	
2 - Macroradioautographie quantitative	59	
2-1. Choix du radioligand	59	
2-2. Synthèse du radioligand	60	
2-3. Préparation des tissus	61	
2-4. Technique de liaison	62	
2-5. Radioautographie	62	
2-6. Analyse des résultats	63	
2-7. Détermination des conditions d'utilisation du ligand	64	
2-8. Localisation radioautographique des récepteurs de la		
galanine dans le cerveau de Cobaye	75	
3 - Immunocytochimie	76	
3-1. Préparation des tissus	76	
3-2. Préparation des anticorps	77	
3-3. Réactions immunocytochimiques	78	
3-4. Observations	79	
4 - Radioautographie à l'échelle ultrastructurale	80	
4-1. Choix du radioligand	80	
4-2. Synthèse du radioligand	81	
4-3. Conditions d'utilisation du radioligand	81	
4-4. Détermination des conditions de préfixation	81	
4-5. Traitement des tissus	84	
4-6. Technique de liaison	84	
4-7. Traitement histologique des tranches	85	
4-8. Radioautographie des coupes semi-fines	85	
4-9. Radioautographie à haute résolution	86	
4-10. Analyse des radioautographies	86	

### RESULTATS

1 - Distribution des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye	90
1-1. Localisation des récepteurs	90
1-2. Analyse quantitatives des données radioautographiques	92
dans le cerveau de Cobave	96
1-4. Effets de Mg2+/GTP sur l'expression des récepteurs	
de la galanine	102
2 - Immunocytochimie de la galanine dans l'hypothalamus	115
2-1. Aire préoptique	115
2-2. Noyau paraventriculaire	118
2-3. Noyau arqué	118
2-4. Eminence médiane	118
2-5. Comparaison de la distribution du GnRH et de la	
galanine dans l'aire préoptique et dans l'éminence médiane	118
2-6. Comparaison de la distribution du GRF et de la galanine	
dans le noyau arqué	121
3 - Localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine	
dans l'éminence médiane: Etude chez le Cobaye et le Rat	124
3-1. Localisation des sites de liaison de la $125$ I-galanine	
dans l'éminence médiane de Cobaye	125
3-1.1. en absence de $Mg^{2+}/GTP$	125
3-1.2. en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	132
3-1.3. comparaison de la distribution de grains	
spécifiques en absence et en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	138
3-2. Localisation des sites de liaison de la $125$ I-galanine	
dans l'éminence médiane de Rat	139
3-2.1. en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	139
3-2.2. en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	144
3-2.3. comparaison de la distribution de grains	
spécifiques en absence et en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	148

DISCUSSION	149
1 - Les récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye: Distribution radioautographique des sites de liaison	150
2 - Caractérisation des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye	152
3 - Localisation des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye: Comparaison avec les autres espèces	154
<ul> <li>3-1. Aspects généraux de la cartographie des récepteurs la galanine établie avec la <sup>125</sup>I-galanine</li> <li>3-2. Distribution comparative des récepteurs de la galanine</li> </ul>	154
dans le cerveau de Cobaye et des autres mammifères 3-3. Synthèse	155 162
4 - Mise en évidence d'un couplage des récepteurs de la galanine a	vec
des protéines G chez le Cobaye: Influence des guanylnucléotides	167
5 - Distribution de la galanine dans l'hypothalamus de Cobaye	173
5-1. Considérations méthodologiques	173
5-2. Distribution de la galanine: Comparaison inter-espèce	173
5-2.1. Aire préoptique	173
5-2.2. Novau paraventriculaire	174
5-2.3. Novau arqué	175
5-2.4. Eminence médiane	176
5-3. Distribution comparative du peptide et de ses récepteur	s:
Comparaison inter-espèce	176
5-4. Implications fonctionnelles	177
5-4.1. Effets comportementaux:	
Stimulation de la prise alimentaire	177
5-4.2. Rôle de la galanine dans la régulation de la	
sécrétion des hormones gonadotropes	178
5-4.3. Rôle de la galanine dans la régulation de la	
la sécrétion de la prolactine	178
5-4.3. Rôle de la galanine dans la régulation de la	
sécrétion de l'hormone de croissance	179

6 - Localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine dans	
l'éminence médiane: Etude comparative chez le Cobaye et le Rat	
6-1. Considérations méthodologiques	180
6-2. Localisation des récepteurs de la galanine	182
6-3. Influence des guanylnucléotides	183
6-4. Implications fonctionnelles	184

# CONCLUSION

186

189

## BIBLIOGRAPHIE

6

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

# **FIGURES**

Fig.1 - Comparaison des différentes séquences de galanine chez les mammifères et le poulet	30
Fig.2 - Représentation schématique de la préprohormone de la galanine porcine, bovine, de rat et humaine	32
Fig.3 - Mécanisme d'action de la galanine au niveau cellulaire	39
Fig.4 - Iodation de la galanine: Profil d'activité des fractions	61
Fig.5 - Cinétique de liaison de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison spécifique en absence et en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	65
Fig.6 - Cinétique de liaison de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison totale et non-spécifique en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	66
Fig.7 - Cinétique de liaison de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison totale et non-spécifique en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	67
Fig.8 - Courbes de saturation de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison spécifique en absence et en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	69
Fig.9 - Courbes de saturation de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison totale et non-spécifique en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	70
Fig.10 - Courbes de saturation de la <sup>125</sup> I-galanine: liaison totale et non-spécifique en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	71
Fig.11 - Graphes de Scatchard de liaison de la <sup>125</sup> I-galanine en absence et en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	72
Fig.12 - Effets de différentes préfixations de coupes de cerveau de Cobaye contenant l'éminence médiane sur la liaison de la <sup>125</sup> I-galanine	83
<ul> <li>Fig.13 - Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie in vitro sur coupes frontales de cerveau de Cobaye: liaison totale et non-spécifique en présence (A) et en absence (B) de Mg<sup>2+</sup>/GTP</li> </ul>	91
	1

Fig.14 - Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie in vitro sur coupes frontales de cerveau de Cobaye	97
Fig.15 - Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie in vitro sur coupes frontales de cerveau de Cobaye	99
Fig.16 - Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie in vitro sur coupes frontales de cerveau de Cobaye	101
Fig.17 - Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie in vitro sur coupes frontales de cerveau de Cobaye	103
Fig.18 - Histogrammes comparatifs de liaison de la 125 <sub>I</sub> - galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le rhinencéphale et le tractus du télencéphale de Cobaye	105
Fig.19 - Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup> I- galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le télencéphale de Cobaye	106
Fig.20 - Histogrammes comparatifs de liaison de la 125 <sub>I</sub> - galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le système limbique de Cobaye	107
Fig.21 - Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup> I- galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le thalamus de Cobaye	109
Fig.22 - Histogrammes comparatifs de liaison de la 125 <sub>I</sub> - galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans l'hypothalamus de Cobaye	110
Fig.23 - Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup> I- galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le mésencéphale de Cobaye	112

Fig.24 - Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup> I- galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP dans le rhombencéphale de Cobaye	113
Fig.25 - Localisation de l'immunoréaction de la galanine dans l'aire préoptique du Cobaye: Relations galanine-GnRH	116
Fig.26 - Localisation de l'immunoréaction de la galanine dans le noyau paraventriculaire, le noyau arqué et l'éminence médiane de Cobaye	117
Fig.27 - Double marquage sur une même coupe avec un anti-galanine et un anti-GnRH dans l'éminence médiane de Cobaye (X 120)	119
Fig.28 - Double marquage sur une même coupe avec un anti-galanine et un anti-GnRH dans l'éminence médiane de Cobaye (X 500)	120_
Fig.29 - Marquage sur coupes adjacentes avec un anti-GRF et un anti-galanine dans le noyau arqué de Cobaye	122
Fig.30 - Coupes semi-fines d'éminence médiane de Cobaye incubées avec la <sup>125</sup> I-galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	126
Fig.31 - Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye de sites de liaison de la 125I-galanine en absence de Mg2+/GTP	131
Fig.32 - Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye de sites de liaison de la 125I-galanine en présence de Mg2+/GTP	137
Fig.33 - Coupes semi-fines d'éminence médiane de Rat incubées avec la <sup>125</sup> I-galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	140
Fig.34 - Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat de sites de liaison de la 125I-galanine en présence de Mg2+/GTP	147

# TABLEAUX

Tableau 1 - Localisation des corps cellulaires, fibres/terminaisons	
nerveux central de Rat	48
Tableau 2 - Colocalisation de la galanine avec d'autres	52
transmetteurs dans ie systeme herveux central du Rat	52
Tableau 3 - K <sub>D</sub> et Bmax de la <sup>125</sup> I-galanine en présence et en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP de différentes régions du cerveau de Cobave	74
	, ,
Tableau 4 - Quantification des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye	93
Tableau 5 - Distribution comparative de grains d'argent réels totau	IX.
non-spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	128
Tableau 6 - Distribution comparative de grains d'argent réels	
spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Cobaye en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	128
Tableau 7 - Distribution comparative de grains d'argent réels totau	IX,
non-spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Cobaye en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	134
Tableau 8 - Distribution comparative de grains d'argent réels	
spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Cobaye en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	134
Tableau 9 - Distribution comparative de grains d'argent réels totau	ıx,
non-spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Rat en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	142
Tableau 10 - Distribution comparative de grains d'argent réels	
spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Rat en absence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	142

Tableau 11 - Distribution comparative de grains d'argent réels to	
non-spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'éminence médiane de Rat en présence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	145
Tableau 12 - Distribution comparative de grains d'argent réels	
spécifiques et hypothétiques dans la zone externe de	
l'eminence mediane de Rat en presence de Mg <sup>2+</sup> /GTP	145
Tableau 13 - Comparaison des densités de sites de liaison de la	
125I-galanine détectés chez le Rat, le Singe, l'Homme et	
le Cobaye	156

ABREVIATIONS

nerf optique
noyau oculomoteur principal
troisième ventricule
quatrième ventricule
sérotonine (5-hydroxytryptamine)
noyau facial
nerf facial ou racine du nerf facial

Α	
AA	noyau trigéminal accessoire
AC	adénylate cyclase
AC	noyau commissural antérieur
ac	commissure antérieure
aca	commissure antérieure, partie antérieure
Acb	noyau accumbens
Acg	cortex cingulé antérieur
ACo	noyau amygdaloïde cortical antérieur
acp	commissure antérieure, partie postérieure
AD	noyau thalamique antérodorsal
AHy	aire hypothalamique antérieure
Ala	alanine
AM	noyau thalamique antéromédiant
AO	noyau olfactif antérieur
AOB	bulbe olfactif accessoire
AOP	noyau olfactif antérieur, partie postérieure
APit	lobe antérieur de l'hypophyse
APT	aire antérieure prétectale
Arc	noyau arqué hypothalamique
Arg	arginine
ARNm	acide ribonucleique messager
asc/	fibres ascendantes du nert fascial
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
ATP	adenosine triphosphate
AV	noyau thalamique anteroventral
B	
B	cellules du novau basal de Mevnert
BAC	novau du lit de la commissure antérieure
bas	artère basilaire
bic	brachium du collicule inférieur
BL	novau amygdaloïde basolatéral
BM	noyau amygdaloïde basomédian
bsc	brachium du collicule supérieur

sérum albumine bovine BSA

BST

noyau du lit de la strie terminale noyau du lit de la strie terminale, partie latérale BSTL

BSTM

noyau du lit de la strie terminale, partie médiane noyau du lit de la strie terminale, partie préoptique **BSTPO** 

C	
C1	crus 1 du lobule ansiforme
C2	crus 2 du lobule ansiforme
ČA1	champ CA1 de la come d'Ammon
$C\Delta^2$	champ CA2 de la corne d'Ammon
	champ CA2 do la come d'Ammon
CAS	champ CA3 de la come d'Aminon
CA4	champ CA4 de la come d'Ammon
CAB	cerveau basal antérieur
CB	ponts cellulaires entre le caudé putamen et le tubercule olfactif
Cb	cervelet
CC	corps calleux
ČČK	cholécystokinine
C	noveu emugdeloïde central
	noyau any guaroluc contral
	substance grise centrale (pertaqueducale)
CGM	substance grise centrale, partie mediane
cpm	coups par minute
CGRP	calcitonin gene-related peptide
Cl	claustrum
CLi	novau linéaire caudal (central) du raphé
CM	novau thalamique médian central
CIVI on	nédongule cérébral partie basale
CP CP-	peuolicule cerebrai, partie basale
CPU	caude putamen (striatum)
CRF	corticotropin-releasing factor
CSC	commissure du collicule supérieur
CxA	zone de transition cortex-amygdale
_	
D	
DA	aire hypothalamique dorsale
DCo	novau cochléaire dorsal
DG	gyrus denté
DL	novau de Darkchewitsch
	noyau de Darkenewitsen
	noyau nypomatamique doisomedian
DMH	
DR	noyau dorsal du raphé
DSIP	delta sleep-inducing peptide
DTg	noyau tegmentaire dorsal (Gudden)
U	
E	
Е	couche épendymaire et subépendymaire
eml	lamina médullaire externe
En	novau endoniriforme
Ent	noyau chuophinoinic
EP	noyau entopedonculaire
F	
t T	forniv
	ionità institute e contra de Classica de C
FIIC	isotniocyanate de fluoresceine
tmi	forceps mineur du corps calleux
fmj	forceps majeur du corps calleux
Fr	cortex frontal
fr	fasciculus retroflexus (tractus habénulointerpédunculaire)
FrPaM	cortex frontonariétal aire motrice
EStr	fundue stricti
1.20	1011005 50180

•

G GABA Gal GH Gln Gly GMAP GnRH GP GRF GTP	noyau gélatineux du thalamus acide gamma-amino-butyrique galanine homorne de croissance glutamine glycine polypeptide associé au message de la galanine growth-hormone-releasing hormone globus pallidus growth-hormone-releasing factor guanosine 5'-triphosphate
H hbc HDB His HSA	commissure habénulaire noyau du bras horizontal de la bande diagonale (Broca) histidine sérum albumine humaine
I I IC ic ICj IF Ile IMCPC InC IO IPC IPIP IPIT IPP	noyaux intercalés de l'amygdale collicule inférieur capsule interne îlots de Calleja noyau interfasciculaire isoleucine noyau magnocellulaire interstitiel de la commissure postérieure noyau interstitiel deCajal olive inférieure noyau interpédonculaire, partie centrale noyau interpédonculaire, partie interne du subnucleus postérieur lobe intermédiaire de l'hypohyse noyau interpédonculaire, partie paramédiane
L La LC LD LDTg Leu LH LH LH LH LH LM LOT LOTD LP LPO LSD LSI LSO LSV LV LVe	noyau amygdaloïde latéral locus coeruleus noyau thalamique dorsolatéral noyau tegmental dorsolatéral leucine aire hypothalamique latérale noyau habénulaire latéral noyau mamillaire latéral noyau du tractus olfactif latéral, tractus dorsal noyau du tractus olfactif latéral, tractus dorsal noyau du tractus olfactif latéral, tractus dorsal noyau thalamique postérieur latéral (pulvinaire) aire préoptique latérale noyau septal latéral, partie dorsale noyau septal latéral, partie intermédiaire olive supérieure latérale noyau septal latéral, partie ventrale ventricule latéral noyau vestibulaire latéral

Lys lysine

Μ	
MD	noyau thalamique médiodorsal
MDL	noyau thalamique médiodorsal, partie latérale
ME	éminence médiane
Me	noyau médian amygdaloïde
MG	noyau médian géniculé
MGD	noyau médian géniculé, partie dorsale
MGM	noyau géniculé médian, partie médiane
MGV	noyau géniculé médian, partie ventrale
MHb	noyau habénulaire médian
ML	noyau médian mamillaire, partie latérale
ml	lemniscus medialis
mlf	fascicule longitudinal médian
MM	novau mamillaire médian, partie médiane
MnR	novau du raphé médian (central supérieur)
Mo5	novau trigéminal moteur
MP	novau mamillaire médian, partie postérieure
mp	pédoncule mamillaire
MPO	aire préoptique médiane
MS	novau septal médian
MSO	olive supérieure médiane
MT	novau terminal médian du tractus ontique accessoire
mt	tractus mamillothalamique
mta	tractus mamillotegmental
MVe	novau vestibulaire médian
	noyau vestibularie median
NI	
IN .	
NPY	neuropeptide Y
NS	liaison non-spécifique
0	
OC	chiasma optique
Op	couche du nerf optique du collicule supérieur
OPT	noyau prétectal olivaire
opt	tractus optique
OsO4	tétroxyde d'osmium
ОТ	novau du tractus optique
ŎV	ventricule olfactif (partie olfactive du ventricule latéral)
	······································
D	
I De	nouse hunsthalani and normanti sulaine
Pa DoMC	noyau nypoinalamique paraventriculaire
PalVIC	noyau nypoinalamique paraventriculaire, partie magnocellulaire
Parc	noyau nypoinaiamique paraveniriculaire, partie parvocellulaire
PB	noyau paraoigeminai
PC	noyau inalamique paracentral
pc	commissure posterieure
rUg	cortex cingule posterieur
PCIC	noyau pericentral du collicule inférieur
PCRt	noyau reticulaire parvocellulaire
re	noyau nypotnalamique periventriculaire
PF	noyau thalamique parafasciculaire
PFI	paratiocculus
PGi	noyau réticulaire paragigantocellulaire
PGMP	peptide message prégalanine
PH	noyau hypothalamique postérieur

Phe PHI PIR PMD	phénylalanine peptide histidine isoleucine cortex piriforme noyau prémamillaire, partie dorsale
PN	noyau premaninane, partie ventrale
Pn	noyau parangra
Po	groupe nucléaire thalamique postérieur
PPit	lobe postérieur de l'hypohyse
PPT	noyau prétectal postérieur
PR	champ prérubral
Pr5	noyau trigéminal sensoriel principal
PrH	noyau hypoglossal prepositus
Pro	proline
PT	noyau thalamique paraténial
PVA	noyau thalamique paraventriculaire, partie antérieure
ру	tractus pyramidal

#### R

R	noyau rouge
RCh	aire rétrochiasmatique
Re	noyau thalamique reuniens
Rh	noyau thalamique rhomboïde
RIA	dosage radioimmunologique
RLi	noyau linéaire rostral du raphé
RMC	noyau rouge, partie magnocellulaire
RMg	noyau magnus du raphé
ROĐ	noyau obscurus du raphé
RPa	noyau du plancher du raphé (raphé postpyramidal)
RPC	noyau rouge, partie parvocellulaire
RPn	noyau pontin du raphé
RR	noyau rétrorubral
RRF	champ rétrorubral
rs	tractus rubrospinal
Rt	noyau thalamique réticulaire
RtTg	noyau réticulotegmental du pont
S	
Š	liaison spécifique
	• •

5	naison speenique
s5	racine sensorielle du nerf trigéminal
SC	collicule supérieur
SCh	noyau suprachiasmatique
SFi	novau septofimbrial
SFO	organe subfornical
SG	novau thalamique supragéniculé
SHi	novau septohippocampique
SHv	novau septohypothalamique
sm	strie médullaire du thalamus
SNC	substance noire, partie compacte
SNL	substance noire, partie latérale
SNR	substance noire, partie réticulaire
SO	novau hypothalamique supraoptoque
Sol	novau du tractus solitaire
sor	novau hypothalamique supraoptique, partie rétrochiasmatique (diffuse)
SOX	décussation supraontique
sp5	tractus spinal du nerf trigéminal
<b>▲</b> =	1

Sp5I Sp5O SPF st STh Su7 SuG SuM sumx SuVe	noyau du tractus spinal du nerf trigéminal, partie interpolaire noyau du tractus spinal du nerf trigéminé, partie orale noyau thalamique subparafasciculaire strie terminale noyau subthalamique noyau suptafacial couche grise superficielle du collicule supérieur noyau supramamillaire décussation supramamillaire noyau vestibulaire supérieur
T T tfp TH Thr TMC to TO TOL TOL TRH Trp TT Tu Tyr tz	liaison totale fibres transverses du pont tyrosine hydroxylase thréonine noyau hypothalamique magnocellulaire tubaire tractus olfactif tubercule olfactif tractus olfactif latéral thyrotropin-releasing hormone tryptophane taenia tecta (rudiment hippocampique antérieur) tubercule olfactif tyrosine corps trapézoïde
v	

Val	valine
VCo	noyau cochléaire ventral
VCoA	noyau cochléaire ventral, partie antérieure
VDB	noyau du bras vertical de la bande diagonale (Broca)
VLG	noyau géniculé ventrolatéral
VLGMC	noyau géniculé ventrolatéral, partie magnocellulaire
VLGPC	noyau géniculé ventrolatéral, partie parvocellulaire
VLL	noyau ventral de la lemniscus latérale
VM	noyau hypothalamique ventromédian
VP	pallidum ventral
VPL	noyau thalamique ventropostérieur, partie latérale
VPM	noyau thalamique ventropostérior, partie médiane
VPPC	noyau thalamique ventropostérieur, partie parvocellulaire
VTA	aire tegmentale ventrale

# X

X <sup>2</sup>	test statistique de chi carré
xscp	décussation du pédoncule cérébellaire supérieur

Z Zi

zone incerta

INTRODUCTION

La galanine a été initialement identifiée comme un peptide de vingt neuf acides aminés à partir d'extraits d'intestin de porc (Tatemoto et coll., 1983). L'absence d'homologie de séquence significative avec les autres peptides connus, et l'existence d'actions biologiques du peptide, ont permis dès lors d'établir qu'il s'agissait vraisemblablement du premier représentant connu d'une nouvelle famille de peptides biologiquement actifs. L'étude de ses fonctions physiologiques, compte tenu de sa singularité structurale, représente un domaine de recherche particulièrement important. De fait, l'essentiel des travaux menés jusqu'ici est consacré à la localisation de la galanine afin d'orienter l'investigation de ses potentialités physiologiques.

Les études menées dans ce domaine ont montré que le peptide est largement distribué dans le système nerveux central et périphérique chez plusieurs vertébrés (Rökaeus et coll., 1984; Melander et coll., 1985, 1986a ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Rökaeus, 1987 ; Beal et coll., 1988 ; Parsons et coll., 1989 ; Holmqvist et Ekström, 1991 ; Vallarino et coll., 1991), dont l'Homme (Bauer et coll., 1986a, b ; Gentleman et coll., 1989 ; Shimosegawa et coll., 1992) et chez des invertébrés (Roberts et coll., 1989; Lundquist et coll., 1991). La localisation de la galanine par immunohistochimie a été spécialement étudiée chez le Rat. Le peptide est présent dans le cerveau et la moëlle épinière, ainsi que dans plusieurs systèmes et organes périphériques: système respiratoire, système gastrointestinal, pancréas, système uro-génital et surrénales. Des taux très élevés de galanine sont détectés dans le tube digestif mais des concentrations encore plus importantes apparaissent dans le système nerveux central en particulier dans le bulbe rachidien, l'hypothalamus, l'éminence médiane et la neurohypophyse (Rökaeus et coll., 1984 ; Ch'ng et coll., 1985 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985).

Les multiples effets physiologiques de la galanine sont médiés par l'interaction du peptide avec des sites de reconnaissance membranaires. Peu après sa découverte, alors qu'on ne connaissait rien de sa régulation et presque rien sur le mécanisme d'action de la galanine au niveau intracellulaire, une description préliminaire de la distribution de son récepteur dans le cerveau de Rat était effectuée (Melander et coll., 1986b;

Skofitsch et coll., 1986). Presque simultanément, le récepteur de la galanine était caractérisé dans le pancréas endocrine (Amiranoff et coll., 1987) et dans le cerveau de Rat (Servin et coll., 1987). Une seule classe de sites de liaison de haute affinité du peptide a été mise en évidence (Amiranoff et coll., 1987; Servin et coll., 1987), dont le couplage à une protéine de liaison des guanylnucléotides, ou protéine-G, a été démontré chez le Rat (Dunne et coll., 1989 ; Lagny-Pourmir et coll., 1989a ; Amiranoff et coll., 1992). Dans le système nerveux central des mammifères, la détection radioautographique de ce récepteur a été étudiée chez le Rat (Melander et coll., 1986b, 1988 ; Skofitsch et coll., 1986 ; Fisone et coll., 1987, 1989a, b ; Bonnefond et coll., 1990), le Singe et l'Homme (Köhler et coll., 1989a, b, 1990; Bonnefond et coll., 1990). Plus récemment, des études ont également été envisagées dans le système nerveux central du Saumon (Holmqvist et Carlberg, 1992) et chez la Mouche (Johard et coll., 1992). Les densités les plus élevées de récepteurs sont détectées dans le système nerveux central: locus coeruleus, hippocampe ventral, complexe amygdaloïde, septum latéral et plus particulièrement dans l'hypothalamus.

Très récemment, Wynick et collaborateurs (1993a) ont caractérisé un récepteur de type GAL- $R_2$  différent du récepteur de la galanine connu jusqu'alors (GAL- $R_1$ ). Le récepteur GAL- $R_2$  serait exclusivement exprimé dans l'adénohypophyse et dans l'hypothalamus (Wynick et coll., 1993a), mais cette étude récente reste encore à confirmer et à préciser.

Chez les mammifères, la localisation des récepteurs de la galanine, GAL-R<sub>1</sub>, réalisée essentiellement chez le Rat par radioautographie qualitative et quantitative correspond sensiblement à la distribution d'ensemble du peptide. Cependant des discordances apparaissent dans certaines régions.

Depuis sa découverte en 1983, de nombreuses investigations physiologiques et pharmacologiques, corrélées aux données anatomiques, ont démontré que la galanine affecte diverses fonctions. Tatemoto et collaborateurs (1983) ont tout d'abord mis en évidence qu'en périphérie la galanine avait un effet hyperglycémiant et qu'elle était dotée d'effets sur la contractilité de l'intestin et de la vessie chez le Chien. Des études relatives à ces travaux ont été réalisées sur les fonctions de la galanine dans le pancréas endocrine et sur le muscle lisse (McDonald et coll., 1985 ; Delvaux et coll., 1991). Les données de la littérature font apparaître la galanine comme un messager du système nerveux autonome et du système nerveux intrinsèque de divers organes et glandes endocrines et exocrines. Le peptide est capable de réguler les sécrétions et la contractilité des organes. D'autre part, des études ont montré que la galanine est présente dans les fibres véhiculant la sensibilité viscérale et qu'elle pourrait être impliquée dans la régulation de la perception douloureuse (Wiesenfeld-Hallin et coll., 1992). La galanine apparaît donc comme impliquée dans des fonctions incluant la sécrétion hormonale, l'activité neuronale et la contractilité du muscle lisse.

Dans le système nerveux central, la galanine a une distribution ubiquitaire suggérant qu'elle est impliquée dans de nombreuses fonctions. La galanine est souvent colocalisée avec des "neurotransmetteurs classiques" (Rökaeus, 1987), et/ou des neuropeptides (Rökaeus et coll., 1988 ; Meister et coll., 1990 ; Merchenthaler et coll., 1990) dont elle peut modifier la libération (action présynaptique) ou l'effet (action postsynaptique) (Consolo et coll., 1990a ; Fuxe et coll., 1990 ; Hedlund et coll., 1991 ; Parsons et Konopka, 1991 ; Schönrock et coll., 1991 ; Fisone et coll., 1992). Des actions biologiques et pharmacologiques de la galanine ont été identifiées pour lesquelles elle apparaît le plus souvent comme un agent inhibiteur fortement hyperpolarisant (Bartfai et coll., 1992). Elle rejoint ainsi un groupe de peptides comprenant notamment la somatostatine, la substance P, la neurotensine et les peptides opioïdes.

Chez les mammifères, de nombreuses régions cérébrales renferment des corps cellulaires et/ou des fibres nerveuses contenant de la galanine ainsi que des récepteurs du peptide. Chez le Rat, des taux particulièrement importants du peptide et de ses récepteurs ont été détectés dans le système limbique. Des études indiquent que la galanine pourrait agir à ce niveau comme un modulateur inhibiteur de la fonction cholinergique et être impliquée dans les processus de mémoire (Crawley et Wenk, 1989). Le locus coeruleus et le noyau du tractus solitaire renferment également des taux considérables de peptide et de récepteurs. Les concentrations les plus élevées ont été trouvées dans différentes régions de l'hypothalamus dont l'éminence médiane, dans laquelle un

23

plexus dense de fibres immunoréactives (Rökaeus et coll., 1984 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Melander et coll., 1986a) et de sites de liaison spécifiques de la galanine (Melander et coll., 1986b) ont été rapportés. L'éminence médiane constitue la zone de projection des systèmes neurohormonaux hypophysiotropes: somatolibérine (GRF), somatostatine, gonadolibérine (GnRH), corticolibérine (CRF), Dopamine (Jacobowitz, 1988; Meister et coll., 1989). La galanine pourrait agir à ce niveau via des actions paracrines pour moduler la libération des neurohormones (Arai et Calas, 1991). Il a été observé qu'après injections, intraveineuse, intracérébroventriculaire ou intrahypothalamique, la galanine régule la sécrétion de la plupart des hormones antéhypophysaires (Merchenthaler et coll., 1993). Elle stimule la sécrétion d'hormone somatotrope (GH) (Bauer et coll., 1986c; Ottlecz et coll., 1986; Cella et coll., 1988 ; Murakami et coll., 1989 ; Maiter et coll., 1990), de prolactine (PRL) (Koshiyama et coll., 1987; Wynick et coll., 1993b) et de gonadotropine (GnRH) (Sahu et coll., 1987 ; Lopez et coll., 1990a, 1991) et inhibe la sécrétion de corticotropine (ACTH) (Hooi et coll., 1990). Un autre rôle de la galanine hypothalamique a également été mis en évidence: elle pourrait stimuler la prise alimentaire (Leibowitz, 1991). D'autre part, la galanine pourrait avoir des effets neuroendocrines directs sur l'hypophyse (Bauer et coll., 1986c ; Gabriel et coll., 1988 ; Cheung et coll., 1990). Il semble donc possible que la galanine soit une véritable neurohormone hypothalamique impliquée dans le contrôle de processus physiologiques et du comportement de base.

Des travaux récents indiquent que la galanine pourrait agir comme un promoteur de croissance (Woll et Rozengurt, 1989). Des effets stimulants de la galanine sur la prolifération de cellules tumorales ont été mis en évidence (Sethi et Rozengurt, 1991a, b). Par ailleurs il a été décrit une augmentation sélective de la synthèse de galanine au cours du développement d'un prolactinome induit par les oestrogènes chez le Rat (Vrontakis et coll., 1987). Il a également été démontré que des lésions de nerfs périphériques ou de racines sensitives peuvent entraîner une synthèse de galanine dans les neurones des ganglions rachidiens et de la moëlle dorsale (Villar et coll., 1991). Ces derniers résultats constituent des arguments en faveur d'un rôle potentiel de la galanine dans des phénomènes de prolifération cellulaire, différentiation, tumorigénèse et réparation cellulaire. Des observations ont permis de mettre en évidence des variations du contenu cérébral en galanine et en récepteurs de la galanine dans certaines pathologies: adénomes hypophysaires (Vrontakis et coll., 1990; Sano et coll., 1991; Giustina et coll., 1992), maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Chan-Palay, 1988a) et la maladie d'Alzheimer (Chan-Palay, 1988a; Beal et coll., 1990a, b).

La conception de molécules à visée thérapeutique nécessite la connaissance de plus en plus précise des cibles biologiques sur lesquelles vont éventuellement agir ces produits. Ces éléments soulignent l'importance de l'étude des récepteurs de la galanine centrale pour la mise au point de ces modèles.

A l'heure actuelle, l'essentiel des investigations anatomiques, physiologiques et pharmacologiques de la galanine a été mené chez le Rat. Les récepteurs de la galanine, GAL-R<sub>1</sub>, ont été visualisés antérieurement par radioautographie surtout chez cette espèce (Melander et coll., 1986b, 1988 ; Skofitsch et coll., 1986 ). Aux vues de ces données, on constate que:

- la galanine peut être associée à une variété de systèmes ;

- des divergences apparaissent selon les auteurs à propos de la distribution des récepteurs dans certaines régions (Melander et coll., 1986b, 1988; Skofitsch et coll., 1986; Bonnefond et coll., 1990).

Par conséquent, donner une signification physiologique précise de la galanine s'avère difficile. La représentativité des études de distribution réalisées chez le Rat s'est donc posée. La comparaison de celles-ci avec des distributions établies chez d'autres espèces pourrait permettre de progresser dans ce domaine et aboutir à de meilleurs modèles expérimentaux utilisables en neuropharmacologie. Par exemple, de telles études ont montré que le Cobaye constitue un modèle expérimental plus intéressant que le Rat pour la neuropharmacologie des récepteurs kappa (Sharif et Hughes, 1989).

Le Cobaye est, après le Rat, le mammifère le plus utilisé en laboratoire. Nous avons donc envisagé d'étudier la distribution des récepteurs de la galanine GAL-R<sub>1</sub> dans le système nerveux central de cette espèce par étude de liaison, ce qui n'avait jamais été effectué jusqu'à présent. Les techniques biochimiques, ne permettant pas une visualisation des récepteurs au niveau structural, la détection des sites de liaison de la galanine est effectuée par technique radioautographique qui permet une localisation de ceux-ci tout en préservant les structures biologiques.

Une cartographie des récepteurs de la galanine a donc été réalisée *in vitro* par macroradioautographie quantitative dans le système nerveux central de Cobaye. Ce travail est mené avec le seul radioligand des récepteurs GAL-R<sub>1</sub> utilisé actuellement dans les études de distribution: la galanine marquée à l'iode-125, ou 125I-galanine.

La quantification régionale des données radioautographiques dans le cerveau de Cobaye est réalisée grâce à un système d'analyse d'image assisté par ordinateur.

Avant toute étude des sites de liaison de la galanine dans les diverses structures cérébrales il s'est révélé nécessaire de contrôler l'efficacité de la technique de liaison couramment utilisée chez le Rat et d'en adapter l'utilisation chez le Cobaye en tenant compte des propriétés physicochimiques du radioligand employé.

Les expériences menées ont permis de comparer les distributions établies chez le Rat et le Cobaye et d'établir l'existence ou la non-existence de différences inter-espèces.

Chez le Rat, les données controversées quant à la distribution des récepteurs GAL-R<sub>1</sub> dans certaines régions ont soulevé la question d'un masquage de sites par la galanine endogène. Des travaux récents réalisés chez le Rat ont en effet démontré que les guanylnucléotides permettent de révéler une large distribution des sites de liaison de la 125I-galanine plus particulièrement dans l'hypopthalamus et l'éminence médiane (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992). Nous avons donc envisagé d'étudier la distribution des récepteurs GAL-R<sub>1</sub> chez le Cobaye en présence de Mg<sup>2+</sup> et de GTP pour tester leur sensibilité potentielle aux guanylnucléotides et essentiellement pour trouver une condition de détection plus favorable pour la suite de nos travaux (microscopie électronique).

La seconde partie de ce travail est consacrée à l'identification immunocytochimique des structures contenant de la galanine dans l'hypothalamus du Cobaye.

Compte tenu des résultats obtenus chez le Rat, nous nous sommes surtout focalisés sur la distribution de la galanine dans l'aire préoptique et le noyau arqué: une comparaison avec la distribution du GnRH et du GRF a été réalisée à l'échelle de la microscopie photonique.

La galanine étant supposée avoir un rôle local neuromodulateur dans l'éminence médiane, la dernière partie de ce travail sera consacrée à l'étude de la localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine (GAL-R<sub>1</sub>) dans l'éminence médiane. Une étude comparative chez le Cobaye et le Rat a été réalisée en présence et en absence de Mg<sup>2+</sup> et de GTP.

# GENERALITES

# 1 - Les différentes formes de galanine

## 1-1. Découverte:

En 1983, Tatemoto et collaborateurs ont purifié un peptide de 29 acides aminés, amidé en position C-terminale, à partir de l'intestin de porc. Le nom de galanine a été choisi en raison de l'existence de glycine en position N-terminale et d'**alanine** en position C-terminale (Fig.1). Les auteurs ont alors établi que la galanine ne présentait aucune homologie de structure avec celles des autres peptides connus. De plus, ils démontraient que la galanine était dotée d'activités biologiques.

La galanine est donc apparue d'emblée comme le premier représentant connu d'une nouvelle famille de peptides biologiquement actifs.

#### 1-2. Synthèse:

Les techniques de biologie moléculaire ont permis le clonage de l'ADNc du gène codant pour une protéine précurseur de la galanine de porc, rat, vache et homme: la préprogalanine (Rökaeus et Brownstein, 1986 ; Vrontakis et coll., 1987 ; Kaplan et coll., 1988 ; Rökaeus et Carlquist, 1988 ; Evans et Shine, 1991). Chez ces espèces, la préprogalanine est un précurseur protéique de 123-124 acides aminés (Fig.2), correspondant à une séquence signal, un peptide message prégalanine (PGMP), la galanine, et une protéine de 59 acides aminés: polypeptide associé au message de la galanine (GMAP). La production et la sécrétion du peptide message prégalanine et du GMAP, ainsi que la régulation de la galanine restent encore inconnues. 1 10 15 Porc : Giy - Trp - Thr - Leu - Asn - Ser - Ala - Gly - Tyr - Leu - Leu - Gly - Pro - His - Ala -Mouton : Rat : Boeuf : Homme : Poulet :

20 25 30 29 : Ile - Asp - Asn - His - Arg - Ser - Phe - His - Asp - Lys - Tyr - Gly - Leu - Ala - NH2 Porc Mouton : His Ser His Rat Thr -  $NH_2$ : Boeuf : Leu Ser GIn His Thr - Ser Homme : Val - Gly Ser Asn Poulet : Val Asn His Phe Thr - NH<sub>2</sub>

Fig.1: Comparaison des différentes séquences de galanine chez les mammifères et le Poulet.

La région N-terminale de la séquence de galanine (15 premiers acides aminés soulignés), commune à toutes les espèces, correspond au site actif de la molécule.

La portion C-terminale, variable selon l'espèce, semble impliquée dans l'activité biologique du peptide.

#### **1-3. Structure:**

La séquence de la galanine, identifiée directement et/ou déduite de l'ADNc de son précurseur, est connue pour six espèces de vertébrés: Porc (Tatemoto et coll., 1983), Boeuf (Rökaeus et Carlquist, 1988), Rat (Vrontakis et coll., 1987 ; Kaplan et coll., 1988), Mouton (Sillard et coll., 1991), Poulet (Norberg et coll., 1991) et Homme (Bersani et coll., 1991 ; Evans et Shine, 1991 ; Schmidt et coll., 1991 ; McKnight et coll., 1992).

La comparaison de ces molécules révèle que la séquence en acides aminés du peptide est fortement conservée au cours de l'évolution. Cependant, la structure de la galanine présente une certaine hétérogénéité liée à l'espèce (Fig.1). La galanine est constituée d'une séquence de 29 acides aminés amidée en position C-terminale, à l'exception de la galanine humaine qui est non-amidée et contient un acide aminé supplémentaire. Alors que la séquence N-terminale de la galanine est fortement conservée, la région Cterminale présente des variabilités substantielles liées à l'espèce qui pourraient être responsables des effets de la galanine spécifiques de l'espèce sur plusieurs systèmes endocrines, comme sur la sécrétion de glucagon et d'insuline (Gilbey et coll., 1989 ; Miralles et coll., 1990). La forte conservation des 15 premiers acides aminés N-terminaux serait vraisemblablement responsable de l'interaction avec le récepteur.

#### 1-4. Formes moléculaires:

L'existence de plusieurs formes immunoréactives de la galanine a été mise en évidence par techniques biochimiques dans la plupart des tissus étudiés et pour des espèces différentes, sans que soit déterminée leur séquence précise. Récemment, une forme courte de la galanine, biologiquement active, a été isolée et identifiée dans le colon humain: la galanine 1-19 (Bersani et coll., 1991). Chez le porc, un fragment synthétique, la galanine 1-20, paraît équipotente à la forme 1-29 sur la motilité intestinale du chien (Fox et coll., 1988). Il existe effectivement dans la séquence de la galanine un doublet basique His-Arg en position 19-20, présent dans toutes les séquences connues de galanine, susceptible d'être clivé (Fig.1). Il est donc probable que la galanine 1-19 soit une galanine courte, biologiquement active, présente dans plusieurs espèces.

31


# Représentation schématique des structures de préprogalanine porcine, bovine, de rat et humaine.



Les acides aminés basiques lysine (Lys) et arginine (Arg), correspondant à des sites de clivage, sont représentés respectivement en pointillés et en hachures blanches. La glycine représentée en traits pleins, est un donneur d'amidation pout la région C-terminale de la molécule de galanine. On note que dans la galanine humaine un résidu sérine (Ser) est substitué à la glycine présente dans les autres espèces. En conséquence, la galanine humaine possède un acide aminé supplémentaire (30 au lieu de 29 pour les autres espèces).

PGMP: peptide message prégalanine ; GMAP: peptide associé au message de la galanine. Se pose alors la question de l'activité biologique du fragment produit en même temps: la galanine 20-29 ou 20-30. En position N-terminale de ce fragment, il existe un triplet Arg-Ser-Phe qui pourrait posséder une activité de liaison facilitée par le cycle Phe, et par suite une activité biologique propre, différente de celles de la galanine 1-29 (ou 1-30) et de la galanine 1-19.

Aucune forme courte de galanine contenant l'extrémité C-terminale n'a été isolée jusqu'ici. L'existence de telles molécules ne peut être totalement exclue, puisque la recherche des formes connues de galanine a été établie par détection de leur extrémité N-terminale. De plus, dans l'estomac et l'intestin de Rat, des sites de liaison reconnaissant la galanine 1-29, mais aussi la galanine 9-29 ont été caractérisés (Rossowski et coll., 1990).

Même si une forme courte de galanine a été isolée chez l'Homme, le métabolisme de la galanine (1-29 ou 1-30) est actuellement très mal connu. Alors que les 15 premiers acides aminés en position N-terminale sont identiques pour toutes les structures de la galanine connues, il est supposé que l'hétérogénéité de structure liée à la région C-terminale pourrait expliquer les différences d'effets et d'activité de la galanine chez les différentes espèces. Il semble cependant bien établi que la moitié N-terminale du peptide se lie avec une haute affinité et active efficacement de nombreux récepteurs centraux et périphériques.

# 2 - Les récepteurs de la galanine

## 2-1. Identification:

Le neuropeptide ubiquitaire galanine exerce diverses actions biologiques dans l'organisme des mammifères qui sont médiées par l'interaction du peptide avec des sites de reconnaissance membranaires. Le pancréas endocrine et le cerveau étant considérés comme les tissus cibles majeurs du peptide, l'identification des sites récepteurs de la galanine a été réalisée dans ces organes.

En accord avec l'effet inhibiteur connu de la galanine sur la sécrétion d'insuline *in vivo* et *in vitro* (McDonald et coll., 1985), les premiers récepteurs de la galanine (GAL-R<sub>1</sub>) ont été initialement découverts à partir de cellules tumorales  $\beta$ -pancréatiques de Hamster (Amiranoff et coll., 1987), puis identifiés sur lignées de cellules  $\beta$ - et  $\delta$ -pancréatiques de Rat en culture (Amiranoff et coll., 1988, 1989a, 1991 ; Lagny-Pourmir et coll., 1989a).

En même temps, en relation avec la localisation de la galanine dans le système nerveux central et le rôle régulateur de la galanine centrale sur la libération de neurotransmetteurs (Nordström et coll., 1987 ; Nishibori et coll., 1988 ; Tsuda et coll., 1989), de nombreux récepteurs (GAL-R<sub>1</sub>) ont été décrits sur membrane de cerveau de Rat, principalement dans l'hypothalamus (Servin et coll., 1987) et caractérisés dans l'hippocampe ventral (Fisone et coll., 1989a).

Tout récemment, des récepteurs qui pourraient appartenir à une autre classe (GAL- $R_2$ ), ont été décrits dans l'adénohypophyse de Rat (Wynick et coll., 1993a).

### 2-2. Caractérisation:

Ces récepteurs de la galanine répondent à un certain nombre de critères pharmacologiques requis pour l'information biologique: saturabilité, réversibilité par des antagonistes spécifiques, haute affinité et spécificité.

L'ensemble des données portant sur les récepteurs de la galanine du cerveau et du pancréas de Rat de type GAL-R<sub>1</sub> démontre qu'il existe des récepteurs de la galanine de haute affinité et spécifiques dans ces deux tissus dont les caractéristiques cinétiques et physiques sont similaires: Kd de 0,2 à 2 nM dans un modèle à une classe de sites (Amiranoff et coll., 1987 ; Servin et coll., 1987 ; Fisone et coll., 1989a ; Lagny-Pourmir et coll., 1989a).

Des expériences de marquage d'affinité ont mis en évidence que ces sites de liaison récepteurs de la galanine identifiés dans le cerveau de Rat (Servin et coll., 1987), comme ceux caractérisés sur lignées de cellules  $\beta$ et  $\delta$ -pancréatiques (Amiranoff et coll., 1987, 1988, 1989a, 1991 ; Lagny-Pourmir et coll., 1989a) ont une structure identique.

La caractérisation moléculaire des récepteurs pancréatiques et cérébraux de la galanine a permis d'établir que le récepteur de la galanine se comporte comme une protéine monomérique glycosylée de poids moléculaire 54 kDa (Servin et coll., 1987 ; Chen et coll., 1992, 1993).

Le récepteur GAL-R<sub>2</sub> caractérisé dans l'adénohypophyse est un récepteur de haute affinité: Kd de 4,4 nM (Wynick et coll., 1993a).

## 2-3. Relation structure-activité:

Une grande similitude entre les récepteurs pancréatiques et cérébraux de type  $GAL-R_1$  a également été démontrée (Amiranoff et coll., 1989b ; Fisone et coll., 1989b ; Lagny-Pourmir et coll., 1989b).

Des fragments synthétiques du peptide amputés de leur extrémité Nterminale: galanine (2-29), galanine (3-29), galanine (10-29), ou de leur extrémité C-terminale: galanine (1-15), et des peptides de substitution de la galanine ont été utilisés pour déterminer la relation structure-activité sur la liaison de la galanine à son récepteur. L'ensemble des travaux réalisés a permis de conclure que (1) la séquence entière de la galanine est requise pour la pleine activité du peptide ; (2) les 15 acides aminés N-terminaux du peptide constituent la partie active de la molécule pour l'interaction avec le récepteur ; 3) les deux premiers acides aminés sont cruciaux ; 4) la substitution de l'acide aromatique en position 2 (Trp) par un résidu non aromatique abolit complètement l'activité de la galanine.

Ces résultats mettent ainsi en évidence l'importance de la région Nterminale de la galanine, et particulièrement du deuxième acide aminé, dans la liaison de la galanine à son récepteur aussi bien que dans son action biologique dans le pancréas endocrine et le cerveau de Rat.

Cette portion de la molécule de galanine est par ailleurs rigoureusement invariable selon l'espèce à l'inverse de la région C-terminale (cf.- 1/ Les différentes formes de la galanine).

Contrairement aux données obtenues pour le récepteur GAL- $R_1$ , il a été montré que la région 3-10 de la galanine et l'acide aminé en position 25 (Lysine) sont cruciaux pour la liaison et l'activité biologique relatives au récepteur GAL- $R_2$ .

### 2-4. Transduction membranaire du signal lié à la galanine:

Ces données concernent uniquement le récepteur  $GAL-R_1$  qui reste le mieux connu à l'heure actuelle, la caractérisation du récepteur  $GAL-R_2$  étant trop récente.

### *\*pancréas endocrine:*

Après liaison à son récepteur, la galanine hyperpolarise et repolarise les cellules  $\beta$ -pancréatiques en activant des canaux K<sup>+</sup>-ATP dépendants (DeWeille et coll., 1988 ; Sharp et coll., 1989), et inhibe une adénylate-cyclase (Amiranoff et coll., 1988). Une action inhibitrice retardée dans le couplage stimulus-sécrétion, probablement proche de l'exocytose, a également été démontrée comme un autre effet possible de cette

interaction (Sharp et coll., 1989 ; Ullrich et Wollheim, 1989). Il a été proposé que tous ces effets pourraient être médiés par des protéines G puisque leur sensibilité à la toxine de pertussis a été démontrée (Amiranoff et coll., 1988 ; Sharp et coll., 1989). D'autre part, il est établi que la liaison spécifique de la galanine est inhibée de manière sélective et dose-dépendante par les guanylnucléotides (Lagny-Pourmir et coll., 1989a).

Une étude plus précise de la présence des différents types de protéines G a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques des sous-unités  $\alpha i_1$ ,  $\alpha i_2$ ,  $\alpha i_3$ ,  $\alpha_0$ . Toutes ces protéines ont été détectées par technique biochimique sur membranes de cellules de lignée  $\beta$ -pancréatique, dont deux formes de poids moléculaires légèrement différents pour  $\alpha o$  (Cormont et coll., 1991).

## *\*système nerveux central:*

Dans le système nerveux central, les études portant sur le couplage possible des récepteurs de la galanine à des protéines G ont été réalisées tout d'abord dans l'hippocampe de Rat (Fisone et coll., 1989b). Les auteurs ont montré que la liaison de la galanine à ses récepteurs est affectée par une ADP-ribosylation catalysée par la toxine de pertussis, suggérant que le récepteur de la galanine hippocampique est couplé à une protéine G de classe Gi/Go de la même manière que le récepteur pancréatique.

D'autre part, il a été démontré que les guanylnucléotides pouvaient influencer l'expression des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Rat (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992), confirmant ainsi le couplage potentiel des récepteurs cérébraux du peptide à une protéine G.

Ces travaux, confirmés par une étude de caractérisation fonctionnelle et moléculaire des récepteurs pancréatiques et cérébraux de la galanine (Amiranoff et coll., 1992), ont permis de démontrer chez le Rat que toutes les actions de la galanine médiées par un récepteur GAL-R<sub>1</sub> présentent un couplage d'inhibition de l'adénylate-cyclase via une protéine Gi/Go sensible à la toxine de pertussis.

# 2-5. Mécanismes moléculaires d'action de la galanine sur les récepteurs de type GAL-R<sub>1</sub>:

#### *\*cellules du pancréas endocrine:*

L'inhibition de la libération d'insuline dans la lignée cellulaire  $\beta$ pancréatique Rin m 5F par les récepteurs de la galanine inclut une diminution de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Ahrén et coll., 1986), probablement via une hyperpolarisation causée par ouverture de canaux K<sup>+</sup> sensibles ou non à l'ATP (DeWeille et coll., 1988; Wåhlander et coll., 1990). L'inhibition de la sécrétion d'insuline médiée par la galanine serait induite par l'activation de ces canaux seuls ou par interaction directe via une protéine G avec des mécanismes sécrétoires (Dunne et coll., 1989).

#### \*cellules nerveuses:

Dans l'hippocampe, au niveau présynaptique, la galanine inhibe la libération d'acétylcholine stimulée par la scopolamine (Fisone et coll., 1987; Consolo et coll., 1991), la libération d'histamine induite par dépolarisation potassique (Arrang et coll., 1991), ainsi que la libération massive de glutamate d'origine anoxique (Ben-Ari, 1990) ou ischémique (Zini et coll., 1993).

Un mécanisme analogue à celui de la galanine dans les cellules  $\beta$ pancréatiques incluant l'ouverture de canaux K<sup>+</sup>-ATP, hyperpolarisation et la fermeture de canaux Ca<sup>++</sup> sensibles au voltage pourrait être proposé.

Sur toutes les cellules nerveuses étudiées, la galanine apparaît toujours hyperpolarisante au niveau post-synaptique et inhibitrice de l'excitabilité (Fisone et coll., 1989b; Seutin et coll., 1989; Palazzi et coll., 1988, 1991; Parsons et Konopka, 1991; Schönrock et coll., 1991).

L'hyperpolarisation semble liée à l'ouverture de canaux K<sup>+</sup>. Parallèlement, il y a fermeture des canaux Ca<sup>++</sup> voltage-dépendants. Cependant, le mécanisme de suppression d'excitabilité dans tous ces modèles n'est pas connu.



Fig.3: Mécanisme d'action de la galanine au niveau cellulaire.

La galanine inhibe la sécrétion de transmetteurs classiques et/ou de peptides par plusieurs voies. La galanine se lie à un récepteur membranaire (R) couplé à des protéines G (G). Une fois activées, certaines de ces protéines G sont capables d'inhiber l'activité adénylate cyclase (AC), d'autres stimulent l'ouverture de canaux K+-ATP. Cette dernière action provoque une hyperpolarisation de la membrane cellulaire qui ferme des canaux Ca<sup>++</sup> voltage-dépendants. L'inhibition par la galanine de canaux Ca<sup>++</sup> de type L pourrait aussi être plus directe (via une protéine G?).

En résumé, il semble que l'occupation des récepteurs de la galanine, de type GAL-R<sub>1</sub>, par des agonistes conduise à une réduction des concentrations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire dans la plupart des types cellulaires, réduisant de ce fait la libération de transmetteurs et inhibant d'autres processus dépendants du Ca<sup>2+</sup> (Fig.3). Actuellement, il apparaît clairement établi que l'effet de la galanine sur les concentrations en Ca<sup>2+</sup> implique l'ouverture de canaux K<sup>+</sup>, la fermeture de canaux Ca<sup>2+</sup> et l'inhibition de l'activité adényl-cyclasique liées à une activation de récepteurs de haute affinité couplés à une protéine Gi/Go (Dunne et coll., 1989 ; Lagny-Pourmir et coll., 1989a ; Amiranoff et coll., 1992).

En ce qui concerne le récepteur GAL-R<sub>2</sub>, aucune donnée n'est disponible pour le moment.

## 3 - Distribution de la galanine et de ses récepteurs

Compte tenu de l'orientation de notre travail, nous n'exposerons brièvement que des résultats qui concernent le système nerveux central des vertébrés supérieurs.

Chez les mammifères, les espèces les mieux connues sont le Rat, le Singe et l'Homme. Le Rat étant l'animal le plus étudié, les structures à galanine et celles présentant des récepteurs du peptide de type  $GAL-R_1$  seront décrites plus en détail (Tableau 1). Pour les primates les différences interespèces avec le Rat seront seulement discutées.

## 3-1. Distribution du peptide galanine

Les études immunocytochimiques réalisées chez le Rat (Rökaeus et coll., 1984 ; Ch'ng et coll., 1985 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985b ; Melander et coll., 1986a) révèlent que les corps cellulaires, les fibres et terminaisons à galanine (Gal-ir) sont principalement localisées dans l'hypothalamus, l'éminence médiane, la neurohypophyse, le bulbe et la moëlle épinière (Tableau 1). Chez le Singe (Melander et Staines, 1986c ; Walker et coll., 1989, 1991 ; Kordower et Mufson, 1990 ; Kordower et coll., 1992) et l'Homme (Chan-Palay 1988a, b ; Gentleman et coll., 1989 ; Kowall et Beal, 1989), la localisation de ces structures est relativement proche de celle du Rat, cependant des différences inter-espèces sont observées.

Les dosages radioimmunologiques confirment ces données chez le Rat et le Singe (Rökaeus et coll., 1984 ; Gabriel et coll., 1989, 1990 ; Bretherton-Watt et coll., 1990)

### \* Rhinencéphale:

Chez le Rat, des corps cellulaires Gal-ir de faibles densité sont présents dans le noyau olfactif antérieur. Quelques fibres Gal-ir sont détectées dans ce noyau et les couches plexiformes internes et externes du bulbe olfactif.

Chez les primates, des fibres et péricaryons disséminés sont détectés dans le noyau olfactif antérieur.

### \* Télencéphale:

Chez le Rat, des corps cellulaires Gal-ir sont concentrés dans le cortex préfrontal médian, à la partie rostrale des aires cingulées antérieures, les noyaux interstitiel de la strie terminale, la bande diagonale de Broca, les noyaux central et médian de l'amygdale et le septum médian. Des corps cellulaires Gal-ir disséminés sont présents dans les noyaux caudé, médian, périventriculaire et rétrochiasmatique de l'aire préoptique, ainsi que dans la formation hippocampique.

Un plexus massif de fibres Gal-ir est présent dans le septum latéral, la bande diagonale de Broca et les régions situées entre la bande diagonale de Broca et la base du cerveau. Une accumulation dense de fibres apparaît dans la strie terminale et dans les noyaux central et médian de l'amygdale. Une accumulation modérée à dense de fibres Gal-ir est présente dans l'hippocampe, plus importante dans l'hippocampe ventral et le subiculum. Dans le cortex entorhinal des accumulations de fibres modérées à faibles sont détectées. Des fibres diffuses sont observées dans les autres régions de l'amygdale et le caudé/putamen. Quelques neurones sont disséminés dans les aires corticales temporale, insulaire et piriforme.

Chez le Singe, le nombre de neurones Gal-ir dans le septum médian, la bande diagonale de Broca et le noyau de Meynert est plus élevé que chez le Rat. Chez les primates, les fibres immunoréactives sont limitées aux noyaux accessoires médian et basal de l'amygdale. Une accumulation dense de fibres Gal-ir est présente dans la couche pyramidale du champ CA3, le cortex entorhinal, le subiculum et le gyrus denté. Seules quelques fibres Gal-ir ont été identifiées dans la strie terminale.

Chez l'Homme, la localisation de la galanine dans les neurones du noyau basal de Meynert est controversée. Cependant, une innervation dense du septum (similaire à celle du Rat), de la bande diagonale de Broca et du noyau basal de Meynert par des fibres Gal-ir a été clairement établie.

### \* Diencéphale:

Pour toutes les espèces étudiées, l'hypothalamus présente la plus grande richesse en immunoréactivité à la galanine et exprime la plus grande similitude de distribution entre les espèces. Chez le Rat, les corps cellulaires Gal-ir sont concentrés essentiellement dans les noyaux supraoptique, suprachiasmatique, périventriculaire, paraventriculaire, arqué, dorsomédian et tubéromamillaire. Par hybridation *in situ*, l'expression d'Arn messagers codant pour la galanine a été mise en évidence dans les noyaux paraventriculaire, supraoptique, arqué et dorsomédian (Bonnefond et coll., 1990).

L'accumulation la plus dense de fibres et de terminaisons nerveuses Gal-ir de l'hypothalamus est localisée dans l'éminence médiane où la concentration en galanine est la plus élevée de tout le système nerveux central. Une densité très élevée de fibres et de terminaisons nerveuses est présente dans la neurohypophyse. Une densité élevée de fibres Gal-ir est détectée dans les noyaux paraventriculaire, périventriculaire, dorsomédian et supraoptique. Une accumulation modérée à dense de fibres Gal-ir est présente dans l'aire préoptique et les noyaux antérieur, latéral et postérieur de l'hypothalamus, ainsi que dans le noyau prémamillaire ventral. Des réseaux de fibres Gal-ir de faible densité sont détectés dans le cerveau antérieur médian, les noyaux arqué, postérieur hypothalamique et prémamillaire dorsal.

Chez les primates, les corps cellulaires Gal-ir sont observés dans l'hypothalamus ventral, le noyau supraoptique, les régions latérales de l'hypothalamus et le noyau paraventriculaire.

Dans le thalamus du Rat, des corps cellulaires Gal-ir de densité modérée sont présents dans les noyaux périventriculaire, antérodorsal et latéral. Des corps cellulaires Gal-ir dispersés sont localisés dans les noyaux parafasciculaire et reuniens.

Un réseau de fibres Gal-ir relativement dense est observé dans les noyaux thalamiques périventriculaire et parafasciculaire. Des fibres dispersées sont également détectées dans d'autres régions thalamiques.

Chez les primates, aucune structure Gal-ir n'a été rapportée dans le thalamus.

Aucun corps cellulaire Gal-ir n'a été détecté dans l'épithalamus des mammifères. Une accumulation modérée à dense de fibres Gal-ir est observée dans l'aspect médian du noyau de l'habenula latérale.

#### \* Mésencéphale:

Chez le Rat, des corps cellulaires de densité modérée à faible apparaissent dans le noyau dorsal du raphe et le noyau interpédunculaire.

Des réseaux de fibres Gal-ir disséminés sont observés dans le noyau du raphe, la substance noire et le noyau péripedunculaire.

Aucune information n'a été obtenue chez les primates.

\* Pons/Medulla oblongata:

Chez le Rat, le locus coeruleus présente des corps cellulaires très fortement immunoréactifs. Des corps cellulaires marqués sont présents dans le noyau du tractus solitaire, le raphe pallidus et obscurus, le noyau réticulé latéral et le noyau trigéminé spinal. Quelques corps cellulaires sont détectés dans le nerf hypoglossal, l'area postrema et la formation réticulée.

Une accumulation dense de fibres immunoréactives est détectée dans la substance grise centrale périaqueducale, le noyau parabrachial, le noyau du tractus solitaire, le noyau trigéminé spinocaudal et le noyau moteur dorsal du nerf vague. Des densités modérées de fibres sont présentes dans le noyau pontin réticulé. Des fibres diffuses sont détectées dans le tractus pyramidal et la formation réticulée.

Quelques fibres Gal-ir sont observées dans le cervelet entier de rat.

Aucune information n'est disponible chez les primates.

\* Moëlle épinière:

Chez le Rat, des corps cellulaires intensément marqués sont présents dans les couches I et II à tous les niveaux spinaux. Quelques péricaryons faiblement marqués sont détectés dans la couche X. Les motoneurones de la corne ventrale sont moins immunopositifs que les neurones de la corne dorsale.

Un réseau de fibres fortement marquées est présent dans les couches I et II de la corne dorsale à tous les niveaux de la moëlle épinière et aux niveaux sacré et lombaire de la couche X.

Chez l'Homme, la concentration Gal-ir est également plus élevée à l'étage sacré.

## 3-2. Distribution des récepteurs de la galanine

Les études *in vitro* de localisation radioautographique des récepteurs de la galanine, de type GAL-R<sub>1</sub>, menées chez le Rat (Melander et coll., 1986b, 1988 ; Skofitsch et coll., 1986), le Singe (Köhler et coll., 1989a, b) et l'Homme (Köhler et coll., 1989b ; Köhler et Chan-Palay, 1990) permettent d'établir une forte conservation de leur localisation entre les espèces à quelques exceptions près.

De manière générale, les concentrations les plus élevées de sites de liaison de la galanine sont présentes dans le télencéphale, le tronc cérébral, la moëlle épinière et plus particulièrement dans le diencéphale, au niveau hypothalamique.

\* Rhinencéphale:

Chez le Rat, des densités élevées de sites de liaison spécifiques sont exprimées dans les bulbes olfactifs, le bulbe olfactif accessoire et le noyau antérieur olfactif.

Aucune information n'a été rapportée pour les primates.

\* Télencéphale:

Chez le Rat, des structures corticales expriment une densité relativement élevée de récepteurs de la galanine: cortex préfrontal médian, piriforme, périrhinal et entorhinal avec une distribution différentielle entre les couches. Un marquage dense est détecté dans le septum latéral, la bande diagonale de Broca et certains îlots de Calleja. Le septum médian et le rudiment hippocampique antérieur contiennent moins de sites de liaison. Dans la formation hippocampique, les sites de liaison sont concentrés dans les zones ventrales où les accumulations les plus denses apparaissent dans le subiculum. Aucune liaison n'est détectée dans le gyrus denté. Une distribution différentielle est enregistrée dans l'amygdale: les noyaux central et médian contiennent une accumulation dense de sites, alors que les autres régions présentent des densités de récepteurs modérées à faibles. La fimbria, la strie supracalleuse et la strie terminale, tractus majeurs du télencéphale, expriment aussi des densités importantes de sites de liaison de la galanine. Chez les primates, la distribution néocorticale des sites de liaison est beaucoup plus étendue que chez le Rat, puisque toutes les régions du néocortex sont marquées. La plupart des sites apparaissent dans le noyau accumbens, le septum latéral, la substance innominata et la bande diagonale de Broca. Le ganglion basal (noyau caudé, putamen et globus pallidus) contient de faibles taux de récepteurs de la galanine. Dans la formation hippocampique, les densités les plus élevées de sites sont observées dans le fascia dentata et le présubiculum. La corne d'Ammon et le cortex entorhinal présentent une rareté relative de récepteurs de la galanine. Le hile du gyrus denté contient plus de sites de liaison dans la région caudale, alors que dans le subiculum la densité la plus élevée est trouvée dans les régions rostrales. Dans l'amygdale, les noyaux central, médian, latéral et basolatéral contiennent des densités élevées de sites de liaison. La fimbria, la strie terminale et le noyau du lit de la strie terminale présentent également une grande concentration de sites.

\* Diencéphale:

Les densités de sites de liaison les plus élevées sont observées dans le thalamus médian et plus particulièrement dans l'hypothalamus.

Chez le Rat, les accumulations les plus denses de sites de liaison de la galanine sont détectées dans les noyaux dorsaux thalamiques et dans la majorité des noyaux hypothalamiques incluant la région préoptique, les noyaux dorsomédian, ventrolatéral, péri- et para-ventriculaire, supraoptique et tubéromamillaire aussi bien que l'éminence médiane. Des accumulations modérées à denses sont observées dans les noyaux ventromédian, latéral de l'hypothalamus et parafasciculaire. Un marquage modéré à faible apparaît dans le noyau reuniens, la zone incerta et le corps mamillaire.

Chez les primates, des densités modérées à élevées de sites de liaison de la galanine sont présents dans l'aire préoptique médiane, l'hypothalamus latéral, les noyaux supraoptique et paraventriculaire, la région périfornicale, les noyaux ventromédian, dorsomédian, infundibulaire et supramamillaire, l'éminence médiane et le corps mamillaire. Dans le thalamus, seuls les noyaux reuniens, centromédian et la zone incerta expriment des densités de sites de liaison modérées à élevées.

## \* Mésencéphale:

Chez le Rat, les accumulations les plus denses de sites de liaison sont détectées dans la substance grise périaqueducale, l'aire tegmentaire ventrale et la pars compacta de la substance noire. Des concentrations modérées sont présentes dans le collicule supérieur. Le noyau rouge, les corps géniculés latéral et médian, et l'aire prétectale antérieure sont dépourvus de sites de liaison de la galanine.

Chez les primates, des densités modérées à élevées de sites de liaison sont observées dans le collicule supérieur, la pars compacta de la substance noire, l'aire tegmentaire ventrale, la substance grise centrale et le noyau dorsal du raphe.

\* Rhombencéphale:

Chez le Rat, les noyaux parabrachiaux, le noyau cunéiforme, le locus coeruleus, le complexe vague dorsal et le noyau trigéminé spinocaudal contiennent des densités élevées de sites de liaison. Des concentrations modérées à denses sont observées au niveau d'un groupe de cellules noradrénergiques A1. Un marquage modéré à faible est détecté dans les noyaux du raphe, le noyau réticulé pontin, le noyau trigéminé sensoriel principal, l'olive supérieure, le noyau réticulé latéral et l'area postrema. Aucun site de liaison détectable n'est présent dans le cervelet.

Chez le Rat et les primates, le locus coeruleus, les noyaux parabrachiaux et le noyau du tractus solitaire contiennent des densités de sites modérées à élevées. Des densités modérées de récepteurs sont observées dans le noyau trigéminé spinal et la formation réticulée. Chez le Singe, des sites de liaison sont détectés dans le cervelet.

\* Moëlle épinière:

Chez le Rat, l'accumulation la plus élevée de sites de liaison est présente dans les couches superficielles de la corne dorsale (couche I et II). Des densités plus faibles sont détectées autour du canal central (couche X) et dans la colonne intermédiolatérale.

Aucune information n'est obtenue chez les primates.

	Corps cellulaires	Fibres/terminaisons	Récepteurs
Phinancánhala			
Kninencephale Bulbe olfactif			
couche glomérulaire	F	F	F
couche plexiforme interne	1	F	F
couche plexiforme externe		I I	L F
couche granulaire	F	F	Ē
Bulbe olfactif accessoire	-	-	ŤE
Novau olfactif antérieur	F	F	E
Tubercule olfactif	-	-	-
couche moléculaire	-	F	TF
îlots de Calleia	-	F	M
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		_	
Télencéphale (cortex)			
Cortex cingulé	М	F	-
Cortex frontal	-	F	М
Cortex insulaire	-	F	М
Cortex préfrontal médian	М	М	Е
Cortex piriforme	-	F	М
Cortex pariétal	-	F	-
Cortex périrhinal	-	F	E
Corne d'Ammon	-	М	М
Gyrus denté	-	М	М
Cortex entorhinal	-	F	E
Tálancánhala (autras rágions)			
Novau sental médian	м	F	м
Noyau septai metian Noyau septai latéral		г тс	
Noyau septai taterai Noyau da la banda diagonala	11		E
hose vertical	F	М	м
bras borigontal			E NI
Novou du lit de la strie terminale		L. M	Г Б
Noyau du fit de la sure terminate	M	M	L
Noyau accumbens	IVI	E IVI	M
A mygdale	-	1	171
novau central	м	М	F
noyau médian	M	E IVI	E
noyau latéral	F		Ц Б
noyau basal	F		л М
aire amygdalohinnocampique	F	Ē	M
Ganglion basal	1	Ľ	141
globus pallidus		_	_
novau caudé	_	_	м
putamen	_	F	F
Tractus de fibres		-	-
strie terminale	_	Е	F.
coms calleux	_	-	-
Fornix	-	F	м
Diencéphale (thalamus)	_		
Noyau parafasciculaire	F	М	М
Noyau périventriculaire	M	М	М
Noyau paracentral	-	-	F
Noyau ventro-latéral	-	F	F
Noyau ventro-postérolatéral	-	-	F
Noyau centromédian	-	F	E
Noyau latérodorsal thalamique	-	-	F
Noyau paraventriculaire thalamique	F	F	М
Noyau reuniens	F	F	М
Zone incerta	F	<u> </u>	M

**Tableau 1:** Localisation des corps cellulaires, fibres/terminaisons et sites de liaison de la galanine dans le système nerveux central de Rat (Merchenthaler et al, 1993).

F: faible densité ; TF: très faible densité ; M: moyenne densité ; E: densité élevée ; TE: densité très élevée ; -: non-déterminé.

	Corps cellulaires	Fibres/terminaisons	Récepteurs
Diancánhala (ápithalamus)			
Habenula médiane		F	F
Habenula latérale	_	F	F
		-	-
Diencéphale (hypothalamus)			
Noyau arqué	М	F	Е
Noyau dorsomédian	TE	E	E
Aire hypothalamique latérale	M	M	E
Eminence médiane	TF	TE	TE E
Corps mamiliaire	F M	Г С	F E
Noyau periventriculaire hypothalamique	M	F	L M
Aire préoptique	E	E	F
Novau supramamillaire	F	F	M
Noyau supraoptique	E	Ē	E
Noyau tubéromamillaire	М	М	М
Noyau ventromédian	TF	TF	М
Mésencéphale			_
Locus coeruleus	E	M	E
Noyau interpedunculaire	Г		- TC
Noyau géniculé médian	-	Г Г	
Novau géniculé latéral	_	1 -	-
Aire antérieure prétectale	-	-	TF
Substance noire			
pars compacta	F	F	М
pars réticulata	-	F	-
Aire tegmentaire ventrale	-	М	М
Noyau rouge	-	-	-
Collicule superieur	-	- 7717	М
Collicule Interieur			- M
Raphe dorsal	IГ M	г М	M M
Raphe dorsa	IVI	171	141
Pons/medulla oblongata			
Raphe dorsal (B7)	М	М	М
Raphe médian (B8)	F	М	М
Noyau du raphe obscurus et pallidus	M	M	M
Noyau cunéiforme	F TE	F E	M E
Locus coercieus	IE	E	E
Novau trigéminé spinocaudal	м	М	F
Tractus spinal du novau trigéminé	-	M	M
Novau du tractus solitaire	М	M	E
Area postrema	F	F	F
Olive supérieure	-	F	-
Noyau parabrachial	-	F	Е
Noyau réticulé latéral	F	F	-
Complexe vague dorsal	-	M	E
Cervelet	-	F	-
Moëlle épinière			
Come dorsale	E	TE	TE
Corne ventral	-	F	F
Aire entourant le canal central (coucheX)	F	E	М
Colonne intermédiolatérale	-	E	M

F: faible densité ; TF: très faible densité ; M: moyenne densité ; E: densité élevée ; TE: densité très élevée ; -: non-déterminé.

# **3-3.** Corrélation des données anatomiques et radioautographiques

De manière générale, il existe une relative corrélation entre la distribution anatomique des structures immunoréactives à la galanine et les sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine (Tableau 1). Néanmoins, il existe des zones de discordance:

- Des concentrations importantes de terminaisons nerveuses Gal-ir peuvent être observées dans des régions montrant peu de sites de liaison (cortex cingulé, noyaux médians préoptiques, noyaux hypothalamiques arqué, dorsomédian, paraventriculaire, périventriculaire, supraoptique et médians mamillaires, noyau du raphe dorsal, locus coeruleus et neurohypophyse).

- Inversement, certaines régions peu immunoréactives présentent une densité de sites élevée (bulbe olfactif accessoire, noyaux latéral du tractus olfactif, du tractus optique, hypothalamique ventromédian, couche du nerf optique du collicule supérieur et couche moléculaire du cervelet).

Ces observations pourraient être dues à une occupation plus ou moins importante des sites par la galanine endogène comme cela a été suggéré chez le Rat (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992).

# 4 - Coexistence de la galanine avec d'autres neuropeptides et neurotransmetteurs: Notions d'actions biologiques

Chez les mammifères, dans toutes les régions du système nerveux central, la galanine est souvent codistribuée et souvent colocalisée avec des neuropeptides (neuromodulateur et/ou neurohormone) et des neurotransmetteurs classiques (Tableau 2) dont elle pourrait moduler la libération.

## 4-1. Cerveau basal antérieur

Chez le Rat, la galanine coexiste avec l'acétylcholine dans les neurones du septum médian et la bande diagonale de Broca (Melander et coll., 1985 ; Consolo et coll., 1990b). Des efférences de ces neurones innervent l'hippocampe ventral et de manière moins importante l'hippocampe dorsal (Melander et coll., 1986a, c). Des études *in vivo* et *in vitro* sur coupes hippocampiques ont mis en évidence que la galanine inhibe la libération d'acétylcholine induite par la scopolamine (Fisone et coll., 1987; Consolo et coll., 1991). Ces informations suggèrent que la galanine module la libération présynaptique d'acétylcholine dans l'hippocampe. Chez les primates dont l'Homme, la galanine coexiste également dans le noyau basal de Meynert (Melander et Staines, 1986c ; Chan Palay et coll., 1988b).

D'autres expériences ont montré que la galanine inhibe l'accumulation de [<sup>3</sup>H]-inositol phosphate stimulée par le carbachol, le second messager d'un type de récepteur muscarinique cérébral (Palazzi et coll., 1988). Ces observations suggèrent que la galanine agit postsynaptiquement en inhibant les événements potentialisés par l'activation cholinergique.

Des études comportementales indiquent que le peptide agit comme un modulateur inhibiteur de l'action comportementale de l'acétylcholine dans le système septohippocampique (Mastropaolo et coll., 1988 ; Sundström et coll., 1988 ; Wenk et Rökaeus, 1988 ; Crawley et Wenk, 1989 ; Crawley, 1990). La galanine, administrée en même temps que des traitements des voies cholinergiques, rétablit les performances de la mémoire spatiale altérées par des lésions (Crawley et Wenk, 1989). **Tableau 2:** Colocalisation de la galanine avec d'autres transmetteurs dans le système nerveux central du Rat (Merchenthaler et al, 1993).

	CAB	APO	Arc	NPV	LC	NyR	Mn (cs)	Mn (nc)	GCD
Acétylcholine Endothéline LHRH	++ +	++					+++	<b>++</b> +	
NPY		+			+				
DSIP		++							
GHRH			++						
Dopamine			++						
GABA Uistomine			++						
Angiotensine			т	++					
CRH				+					
ĊĊK				+++			+		
Dynorphine				+++					
Enképhaline				++					
Neurotensine							++		
Ocytocine				+					
PHI				+					
TH (Dopamine)				+					
Vasopressine									
Noreninephrine					++				
5-HT						+++			
Substance P						+++		+++	
TRH						+++			
Proctoline						+			
GH						++			
Aspartate							+++		
CGRP							+++	+++	+++
		{					<u>1</u>		

+: incidence de colocalisation faible, ++: moyenne, +++: élevée.

CAB: cerveau basal antérieur ; APO: aire préoptique; Arc: noyau arqué ; NPV : noyau paraventriculaire ; LC: locus coeruleus ; NyR: noyaux du raphe ; Mn (cs): motoneurones (corde spinale) ; Mn (nc): motoneurones (nerfs crâniens) ; GCD: ganglion de la corne dorsale.

Récemment, il a été montré que la galanine coexiste avec l'acétylcholine dans des motoneurones des nerfs crâniens (Moore, 1989). La galanine pourrait donc inhiber la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire. La concentration de galanine dans ces motoneurones est augmentée après section de leurs axones (Moore, 1989) ce qui suggère que la galanine pourrait participer au processus de régénération d'un neurone lésé.

## 4-2. Hypothalamus

Dans l'aire préoptique du Rat, de nombreuses cellules contenant de la galanine ont été observées (Rökaeus et coll., 1984, 1987 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985a ; Melander et coll., 1986a ; Michener et coll., 1990). Un dimorphisme lié au sexe a été rapporté: le nombre de corps cellulaires chez le mâle est plus important que chez la femelle et est lié à l'existence d'une stimulation à la testostérone au moment de la naissance (Gorski, 1984). D'autre part, il a été montré que beaucoup de cellules à galanine contenaient des récepteurs aux stéroïdes (Block et coll., 1993).

Merchenthaler et collaborateurs (1993) ont par ailleurs observé que, chez la femelle, une partie des cellules à galanine correspondait aux cellules à GnRH. L'ensemble de ces données suggère donc un rôle de la galanine dans la fonction de la reproduction, chez le Rat, au niveau hypothalamique.

Chez le Rat, dans la partie magnocellulaire du noyau paraventriculaire, la galanine coexiste avec l'arginine-vasopressine (Rökaeus et coll., 1988 ; Gaymann et Martin, 1989 ; Gai et coll., 1990 ; Meister et coll., 1990b ; Villar et coll., 1990) et l'ocytocine (Gaymann et Martin, 1989 ; Meister et coll., 1990b ; Landry et coll., 1991). D'autres neuropeptides peuvent coexister avec la galanine dans ces mêmes neurones: dopamine, dynorphine, CCK, enképhalines (Meister et coll., 1990b). Dans la plupart des cas, la coexistence de la galanine avec ces neuropeptides ou d'enzymes participant à la synthèse de neurotransmetteurs a été confirmée par détection de leur ARNm correspondant par hybridation *in situ* (Meister et coll., 1990b).

Dans la partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire de Rat, quelques neurones à galanine contiennent le CRF et/ou la neurotensine (Ceccatelli et coll., 1989).

La signification physiologique précise de la coexistence de ces divers composés avec la galanine reste à élucider.

Dans le noyau arqué du Rat, une grande quantité de péricaryons à galanine ont été décrits (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Melander et coll., 1986a ; Meister et coll., 1990b). Les concentrations de galanine les plus importantes sont vues dans des neurones de la région ventrolatérale et correspondent aux neurones à GRF (Meister et coll., 1990b). Cependant, de la galanine a également été décrite dans la région dorso-médiane, correspondant à la région des cellules à dopamine (Meister et coll., 1990b).

Dans l'éminence médiane, les terminaisons périportales à galanine proviennent pour la majorité des neurones du noyau arqué et contiennent également essentiellement la GRF (Meister et coll., 1990b ; Niimi et coll., 1990). Le reste des terminaisons à galanine a pour origine le noyau paraventriculaire et l'aire médiane préoptique (Merchenthaler, 1991b).

Il a été montré que l'action stimulante de la galanine sur la GH était inhibée par l'injection d'anti-GRF (Murakami et coll., 1987, 1989). Ceci semblerait indiquer l'existence d'une action de la galanine au niveau hypothalamique.

Dans le noyau tubéromamillaire, la galanine coexiste avec l'histamine (Köhler et coll., 1986) et le GABA (Meister et Hökfelt, 1988). La signification de cette colocalisation n'est pas connue.

## 4-3. Tronc cérébral

Le locus coeruleus est une importante source de fibres et de terminaisons nerveuses noradrénergiques de la plupart des régions cérébrales et de la moëlle épinière. Presque tous les neurones du locus coeruleus contiennent la noradrénaline, et 80% d'entre eux contiennent aussi la galanine (Austin et coll., 1990). Les neurones contenant à la fois la galanine et la noradrénaline se projettent dans le néocortex, le thalamus (Holets et coll., 1988) et minoritairement dans le cervelet (Moore et Gutafson, 1989) et dans l'hypothalamus (Levin et coll., 1987). Bien que la signification fonctionnelle de la colocalisation de la noradrénaline et de la galanine ne soit pas claire, il a été rapporté que la galanine inhibe l'accumulation d'AMPc induite par la noradrénaline dans le cortex (Nishibori et coll., 1988) et qu'elle inhibe la décharge neuronale dans le locus coeruleus *in vitro* (Seutin et coll., 1989). Un traitement à la réserpine, une drogue diminuant les monoamines, provoque une diminution du contenu en noradrénaline et, un peu moins en galanine, et en parallèle augmente l'ARNm de la TH et de la galanine dans le locus coeruleus (Austin et coll., 1990 ; Gundlach et coll., 1990). Ces observations montrent que l'expression du gène de la galanine est moins sensible que celui de la TH à la réserpine, et suggère donc que les deux transmetteurs sont présents dans deux groupes vésiculaires séparés. L'augmentation des taux d'ARNm de TH et de galanine pourrait être relative à la fréquence de décharge neuronale (voir références dans Bartfai et coll., 1988).

Dans la voie bulbospinale, la galanine coexiste avec la substance P, le TRH et la sérotonine (Melander et coll., 1986 ; Arvidsson et coll., 1991). La galanine exerce des effets complexes sur l'excitabilité de la moëlle épinière (Cridland et Henry, 1988 ; Wiesenfeld-Hallin et coll., 1988, 1989a, b) incluant des actions analgésiques (Post et coll., 1988), des influences antagonistes sur le réflexe flexeur nociceptif induit par la substance P (Xu et coll., 1989) et la potentialisation des effets analgésiques spinaux induits par la morphine (Wiesenfeld-Hallin et coll., 1990). Le rôle physiologique de la coexistence de la galanine avec la sérotonine reste à élucider.

## 4-4. Moëlle épinière

Dans les neurones spinothalamiques, la galanine coexiste avec la CCK. La signification fonctionnelle de cette colocalisation n'est pas claire.

Des fibres du tractus spinothalamique envoyant des projections dans la portion antérolatérale de la moëlle épinière sont impliquées dans la perception de la douleur (Price et Dubner, 1977). La galanine et la CCK interviendraient dans cette fonction (Faris et coll., 1983) ; il est alors possible que cette composante du tractus spinothalamique soit impliquée dans la nociception et que la galanine et la CCK agissent ensemble pour médier cette fonction.

En conclusion, la large distribution du peptide et sa diversité fonctionnelle suggèrent que la galanine, dont la majorité des rôles physiologiques reste à établir, est un important messager de la communication intercellulaire du système nerveux central et semble impliquée dans de nombreuses fonctions.

# MATERIELS ET METHODES

# **<u>1 - Sujets Expérimentaux</u>**

## 1-1. Animaux, conditions d'élevage:

Les différentes études sont réalisées chez le Cobaye Tricolore mâle adulte, pesant 300-400 g, provenant de l'élevage Cob Labo Lap (Yffiniac, France). Le travail est mené chez le mâle pour éviter toute possibilité de fluctuation en galanine liée aux oestrogènes (Kaplan et coll., 1988 ; Vrontakis et coll., 1989 ; Hsu et coll., 1990). Les animaux sont soumis à un rythme d'éclairement artificiel 12/12 heures, à une température de 18 à 20°C. Ils ont libre accès à la nourriture et à la boisson. Ces conditions permettent de ne pas induire de facteur de stress (Wiesenfeld-Hallin et coll., 1992), ni de modification de l'équilibre physiologique lié au comportement et à la prise de nourriture (Crawley et coll., 1990 ; Kyrkouli et coll., 1990b ; Tempel et Leibowitz, 1990a).

L'étude immunocytochimique est réalisée chez des cobayes Tricolores mâles et chez des femelles adultes, expérimentées dans l'après-midi du prooestrus, provenant de l'élevage Cob Labo Lap, et soumises aux mêmes conditions d'élevage.

L'étude en radioautographie à l'échelle ultrastructurale est menée conjointement chez le Rat Sprague Dawley mâle adulte, pesant 180 à 200 g, provenant de l'élevage d'IFFA Credo (L'Arbresle, France). Ces animaux sont soumis aux mêmes conditions d'élevage que les cobayes.

## 1-2. Sacrifice:

Selon la technique mise en oeuvre, les animaux sont:

- soit décapités sans anesthésie préalable (radioautographie à l'échelle de la microscopie optique, et électronique),

- soit anesthésiés (immunocytochimie) par injection intramusculaire de Rompun-Kétamine, avant d'être perfusés intracardiaquement par le fixateur choisi.

# 2 - Macroradioautographie quantitative

La radioautographie des récepteurs, une technique performante qui permet la localisation anatomique et la quantification de récepteurs, est de très loin la méthode la plus utilisée pour étudier leur distribution.

Le principe général de la méthode radioautographique pour la mise en évidence de récepteurs est semblable à celui utilisé en biochimie dans les études de liaison sur fractions cellulaires. Il utilise les propriétés d'un ligand (neurotransmetteur endogène, agoniste ou antagoniste) à se fixer sur des protéines membranaires (sites) après les avoir reconnues avec une affinité élevée (d'ordre nanomolaire) et de façon spécifique. L'existence d'une liaison non-spécifique sur l'ensemble des tissus, observée en même temps que la liaison du ligand au récepteur, est révélée par introduction de ligand froid en excès dans le milieu.

Le marquage du ligand par un radioisotope permet de visualiser la liaison du ligand à son récepteur par détection des radioéléments émis par contact avec une émulsion nucléaire solide ou liquide.

Dans le cas présent, les sites de liaison étudiés *in vitro* sur coupes sont détectés classiquement par utilisation de films très sensibles, spécialement adaptés au type de traceur employé. La localisation des grains d'argent sur les radioautogrammes est analysée à l'échelle de la microscopie optique, ce qui permet d'identifier et de répertorier au niveau anatomique les régions susceptibles de présenter les récepteurs étudiés.

La quantification régionale des données radioautographiques est obtenue par analyse en microdensitométrie assistée par ordinateur à partir des macroradioautogrammes.

Cette phase du travail constitue donc l'étude des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye par macroradioautographie quantitative.

## 2-1. Choix du radioligand:

La localisation de ces sites est réalisée avec la galanine porcine synthétique marquée à l'iode-125, ou  $^{125}$ I-galanine qui est le marqueur utilisé pour la mise en évidence des récepteurs de la galanine (GAL-R<sub>1</sub>).

De tels ligands iodés sont fréquemment utilisés en radioautographie quantitative de récepteurs car ils possèdent des activités spécifiques très élevées et requièrent des temps d'exposition courts variant de 1 à 5 jours. De plus, l'utilisation d'un traceur marqué à l'iode-125 est intéressante car l'image formée est presque exclusivement due aux électrons de faible énergie émis par cet isotope (émission de particules  $\beta^-$ ), offrant par conséquent une bonne résolution anatomique. Il existe cependant une contrainte technique liée à la demi-vie courte de cet isotope qui nécessite la préparation répétée de standards contenant l'iode-125 pour l'analyse quantitative.

La liaison de la <sup>125</sup>I-galanine est une liaison de haute affinité, réversible (Servin et coll., 1987). La méthode de visualisation radioautographique constitue une technique peu susceptible de présenter des sensibilités à des variations d'espèces ou d'organes pour un type de récepteur donné. De plus, chez les différentes espèces étudiées (Porc, Rat, Singe, Homme... cf. Généralités - 1 - Les différentes formes de galanine) la galanine présente une grande homologie de séquence. Les études antérieures menées chez d'autres espèces révèlent que ce radioligand constitue un bon marqueur des sites de liaison de la galanine (Skofitsch et coll., 1986 ; Melander et coll., 1986b, 1988 ; Servin et coll., 1987 ; Fisone et coll., 1989a ; Köhler et coll., 1989a, 1989b).

D'autre part, la conservation de l'activité biologique a été démontrée pour ce radioligand sur la cellule  $\beta$ -pancréatique (Lagny-Pourmir et coll., 1989a). On peut donc parler non seulement de sites de liaison mais également de récepteurs de la galanine.

## 2-2. Synthèse du radioligand:

La présence de deux résidus tyrosine (Tyr) en position 9 et 26 dans la structure de la galanine permet d'envisager la iodation du peptide.

La galanine est iodée par la méthode à la chloramine T (Amiranoff et coll., 1987; Servin et coll., 1987): 3,2  $\mu$ g de galanine porcine synthétique froide (Sigma, France) sont marqués en présence de 1 mCi de <sup>125</sup>I-Na (Amersham, France) par catalyse de chloramine T 0,5 M, l'oxydation étant stoppée par le métabisulfite de sodium 0,5 M.

Les produits de réaction sont séparés par gel filtration sur colonne Sephadex G-50 fine (Pharmacia, France).



Fig.4: Profil d'activité des fractions recueillies.

Pour notre étude, la fraction peptidique monoiodée est utilisable pour la reconnaissance des sites de liaison.

L'activité spécifique (AS) du radioligand est de 700 Ci/mmole.

La galanine iodée peut être utilisée pendant un mois sans perte significative d'activité de liaison.

## 2-3. Préparation des tissus:

(a) sacrifice des animaux:

Des cobayes Tricolore mâles adultes sont tués par décapitation. Leurs cerveaux sont rapidement disséqués et congelés sur pain de carboglace. Ils sont conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des coupes.

(b) préparation des coupes histologiques:

Des coupes frontales de 20  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées au cryostat Reichert-Jung à -20°C, recueillies sur lames gélatinées (1% de gélatine, 0,1% d'alun de chrome), et stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

## 2-4. Technique de liaison:

Le tampon suivant est utilisé pour la préincubation et l'incubation: 50 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 2 g/l BSA, 0,02 g/l bacitracine (inhibiteur de protéases), à pH 7,4.

Les coupes sont séchées 5 min à température ambiante et préincubées 20 min dans le tampon afin d'éliminer le ligand endogène. Elles sont ensuite incubées à température ambiante dans le même tampon avec la 125I-galanine (liaison totale). Les conditions optimales d'utilisation du radioligand: temps d'incubation et concentration en 125I-galanine ont fait l'objet d'une étude préliminaire utilisant cette technique et développée dans l'avant-dernière partie de ce chapitre.

La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine porcine synthétique froide 100 nM.

Après incubation, elles sont rincées à 4°C dans deux bains consécutifs de tampon froid (5 min chacun), et post-fixées 30 min à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde à 4%. Cette étape de post-fixation permet non seulement de stabiliser le complexe "ligand-site de liaison" au lieu même de sa formation, mais également d'assurer une préservation structurale fine du tissu. La fixation est réalisée à 4°C pour minimiser la dissociation de la liaison, et empêcher la liaison sur des sites non-spécifiques.

Le même travail est réalisé en parallèle en présence de MgCl<sub>2</sub> 5 mM dans le tampon de préincubation, et de GTP 10 mM (Boehringer, West Germany) dans le milieu d'incubation.

## 2-5. Radioautographie:

Après les étapes de liaison et de rinçage, les coupes radiomarquées sont séchées une nuit en étuve à 37°C, pour éviter la dissociation et la diffusion de la liaison, et placées au contact d'Hyperfilms- $\beta$ max (Amersham, France). Après 3 jours d'exposition à température ambiante, les films sont développés 5 min dans le révélateur Kodak D-19b, fixés dans le fixateur Unifix Kodak pendant 10 min, rincés 20 min sous eau courante, puis séchés.

Pour chaque film, on expose une lame d'étalonnage de standards préparés à partir de pâte de cerveau présentant des taux croissants de 125I-galanine.

62

## 2-6. Analyse des résultats:

(a) morphologique:

Les coupes correspondant aux radioautogrammes sont colorées à la thionine pour repérer les structures histologiques marquées selon les descriptions des atlas (Dubois-Dauphin et coll., 1989). L'identification des sites de liaison est effectuée par projection et superposition des structures et du radioautogramme.

Une cartographie des récepteurs est obtenue par agrandissement photographique des radioautographies.

(b) quantitative:

Les radioautogrammes sont quantifiés par densitométrie en utilisant un système d'analyse d'image assisté par ordinateur: SAMBA 2005 (Alcatel, TITN Answare, France) couplé à une caméra JVC K415C1 (Leitz, Germany).

L'analyseur d'image transforme les radioautogrammes en images digitalisées (512x512 pixels ; 256 niveaux de gris/pixel). La moyenne des densités optiques des aires des régions dessinées pour les différentes structures cérébrales est estimée par ordinateur par rapport au fond du film.

La conversion des densités optiques en fmol/mg de protéines tissulaires est réalisée à partir de lames d'étalonnage standard préparées à partir d'homogénats de cerveau de cobayes présentant des taux croissants de 125I-galanine apposés à chaque film. Les taux de protéines tissulaires sont déterminés par dosage avec un réactif à l'acide bicinchoninique (BCA, Pierce). L'utilisation de ces standards de calibration permet, par régression linéaire (r=0,997), de convertir les densités optiques mesurées en quantités de sites par mg de protéines tissulaires.

Les mesures de chaque région ou noyau sont faites bilatéralement à partir de trois coupes adjacentes par niveau (deux coupes correspondant à la liaison totale et une coupe correspondant à la liaison non-spécifique) pour chaque cerveau expérimenté. La liaison spécifique est déterminée par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale pour un même niveau de coupe. Pour chaque cobaye, le taux de densité de sites dans une région donnée résulte de la moyenne des densités obtenues pour la région. Pour cette région, les valeurs individuelles sont alors moyennées pour tous les animaux pour chaque technique d'étude de liaison.

Dans un premier temps, pour chaque région et pour chaque animal, les écarts standards à la moyenne sont calculés et comparés entre eux. L'analyse des résultats permet de démontrer l'homogénéité de chaque population.

Dans un second temps, la moyenne des moyennes au sein de chacun des deux groupes expérimentaux (avec ou sans  $Mg^{2+}/GTP$ ) permet de comparer les deux techniques d'étude des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en fonction des fluctuations individuelles (n=8). Le test de t de Student indique la signification des différences entre groupes.

## 2-7. Détermination des conditions d'utilisation du ligand:

Aucune étude de liaison n'ayant été menée jusqu'ici chez le Cobaye, des expériences préliminaires utilisant les méthodes de radioautographie quantitative sont réalisées pour déterminer le temps d'incubation et la concentration en radioligand appropriés pour réaliser les expériences de distribution radioautographique. Les conditions optimales de liaison de la 125I-galanine sont déterminées sur coupes de cerveau non fixé de Cobaye (n=6) de 20 µm préparées comme décrit ci-dessus. Ces valeurs sont déterminées pour les deux conditions expérimentées lors de l'étude de récepteurs à savoir en présence et en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le milieu de travail.

(a) étude cinétique:

Pour déterminer le temps d'incubation optimal, des coupes de télencéphale et de diencéphale sont incubées avec la <sup>125</sup>I-galanine 1,5 nM pour des temps variant de 0 à 180 min. Les radioautogrammes sont digitalisés et quantifiés par analyse d'image, selon les descriptions faites précédemment, pour plusieurs régions: amygdale centrale (Ce), hypothalamus latéral (LH), éminence médiane (ME), strie médullaire (SM) et zone incerta (ZI).

Pour toutes les régions étudiées, l'analyse des courbes de cinétique, en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu, permet d'observer un plateau de liaison spécifique à approximativement 120 min (Fig.5A).



**Fig.5**: Cinétique de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine réalisée par radioautographie quantitative de coupes de cerveau de Cobaye en absence (A) et en présence (B) de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu. Les valeurs sont exprimées en terme de liaison spécifique. Chaque courbe correspond à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. Le coefficient de variation (S.E.M.) est inférieur à 10%.

Ce: amygdale centrale ; ZI: zone incerta ; SM: strie médullaire ; ME: éminence médiane ; LH: hypothalamus latéral.



**Fig.6:** Cinétique de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine réalisée sur coupes de cerveau de Cobaye en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ . Les résultats sont exprimés pour les différentes régions étudiées en fmol/mg protéines tissulaires en terme de liaison totale (T) et non-spécifique (NS). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine froide 100 nM dans le milieu d'incubation. Chaque courbe représente la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. Le coefficient de variation (S.E.M.) est inférieur à 10%.

Ce: amygdale centrale ; ZI: zone incerta ; SM: strie médullaire ; ME: éminence médiane ; LH: hypothalamus latéral.

66



**Fig.7:** Cinétique de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine réalisée sur coupes de cerveau de Cobaye en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. Les résultats sont exprimés pour les différentes régions étudiées en fmol/mg protéines tissulaires en terme de liaison totale (T) et non-spécifique (NS). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine froide 100 nM dans le milieu d'incubation. Chaque courbe représente la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. Le coefficient de variation (S.E.M.) est inférieur à 10%.

Ce: amygdale centrale ; ZI: zone incerta ; SM: strie médullaire ; ME: éminence médiane ; LH: hypothalamus latéral.

67
L'analyse des résultats (Fig.6) permet de déterminer qu'après 120 min d'incubation à température ambiante, la liaison spécifique représente uniformément plus de 52% de la liaison totale sur coupes frontales de cerveau. Dans les conditions normales d'incubation, dans des régions de l'hypothalamus et du thalamus, la liaison non-spécifique représente approximativement moins de 48% de la liaison totale (Ce: 38,9%; ME: 43,9%; ZI: 45,6%; SM: 46,2%; LH: 47,7%). La liaison non-spécifique est déterminée par déplacement de la <sup>125</sup>I-galanine sur les coupes. Les coupes 'non-spécifiques' présentent peu de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence de 100 nM de galanine froide.

Les expériences réalisées en présence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu d'incubation valident cette information. L'observation des courbes de cinétique permet d'observer un plateau de liaison spécifique pour un temps d'incubation de 120 min (Fig.5B). Dans ce cas, la liaison spécifique représente plus de 75% de la liaison totale. La liaison non-spécifique (Fig.7) représente alors moins de 25% de la liaison totale (ZI: 19,8%; LH: 19,9%; Ce: 21,0%; SM: 23,1%; ME: 24,3%).

Les résultats obtenus pour les deux techniques de liaison indiquent que l'introduction de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le milieu augmente la spécificité de la liaison d'approximativement 20% pour une durée d'incubation de 120 min (Figs 6,7). L'apport de Mg<sup>2+</sup>/GTP modifie la cinétique de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine (Fig.5). Pour chaque région, le temps requis pour atteindre le demi-équilibre de liaison spécifique ( $\theta_{1/2}$ ) calculé dans les conditions standard (Ce # 61 min, ZI # 42 min, SM # 55 min, ME # 69 min, LH # 72 min) est augmenté en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP (Ce # 77 min, ZI # 56 min, SM # 61 min, ME # 78 min, LH # 81 min). Dans cette condition, on observe de façon surprenante un effet biphasique sur la cinétique de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine. D'autre part, on constate que le Mg<sup>2+</sup>/GTP a des effets inverses selon les régions sur la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine (Fig.5). La comparaison des deux conditions expérimentales met en évidence une diminution de la liaison dans l'amygdale centrale et la strie médullaire et une augmentation dans la zone incerta, l'hypothalamus latéral et l'éminence médiane.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer un temps de 120 min comme approprié pour les études de liaison *in vitro* sur coupes dans les conditions précitées.



**Fig.8:** Courbes de saturation de la <sup>125</sup>I-galanine (0,2 à 5 nM) déterminées par radioautographie quantitative. Les résultats sont exprimés en fmol/mg de protéines pour les liaisons spécifiques en absence (A) et en présence (B) de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu d'incubation. La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine froide 100 nM. Chaque courbe correspond à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. L'écart standard à la moyenne (S.E.M.) est inférieur à 8%.



**Fig.9:** Courbes de saturation de la <sup>125</sup>I-galanine (0,2 à 5 nM) déterminées par radioautographie quantitative en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. Les résultats sont exprimés en fmol/mg de protéines tissulaires pour les liaisons totales (T) et non-spécifiques (NS). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine froide 100 nM. Chaque courbe correspond à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. L'écart standard à la moyenne (S.E.M.) est inférieur à 8%.

70



**Fig.10:** Courbes de saturation de la <sup>125</sup>I-galanine (0,2 à 5 nM) déterminées par radioautographie quantitative en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. Les résultats sont exprimés en fmol/mg de protéines tissulaires pour les liaisons totales (T) et non-spécifiques (NS). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de galanine froide 100 nM. Chaque courbe correspond à la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat. L'écart standard à la moyenne (S.E.M.) est inférieur à 7%.

71



**Fig. 11:** Graphes de Scatchard pour la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine déterminés en absence (A) et en présence (B) de Mg<sup>2+/</sup>GTP dans le milieu d'incubation. Chaque droite représente la moyenne de trois expériences réalisées en triplicat.

(b) étude de saturation:

La détermination des caractéristiques de la <sup>125</sup>I-galanine pour les récepteurs de la galanine est réalisée dans des conditions identiques à celles de l'étude cinétique dans les mêmes régions d'investigation. Les critères d'identification des récepteurs sont étudiés pour des temps d'incubation de 120 min et des concentrations en radioligand comprises entre 0,2 et 5 nM.

Les études de saturation de la <sup>125</sup>I-galanine, par radioautographie quantitative, sur coupes frontales de télencéphale et de diencéphale de Cobaye révèlent que la liaison est saturable (Fig.8).

L'étude des courbes de saturation en terme de liaison totale (T) et nonspécifique (NS), en absence (Fig.9) et en présence (Fig.10) de Mg<sup>2+</sup>/GTP, permet d'observer que l'introduction de Mg<sup>2+</sup>/GTP diminue le pourcentage de liaison non-spécifique par rapport à la liaison totale. Par calcul, on détermine qu'à 120 min d'incubation, pour une concentration 1,5 nM de <sup>125</sup>I-galanine on augmente la spécificité de la liaison d'approximativement 20%, en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

L'analyse des courbes de saturation en terme de liaison spécifique, dans les deux cas (Fig.8), montre que l'introduction de Mg<sup>2+</sup>/GTP modifie la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine différemment selon les structures étudiées. Dans ce cas, on constate que la liaison peut être soit augmentée: éminence médiane (ME), zone incerta (ZI), hypothalamus latéral (LH) ; soit diminuée: amygdale centrale (Ce), strie médullaire (SM).

L'analyse formelle de Scatchard (Fig.11) permet de déterminer pour les différentes structures étudiées deux critères d'identification des récepteurs de la galanine chez le Cobaye:

- la constante de dissociation à l'équilibre du complexe ligand-récepteur  $(K_D)$  exprimée en nM qui traduit l'affinité du ligand pour le récepteur (Tableau 3),

- ainsi que la densité de sites spécifiques  $(B_{max})$  exprimée en fmol/mg de protéines tissulaires (Tableau 3).

	K <sub>D</sub> (nM)		B <sub>max</sub> (fmol/mg prot.)	
	-Mg <sup>2+</sup> /GTP	+Mg <sup>2+</sup> /GTP	-Mg <sup>2+</sup> /GTP	+Mg <sup>2+</sup> /GTP
Ce	$1,00\pm0,08$	1,45±0,13	143,69±4,39	95,02±9,16
ZI	1,04±0,06	0,98±0,14	49,14±8,11	78,87±6,69
SM	1,05±0,11	1,24±0,08	50,86±6,83	21,20±0,34
ME	1,07±0,09	0,94±0,08	32,19±3,19	48,15±2,77
LH	1,16±0,08	1,04±0,10	6,75±0,51	$11,24\pm1,43$

**Tableau 3:** K<sub>D</sub> (nM) et  $B_{max}$  (fmol/mg de protéines) de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de GTP pour les différentes régions étudiées. Les valeurs sont déterminées par analyse de Scatchard.

L'analyse de Scatchard de l'étude de liaison (Fig.11) démontre l'existence d'une seule classe de sites de liaison de haute affinité de la <sup>125</sup>I-galanine pour les récepteurs de la galanine au sein des structures étudiées. Pour toutes les régions, les droites de Scatchard présentent des coefficients de corrélation significatifs que l'on travaille dans les conditions standard (Ce: r=0,988 ; SM: r=0,988 ; ZI: r=0,977 ; ME: r=0,982 ; LH: r=0,990) ou en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP (Ce: r=0,991 ; SM: r=0,985 ; ZI: r=0,993 ; ME: r=0,987 ; LH: r=0,989).

Les valeurs de densités de sites calculées confirment les résultats obtenus par étude des courbes de saturation. L'addition de Mg<sup>2+</sup>/GTP a des effets inverses selon les régions sur la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine. Un effet stimulateur apparaît dans la zone incerta (x 1,61), l'éminence médiane (x 1,50) et l'hypothalamus latéral (x 1,67) où on détecte une augmentation du B<sub>max</sub>. Un effet inhibiteur sur la liaison est mis en évidence dans l'amygdale centrale (x 0,66) et la strie médullaire (x 0,42) où le B<sub>max</sub> diminue.

La comparaison des K<sub>D</sub> en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ démontre que le  $Mg^{2+}/GTP$  diminue l'affinité du ligand  $(1/K_D)$  pour le récepteur dans l'amygdale centrale et la strie médullaire où le K<sub>D</sub> est multiplié respectivement par 1,45 et 1,18. Par contre, dans la zone incerta, l'hypothalamus latéral et l'éminence médiane où le  $Mg^{2+}/GTP$  a un effet stimulateur sur la liaison aucune variation significative de l'affinité n'est mise en évidence. On choisit de se placer à la concentration 1,5 nM de  $^{125}$ I-galanine, supérieure aux K<sub>D</sub> déterminés, pour les études de localisation des récepteurs de la galanine, de manière à démasquer un maximum de sites.

# 2-8. Localisation radioautographique des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye:

Aux vues des résultats précédents, la localisation radioautographique des récepteurs de la galanine (GAL-R<sub>1</sub>) est réalisée dans le cerveau de Cobaye (n=8) à la concentration 1,5 nM de <sup>125</sup>I-galanine pour des temps d'incubation de 120 min en présence ou en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. La liaison non-spécifique est déterminée par addition de 100 nM de galanine synthétique non marquée dans le milieu d'incubation.

## 3 - Immunocytochimie

L'immunocytochimie constitue une technique d'une extrême sensibilité pour la localisation de peptides en biologie cellulaire.

Le principe de la méthode, basé sur la réaction antigène-anticorps, repose essentiellement sur l'anticorps qui va reconnaître l'antigène cellulaire. Sa spécificité est déterminante pour sa localisation, tandis que son affinité est déterminante pour la sensibilité de sa détection.

Dans le cas présent, les antigènes cellulaires sont détectés sur coupes à l'échelle de la microscopie photonique par immunofluorescence indirecte. La détection simultanée de plusieurs antigènes permet d'établir, de manière précise, les bases morphologiques des interrelations entre différentes molécules. D'un point de vue pratique, deux procédés peuvent être envisagés: (1) une comparaison de plusieurs coupes sériées traitées par des anticorps différents couplés à un même marqueur ; (2) plusieurs marquages simultanés sur une même coupe révélés par des anticorps couplés à différents marqueurs.

Cette partie du travail concerne l'identification des structures neuronales à galanine dans l'hypothalamus de Cobaye, ainsi qu'une comparaison de sa distribution avec celles du GnRH et du GRF.

### **3-1.** Préparation des tissus:

(a) traitement par la colchicine:

A l'exception de trois cobayes considérés comme animaux témoins, les animaux sont traités à la colchicine. Ce traitement, initialement employé par Barry et collaborateurs (1973a et b), a pour but de charger le corps cellulaire du neurone en produit de sécrétion puisqu'il désorganise le cytosquelette et entraîne un blocage du flux axonique. Il conduit ainsi à un renforcement de l'immunoréactivité du péricaryon et donc de sa visualisation.

76

Après anesthésie par injection intramusculaire de Rompun-Kétamine, les cobayes, sont placés dans un appareil stéréotaxique (Serva, Paris) pour recevoir une injection intraventriculaire de colchicine (150  $\mu$ g/15  $\mu$ l de sérum physiologique) 48 heures avant leur sacrifice.

(b) sacrifice des animaux:

Les animaux sont anesthésiés et perfusés avec une solution de sérum physiologique héparinée (150 ml), pour éviter la présence d'éléments figurés du sang dans les vaisseaux irriguant le cerveau, puis avec 1 litre de mélange d'acide picrique et de paraformaldéhyde tamponné (0,2% acide picrique, 4% paraformaldéhyde, dans un tampon phosphate 0,1 M, à pH 7,4).

Après dissection, leurs cerveaux sont immergés 2 heures à 4°C dans le même fixateur avant d'être plongés, pour la nuit à 4°C, dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 contenant 20% de sucrose (cryoprotection).

La congélation est réalisée dans l'isopentane (méthyl-2-butane) refroidi par l'azote liquide. Les blocs sont conservés au congélateur à -80°C.

(c) préparation des coupes histologiques:

Des coupes de 2 à 7  $\mu$ m sont effectuées au cryostat Reichert-Jung à -20°C, montées sur lames traitées à la gélatine-alun de chrome (0,6% de gélatine, 0,2% d'alun de chrome) et séchées à l'air libre.

## **3-2.** Préparation des anticorps:

Les anticorps ont été généreusement fournis par Gérard TRAMU (Talence).

Afin d'augmenter l'immunogénicité de l'antigène synthétique, celui-ci est couplé à une protéine porteuse, la sérum albumine, par l'intermédiaire d'un agent couplant, le glutaraldéhyde (Vance et coll., 1968).

• L'anti-galanine a été obtenu par immunisation d'un lapin avec de la galanine 1-29 de porc (Bachem, Suisse) couplée à la sérum albumine humaine (HSA) avec du glutaraldéhyde.

Les test RIA montrent l'absence de réactions croisées. Par ailleurs, la réaction immunocytochimique disparaît après saturation de l'anticorps avec 10<sup>-6</sup> M de galanine.

• L'anti-GRF<sub>1-44</sub> (Bachem, Suisse) est obtenu chez le lapin après couplage à la sérum albumine humaine par le glutaraldéhyde.

La saturation de l'anticorps est obtenue avec 10<sup>-7</sup> M du peptide homologue alors qu'aucune abolition de la réaction n'est obtenue avec des anticorps hétérologues (Beauvillain et coll., 1987).

• L'anti-GnRH a été produit par un cobaye après couplage du décapeptide (U.C.B.) avec de la sérum albumine humaine par du glutaraldéhyde.

La saturation de l'anticorps est obtenue avec 10<sup>-6</sup> M du peptide homologue. Par ailleurs, l'anticorps donne des résultats immunocytochimiques parfaitement superposables à ceux obtenus avec l'anti-GnRH produit chez le lapin et qui a été contrôlé (Barry et coll., 1973a, 1974 ; Beauvillain et Tramu, 1980).

Quels que soient les anticorps utilisés, la saturation par des peptides hétérologues n'a jamais été obtenue. Par ailleurs, la comparaison des résultats avec des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Barry et coll., 1973a, 1974 ; Beauvillain et Tramu, 1980 ; Beauvillain et coll., 1987) démontrent que nos réactions sont spécifiques respectivement pour la galanine, le GRF et le GnRH et qu'aucun autre neuropeptide n'est marqué.

## 3-3. Réactions immunocytochimiques:

- <u>simple marquage</u>:

Les coupes sont incubées dans le sérum spécifique (anti-galanine, anti-GnRH ou anti-GRF) pendant 12 heures à température ambiante.

- L'anti-galanine de Lapin est dilué au 1/600e dans du tampon COONS (véronal sodique 2,06 g/l, NaCl 8,5 g/l, azide 0,125 g/l, ajusté à pH 7,6 par l'HCl 1N, q.s.p. 11 d'eau distillée) contenant 0,25 p.100 de triton X-100 ;

- L'anti-GnRH de Cobaye est dilué au 1/8000e dans le même tampon ;

- L'anti-GRF<sub>1-44</sub> de Lapin est dilué au 1/600e également dans le même tampon.

Après rinçage dans le tampon, le sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dilué au 1/100e est appliqué sur les coupes pendant 60 minutes à la température du laboratoire.

Les coupes sont ensuite rincées dans le même tampon et sont montées dans un milieu glycériné (9 cc glycérine, 1 cc tampon COONS, en présence de 1% paraphénylène-diamine pour éviter une perte de l'intensité de fluorescence), puis observées.

- double marquage:

Le double marquage a été effectué exclusivement pour la galanine et le GnRH (dans la mesure où les anticorps ont été fabriqués chez des espèces différentes, respectivement le Lapin et le Cobaye).

Les deux anticorps sont mélangés et utilisés aux mêmes concentrations que pour le simple marquage.

Après rinçage dans du COONS, un mélange d'anticorps secondaires anti-Lapin marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (1/100e) et d'anticorps secondaires anti-Cobaye marqués à l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine (1/100e) est appliqué sur les coupes pendant 60 minutes.

## **3-4.** Observations:

Après montage, les lames sont observées au microscope Axiophot Zeiss, équipé pour l'épifluorescence, possédant une combinaison de filtres adaptés:

- filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine (combinaison 48-79-10) ;
- filtre pour la rhodamine (combinaison 48-79-20).

## 4 - Radioautographie à l'échelle ultrastructurale

Le principe général, identique à celui de la macroradioautographie, implique le marquage sélectif du récepteur étudié par un radioligand (agoniste ou antagoniste) et la détection de la liaison par contact des coupes avec une émulsion photographique.

L'application de la technique à la visualisation de ces sites au niveau ultrastructural impose plusieurs exigences techniques supplémentaires et notamment une légère préfixation des cerveaux afin de préserver la morphologie. D'autre part, la procédure d'inclusion ayant tendance à décrocher la liaison ligand-récepteur, une post-fixation est absolument nécessaire.

Brièvement, la méthode de radioautographie haute résolution nécessite: l'incubation de coupes de cerveaux légèrement préfixés avec le ligand radioactif en absence (liaison totale) ou en présence (liaison nonspécifique) d'un excès de compétiteur froid ; la fixation de la liaison par un agent divalent ; la post-fixation, la déshydratation et l'inclusion des coupes dans une résine ; la réalisation de coupes semifines et ultrafines traitées respectivement pour la radioautographie en microscopie photonique et électronique selon les techniques classiques de trempage dans une émulsion photographique liquide ("dipping").

Les sites de liaison du ligand marqué sont visualisés sous forme de grains d'argent, ou tortillons. Ils sont analysés à l'échelle de la microscopie électronique dans une région donnée. La quantification des données est réalisée par traitement statistique de la répartition des grains d'argent.

Cette technique permet d'analyser la distribution fine de récepteurs donnés au sein d'une structure particulière.

Cette partie du travail concerne l'étude à l'échelle ultrastructurale de la localisation des récepteurs de la galanine dans l'éminence médiane menée comparativement chez le Rat et le Cobaye.

## 4-1. Choix du radioligand:

La localisation de ces sites est réalisée avec la <sup>125</sup>I-galanine, comme pour l'étude macroradioautographique

L'activité spécifique très élevée de la 125I-galanine, la faible taille de la molécule, et le pouvoir pénétrant de l'iode permettent de dire qu'elle constitue un bon ligand pénétrant facilement dans le tissu pour le travail sur coupes épaisses de 80  $\mu$ m.

## 4-2.Synthèse du radioligand:

La galanine porcine synthétique froide est iodée par la méthode à la chloramine T (cf. Macroradioautographie quantitative).

Du fait de la demi-vie courte de l'isotope et de la durée relativement importante d'exposition, la galanine iodée est utilisée dans la semaine pour l'incubation.

## 4-3. Conditions d'utilisation du radioligand:

Pour une estimation quantitative correcte, il est admis que l'étude doit être effectuée sur les radioautographies dont le nombre de grains d'argent développé par unité de surface est largement inférieur à la saturation de l'émulsion nucléaire. Du fait de l'activité spécifique élevée de la 125Igalanine, la radioautographie haute résolution nécessite de travailler avec de faibles concentrations en ligand radioactif. Les études de liaison sont donc menées en présence de 125I-galanine 0,2 nM dans le milieu d'incubation.

## 4-4. Détermination des conditions de préfixation:

L'étude de récepteurs en microscopie électronique requiert une préfixation légère des tissus pour faciliter la réalisation des coupes au vibratome et surtout pour permettre une préservation morphologique relativement correcte des structures.

L'étude de la localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine étant réalisée au niveau de l'éminence médiane, des expériences préliminaires, en vue de déterminer le meilleur compromis de fixation, sont menées sur coupes cryostat de cerveau de Cobaye, contenant l'éminence médiane, traitées avec la <sup>125</sup>I-galanine 0,2 nM pour plusieurs types de préfixations. Des expériences antérieures portant sur l'étude de récepteurs  $\mu$  opioïdes au niveau de l'éminence médiane ont révélé qu'une préfixation des tissus par immersion conserve mieux la morphologie qu'en préfixant par perfusion. Seule cette technique de préfixation par immersion a été utilisée avec les mélanges suivants:

- milieu 1: paraformaldéhyde à 1%;
- milieu 2: 0,75% paraformaldéhyde, 0,1% glutaraldéhyde, 1% acide tannique ;
- milieu 3: glutaraldéhyde à 1% ;
- milieu 4: glutaraldéhyde à 0,1%.

Chaque milieu est préparé dans du tampon phosphate Sörensen 0,12 M. Dans tous les cas, la préfixation est de 10 minutes.

Une série de coupes traitées simultanément dans les mêmes conditions sur tissus frais sans préfixation sert de témoin.

Le taux de liaison est déterminé pour les différents traitements par comptage de coupes grattées sur papier filtre avec un compteur d'émission de particules  $\beta$ .

La comparaison des différentes préfixations en terme de liaison (Fig.12A) montre que la préfixation des tissus augmente la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine. D'autre part, la liaison spécifique la plus élevée est obtenue par immersion des tissus dans le milieu 2, bien que la liaison totale soit moins élevée que celle obtenue par immersion avec 1% de glutaraldéhyde (milieu 3).

La comparaison des rapports de liaisons spécifique/totale (Fig.12B) des différentes préfixations permet d'observer que ce rapport est pratiquement semblable sauf pour le milieu 3. De même, à l'exception du milieu 3, on constate que ce rapport est pratiquement équivalent quand on travaille sur tissus frais et en préfixant par immersion.

Compte tenu de ces résultats et ayant constaté que la préfixation par le milieu 2 procurait les meilleures conditions pour effectuer les coupes au vibratome ainsi qu'une meilleure conservation des tissus à l'échelle ultrastructurale, ce milieu a été retenu pour la suite de nos travaux.

#### A- Effets sur la liaison







milieu 1: 1% paraformaldéhyde; milieu 2: 0,75% paraformaldéhyde, 0,1% glutaraldéhyde, 1% acide tannique; milieu 3: 1% glutaraldéhyde; milieu 4: 0,1% glutaraldéhyde.

## 4-5. Traitement des tissus:

(1) sacrifice des animaux:

Des cobayes Tricolore mâles (n=6) et des rats Sprague Dawley mâles (n=6) sont tués par décapitation. Leurs cerveaux sont immédiatement disséqués et fixés par immersion pendant 10 min dans le fixateur froid: 0,75% paraformaldéhyde, 0,1% glutaraldéhyde, 1% acide tannique, dans du tampon phosphate Sörensen 0,12 M, à pH 7,4.

(2) préparation des coupes:

Les cerveaux sont rapidement prélevés et coupés au Vibratome S 1000 (Labonord, Villeneuve d'Ascq-France), en tranches frontales de 80  $\mu$ m d'épaisseur contenant l'éminence médiane.

### 4-6. Technique de liaison:

Les coupes sont immédiatement préincubées 20 min à température ambiante dans un tampon Tris (50 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 2 g/l BSA, 0,02 g/l bacitracine, à pH 7,4), puis incubées dans le même tampon 2 heures à température ambiante avec la <sup>125</sup>I-galanine 0,2 nM. La liaison non-spécifique est déterminée en présence de 100 nM de galanine froide.

Après deux rinçages consécutifs (5 min chacun) dans du tampon froid à 4°C, les coupes sont fixées 30 min à 4°C dans un mélange 0,05 M tampon phosphate-4% glutaraldéhyde.

Le même travail est réalisé en parallèle, comme pour la macroradioautographie, en présence de MgCl<sub>2</sub> 5 mM dans le tampon de préincubation, et de GTP 10 mM dans le tampon d'incubation.

## 4-7. Traitement histologique des tranches:

(1) post-fixation et inclusion:

Les tranches épaisses sont post-fixées 1 heure à température ambiante dans du tétroxyde d'osmium (OsO4) à 2%, déshydratées dans des bains de méthanol de concentrations croissantes, puis passées dans l'oxyde de propylène, avant d'être incluses dans l'Araldite.

(2) ultramicrotomie:

Une fois polymérisés, les blocs d'araldite contenant les tranches de tissu sont taillés et des coupes sont réalisées à l'ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung).

Pour le suivi de la réaction de liaison de la 125I-galanine dans l'éminence médiane en microscopie optique, des coupes semi-fines de 2  $\mu$ m d'épaisseur, prélevées à la surface de chaque bloc, sont recueillies sur lames nettoyées dans un mélange alcool-acide chlorhydrique.

Pour la microscopie électronique, des coupes ultrafines de 90 nm d'épaisseur provenant des mêmes blocs sont récupérées sur lames recouvertes de celloïdine (2% dans l'acétate d'isoamyl). Les coupes sont déposées à 2,5 cm du bord inférieur de la lame de manière à assurer une épaisseur monocristalline uniforme de l'émulsion.

## 4-8. Radioautographie des coupes semi-fines:

Selon la technique classique de "dipping", les coupes semi-fines sont trempées dans une émulsion pour microscopie optique LM-1 (Amersham, France) à 43°C en chambre noire. Après séchage d'une nuit, les lames sont exposées à température ambiante en boîtes noires étanches en présence de gel de silice (Prolabo, France).

Après 3, 6 et 9 semaines d'exposition, les radiographies sont développées 2 min 30 à température ambiante dans le révélateur Kodak D19-b, avant d'être fixées 5 min dans du thiosulfate de sodium à 30%. Après trois rinçages de 10 min dans l'eau et séchage, les coupes sont colorées au Bleu Azur 0,5‰.

## 4-9. Radioautographie à haute résolution:

Les lames sur lesquelles ont été déposées les coupes ultrafines sont plongées 15 min dans de l'acétate d'uranyle 2,5%, puis 9 min dans du citrate de plomb 0,4% avant d'être carbonées et trempées dans une émulsion pour microscopie électronique EM-1 (Amersham, France). Après séchage, elles sont stockées à l'abri de la lumière en présence d'anhydride phosphorique (Prolabo, France).

Après 3 à 4 mois d'exposition, les radioautographies sont développées dans le Microdol-X (Kodak, France) pendant 2 min 30 à température ambiante, fixées 5 min au thiosulfate de sodium 30% et rincées à l'eau bidistillée (3 fois 10 min) à 4°C. Les coupes récupérées sur grilles de cuivre de 200 mailles, par décollement des membranes à la surface de l'eau, sont observées au microscope électronique Zeiss 902 après amincissement des membranes de celloïdine par l'acétate d'isoamyle.

### 4-10. Analyse des radioautographies:

(1) à l'échelle de la microscopie optique:

Les coupes semi-fines sont observées au microscope photonique (Axiophot, Zeiss, West Germany) et la zone externe de l'éminence médiane est photographiée à l'objectif 63x1,25 à immersion. Après agrandissement des photomicrographies, les grains d'argent sont dénombrés par comptage manuel dans la zone externe de l'éminence médiane. Les densités de sites marqués sont calculées en nombre de grains par unité de surface pour chaque coupe vibratome. La liaison spécifique, exprimée comme la différence de la liaison non-spécifique à la liaison totale, est déterminée dans la zone externe de l'éminence médiane pour chaque expérience, en référence à la coupe adjacente incubée en présence de 100 nM de galanine froide. (2) à l'échelle de la microscopie électronique:

Les sites marqués par la <sup>125</sup>I-galanine sont mis en évidence par la présence de grains d'argent, ou tortillons. Du fait d'une résolution relativement limitée de la méthode, l'analyse précise de la distribution de ces tortillons s'impose visant essentiellement à évaluer la localisation précise des sources radioactives. La répartition des grains est analysée selon la méthode des cercles de probabilité de Blackett et Parry (1977) modifiée par Hamel et Beaudet (1984). Il est à noter que toutes les grilles analysées ne présentaient aucun bruit de fond en dehors des coupes.

Les coupes traitées sont systématiquement analysées et tous les grains d'argent photographiés à un grandissement de 12000 X.

La localisation de chaque grain d'argent, associée à une structure (grain exclusif) ou à une combinaison de structures (grain partagé) est enregistrée et tabulée.

La distribution de la liaison spécifique est déterminée par soustraction de la liaison non-spécifique à la liaison totale comme suit. Tout d'abord, le nombre de grains d'argent enregistrés sur les coupes incubées en présence de compétiteur froid (liaison non-spécifique) est proportionnellement ajusté pour chaque compartiment tissulaire en référence au pourcentage de liaison non-spécifique par rapport à la liaison totale déterminé en mesurant le contenu de radioactivité sur coupes semi-fines. Les valeurs résultantes sont alors soustraites du nombre de grains enregistrés pour les compartiments correspondants des coupes incubées avec le ligand radioactif seul (liaison totale). Enfin, la distribution résultante (liaison spécifique) est rapportée à 100.

Pour estimer l'enrichissement relatif des divers compartiments marqués, la distribution des grains "spécifiques" est comparée à celle d'une population distribuée au hasard, grains "hypothétiques". Cette population de grains hypothétiques est déterminée en superposant à chaque micrographie électronique un ensemble régulier de cercles de résolution de même diamètre (ayant le diamètre moyen des grains réels), en enregistrant et en tabulant les structures uniques ou combinaisons de structures couvertes par ces grains. Pour l'analyse, les distributions de grains spécifiques et hypothétiques partagés sont regroupés ultérieurement en catégories incluant deux structures apposées. Les grains recouvrant plus de deux structures sont redistribués en tenant compte de la fréquence de marquage de chaque paire de catégories. Ainsi, les grains situés sur plusieurs structures différentes dont deux de même nature (exemple: A-A-B) sont redistribués proportionnellement à deux compartiments qu'ils recouvrent (A-A, A-B) en fonction de l'importance de marquage de chacune des catégories considérées.

La comparaison de la distribution des grains spécifiques et hypothétiques est évaluée statistiquement par un test de  $X^2$  comme décrit antérieurement (Hamel et Beaudet, 1984a).

## RESULTATS

## <u>1 - Distribution des récepteurs de la galanine dans</u> <u>le cerveau de Cobaye.</u>

La distribution des récepteurs de la galanine ( $GAL-R_1$ ) dans le cerveau de Cobaye est étudiée par macroradioautographie quantitative.

Les sites de liaison de la galanine porcine marquée à l'iode 125 détectés sur coupes de cerveaux non-fixés sont de haute-affinité, saturables (cf. Matériels et Méthodes), et spécifiques des récepteurs de la galanine (Lagny-Pourmir et coll., 1989a).

Les récepteurs sont visualisés *in vitro* par radioautographie à une concentration 1,5 nM de <sup>125</sup>I-galanine. La liaison non-spécifique est déterminée par addition de galanine froide 100 nM au milieu d'incubation.

Cette étude est réalisée en parallèle en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  pour étudier les effets du nucléotide sur la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine. Dans les deux cas, la liaison non-spécifique n'est pas significative et n'interfère pas avec l'observation de la liaison spécifique (Fig.13).

Cette partie du travail traite des résultats obtenus sur la localisation, la quantification, et la distribution des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye, et des effets du nucléotide sur l'expression de ces récepteurs.

## 1-1. Localisation des récepteurs:

La répartition des grains d'argent sur les radioautogrammes permet de définir la localisation des récepteurs de la galanine. Le repérage histologique des différentes structures est réalisé par coloration des coupes à la thionine après expériences radioautographiques. La corrélation établie par superposition des radioautographies et l'identification histologique permet d'établir une cartographie précise des récepteurs (Figs.14,15,16,17).

90

## Fig.13:

Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie *in vitro* sur coupes frontales de cerveau de Cobaye marqués par la 125I-galanine 1,5 nM en présence (A) et en absence (B) de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

La liaison totale (T) est détectée en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule. Le marquage non-spécifique (NS), déterminé par addition de galanine froide 10<sup>-7</sup> M au milieu d'incubation, empêche la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine.

A- 125I-Gal +Mg2+/GTP



B- 125I-Gal -Mg2+/GTP





D'une façon générale, l'utilisation des techniques en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  fait apparaître un grand nombre de structures marquées (Figs 14,15,16,17-Tableau 4). L'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  permet d'observer en plus de ceux existants déjà des sites de liaison non exprimés dans le premier cas (cf. Effets de  $Mg^{2+}/GTP$  sur l'expression des récepteurs de la galanine). Une distribution plus représentative des récepteurs de la galanine est donc établie par étude de liaison de la 125I-galanine en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ . La cartographie des récepteurs de la galanine présentée dans ce travail résulte par conséquent de l'étude menée en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ . Une schématisation histologique de chaque coupe est dessinée en regard de la radioautographie correspondante pour une lecture directe de l'information.

## 1-2. Analyse quantitative des données radioautographiques:

L'analyse densitométrique des radioautographies permet d'obtenir une quantification de l'information radioautographique. L'utilisation de standards de calibration permet de convertir les densités optiques mesurées en quantité de sites par mg de protéines tissulaires (Tableau 4). Toutes les valeurs sont exprimées en terme de liaison spécifique déterminée par soustraction de la liaison non-spécifique à la liaison totale.

L'analyse quantitative de l'étude macroradioautographique des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye révèle que:

- pour chaque structure, à l'intérieur de chaque groupe d'animaux traités avec ou sans Mg<sup>2+</sup>/GTP, la moyenne des quantités de sites de liaison en fmol/mg de protéines tissulaires est comparable. Chaque groupe est homogène pour la quantification de récepteurs. La liaison de la <sup>125</sup>Igalanine aux récepteurs de la galanine est comparable au sein des deux populations traitées avec et sans Mg<sup>2+</sup>/GTP;

- la moyenne des moyennes de liaisons spécifiques de chaque structure du groupe traité avec Mg<sup>2+</sup>/GTP est significativement différente de celle du groupe contrôle traité sans Mg<sup>2+</sup>/GTP (Tableau 4). Les quantités de sites de liaison mesurés par les deux techniques de liaison (avec ou sans Mg<sup>2+</sup>/GTP) permettant la mise en évidence des récepteurs de la galanine sont donc significativement différentes (p< 0,05, test de t de Student).

## Tableau 4:

Quantification des récepteurs (fmol/mg de protéines tissulaires) de la galanine dans le cerveau de Cobaye après incubation avec la 125I-galanine 1,5 nM. Les moyennes et écarts standards à la moyenne (n=4 pour chaque cas) sont donnés. Les effets induits par les deux conditions expérimentales sont significatifs pour toutes les structures au seuil des 5% (test de Student).

	Abrév.	liaison spécifique (±S.E.M.)	
Régions cérébrales		fmol/mg protéines	
		+ Mg <sup>2+</sup> /GTP	- Mg <sup>2+</sup> /GTP
Rhinencéphale			
Couche externe plexiforme	EPI	nd	nd
Couche interne plexiforme	IPl	nd	nd
Couche granulaire	IGr	nd	nd
Bulbe olfactif accessoire	AOB	21,96±0,97	15,99±0,90
Noyau olfactif antérieur			
médian	AOM	6,59±0,34	nd
dorsal	AOD	11,47±0,36	1,76±0,58
latéral	AOL	9,43±0,76	0,71±0,34
ventral	AOV	7,96±0,56	0,33±0,14
postérieur	AOP	19,12±0,99	2,41±0,86
Tractus olfactif latéral	TOL	5,76±0,99	7,63±0,37
Tubercule olfactif			
couche moléculaire	TuM	nd	nd
îlots de Calleja	TuiCj	3,97±1,32	1,72±0,22
Télencéphale			
Noyau septal médian	MS	31,13±1,14	28,73±0,64
Noyau septal latéral			
partie ventrale	LSV	31,65±0,85	29,99±0,47
partie dorsale	LSD	23,29±1,54	27,47±2,47
partie intermédiaire	LSI	12,94±1,38	8,07±0,53
Pallidum ventral	PV	6,59±0,93	2,41±0,74
Noyau de la bande diagonale de Broca			
bras vertical	VDB	13,73±0,79	12,44±0,61
bras horizontal	HDB	11,95±0,72	6,33±1,50
Amygdale			
centrale	Ce	64,77±3,11	87,40±8,79
médiane	Me	48,34±2,15	60,33±8,99
latérale	La	38,70±4,17	47,84±4,02
basale	Bl	51,61±4,90	63,32±7,44
corticale postérieure	ACo	48,75±2,61	57,13±5,45
zone hippocampamygdaloïde	AHi	40,55±4,97	58,80±0,86
Caudé putamen	CPu	nd	nd
Corps calleux	CC	13,26±1,05	nd
Cortex frontopariétal	Fr	nd	nd
Rudiment hippocampique antérieur	TT	6,67±1,37	nd
Cortex périrhinal	pr	9,76±0,41	8,72±0,73
Cortex piriforme	pir	nd	nd
Cortex cingulé	Cg	nd	nd
Noyau accumbens	1		

médian	AcbM	6,52±0,49	7,59±0,24
latéral	AcbL	9,72±0,59	10,88±0,22
Cortex entorhinal	Ent	nd	nd
Hippocampe			
Gyrus denté	DG		
couche moléculaire	Mol	39,69±0,54	62,53±2,80
couche granulaire	GrDG	18,49±0,84	28,06±2,89
fascia dentata	FD	83,87±2,34	93,62±5,62
Strie médullaire	SM	13,34±0,83	22,51±3,63
Champ CA1 de la corne d'Ammon	CA1	nd	nd
Champ CA2 de la corne d'Ammon	CA2	9.20±1.90	13,90±1,17
Champ CA3 de la corne d'Ammon	CA3	nd	nd
Champ CA4 de la corne d'Ammon	CA4	$31.86 \pm 1.47$	35.18±1.51
Subiculum	S	nd	nd
	-		
Tractus du Télencéphale			
Fimbriae			
segment externe	fiE	21.42+0.34	24,13+1,97
segment interne	fiI	10 76+0 72	14 94+1 02
Strie terminale	st	33 19+0 48	38 97+2 47
	51	55,1720,10	50,57
Diencénhale			
Thalamus			
naracentral	PC	32,09+3,88	23 56+1 13
antérieur ventral	AV	nd	nd
ventrolatéral	VI.	nd	nd
ventropostérieur latéral	VPI	15 61+1 76	11 35+1 61
centromédian	CM	nd	nd
ontérieur dorsal		27 18+2 65	30 66+0 03
		27,40±2,05	
Idici Odol Sal		$10.02 \pm 1.21$	17.05+0.62
		$19,95\pm1,21$	$17,03\pm0,03$
noyau paraventriculaire		$0,39\pm2,09$	$1,0/\pm0,24$
noyau reuniens	Ke 71	$13,99\pm1,03$	$10,42\pm1,05$
zone incerta		$48,02\pm0,90$	$20,33\pm 3,34$
habenula mediane	MIHD	30,70±0,38	$51,20\pm1,60$
habenula laterale	LHD	$\frac{6,7}{\pm 1,34}$	nd
lemniscus median	ml	15,21±0,73	21,06±0,58
Hypothalamus		15 22 4 2 00	11.00.11.10
chiasma optique		15,29±3,09	$11,03\pm1,49$
noyau supraoptique	SO	39,8/±3,4/	30,99±5,64
zone hypothalamique antérieure/	AHy/	$11,25\pm1,12$	9,20±0,87
aire preoptique	APO	17 (()) 01	14 50 11 0 5
tractus optique	to	$1/,00\pm1,21$	14,59±1,86
noyau paraventriculaire	NPV	44,85±1,21	$30,31\pm3,44$
dorsomédian (région périventriculaire)	DMH	40,35±1,51	34,09±3,55
zone hypothalamique latérale	LH	8,43±2,57	4,32±0,75
éminence médiane	ME	25,06±3,04	18,25±1,96
noyau arqué	Arc	19,22±2,17	7,37±1,61
ventromédian	VMH	34,61±1,05	25,13±3,41
noyau mamillaire postérieur	MP	78,01±4,36	89,04±7,48
noyau mamillaire médian	MM	37,14±1,25	41,44±3,19
noyau mamillaire latéral	ML	4,28±0,95	7,82±2,09
noyau supramamillaire	SuM	17,79±2,32	$21,18\pm0,82$

Hypophyse	Hyp		
lobe antérieur	APit	9,49+1 76	6.42+1 54
lobe intermédiaire	IPit	nd	nd
lobe postérieur	PPit	57 97+8 24	99 32+4 68
		51,71±0,24	<i>)),52</i> <u>+</u> ,00
Mésencénhale			
Novau péripédunculaire	- DD	16 07+1 11	22 74+0 56
Géniculé dorsolatéral	DIG	nd	22,74±0,50
Géniculé ventrolatéral	VIC	nd	nd
Céniculé ventromédian	MGV	51 82+4 76	22 78+1 56
Zone prétoctale antérieure		$51,02\pm4,70$	$35,76\pm1,30$ $356\pm1,10$
Substance noire	AFI	0,3211,77	5,50±1,10
	SNC	15 05+0 64	21.02+0.40
pars compacta	SNC	15,05±0,04	21,0510,40
pars renculata	SINK	na 5 71   0 74	
Zone tegmentaire ventrale		$5,/1\pm0,/4$	2,41±0,52
Noyau rouge	ĸ	nd	nd
Collicule supérieur			
couche grise superficielle	SuG	26,13±1,50	18,82±1,75
couche du nerf optique	Ор	20,28±1,54	14,57±1,20
Collicule inférieur			
noyau central	IC	13,47±0,53	18,86±0,77
noyau péricentral	PCIC	43,84±0,58	34,26±0,91
Substance grise centrale			
périventriculaire	CG	36,88±1,73	29,57±1,98
dorsale	CGD	31,65±1,64	25,07±1,37
Rhombencéphale			
Raphe dorsal	RMg	16,42±1,26	14,42±0,48
Raphe médian	RPn	$18,68\pm2,54$	$14,25\pm2,34$
Raphe pallidus	RPa	26,61±2,01	$21,89\pm1,71$
Noyau moteur trigéminé	Mo5	26,06±1,41	13,90±1,73
Noyau vestibulaire médian	MVe	11,29±0,45	7,92±1,51
Noyau prepositus hypoglossal	PrH	8,31±0,40	12,06±0,32
Novau du tractus solitaire	Sol	34,26±1,36	24.64±0.87
Noyau réticulé tegmentopontin	RtTg	12.86±0.64	nd
Locus coeruleus	LC	33,99±0.50	21.04±0.75
Novau facial	7	18,43±1.52	$15.47 \pm 1.54$
Novau réticulé parvocellulaire	PCRt	$12.16\pm0.85$	$13.90\pm0.52$
Tractus spinal du novau trigéminé	sp5	$61.14\pm0.47$	$32.18\pm1.14$
Novau trigéminé spinocaudal	Sp51	17.29+0.43	20.91+1.47
Novau du tractus spinal du nerf	Sn50	36 88+1 75	20 69+1 71
trigéminé, partie orale	°r°°	20,00-1,72	-0,0/-1,/1
Novau trigéminé sensoriel principal	Pr5	25.56±0.75	21,21+0.74
Area postrema	AP	7.22+0.59	11 08+0 54
		1,2220,37	**,00-0,07
Cervelet		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
couche moléculaire	Mol	nd	nd
couche granulaire	Gr	nd	nd
		1104	

Les résultats présentés dans le Tableau 4 résultent de l'étude comparative menée sur tous les animaux expérimentés dans les deux conditions précitées (avec ou sans Mg<sup>2+</sup>/GTP). Les moyennes et écarts standards à la moyenne ( $\pm$ S.E.M.) sont exprimés pour chaque structure analysée. La quantification régionale des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine réalisée en présence et en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP est significativement différente au seuil de 5%.

# 1-3. Distribution régionale des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye:

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence de sites de liaison de haute affinité de la <sup>125</sup>I-galanine sensibles aux guanylnucléotides dans l'ensemble du système nerveux central du Cobaye (Figs 14,15,16,17 - Tableau 4). Cependant on peut noter immédiatement que les récepteurs de la galanine sont plus particulièrement concentrés dans le télencéphale et le diencéphale. Chaque région est néanmoins analysée.

### Rhinencéphale:

- Au niveau du bulbe olfactif, on ne détecte pas de sites récepteurs de la galanine dans les zones laminaires: couches glomérulaire, plexiformes externe et interne, granulaire.

Par contre, une densité relativement élevée de sites est observée dans le bulbe olfactif accessoire (Fig.14A).

- une densité de sites de liaison identique est observée dans la région postérieure du noyau olfactif antérieur (Fig.14B), tandis qu'une liaison faible est exprimée dans le reste du noyau olfactif antérieur (niveaux dorsal, ventral, latéral, médian ; Fig.14A), dans le tractus olfactif latéral (Fig.14C) ainsi que dans les îlots de Calleja du tubercule olfactif.

### Télencéphale:

- Dans les zones corticales seul le cortex périrhinal présente une densité de récepteurs modérée (Fig.14C), alors qu'aucune liaison spécifique n'est détectée dans le cortex piriforme, le cortex entorhinal et le cortex frontopariétal.

## Fig.14:

Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie *in vitro* sur coupes frontales de cerveau de Cobaye détectés en présence de 125I-galanine 1,5 nM.

Une schématisation histologique de chaque coupe, colorée à la thionine, est présentée en regard de la radioautographie correspondante pour une lecture directe de l'information.

Barre d'échelle: 3 mm.

















- Le corps calleux et le forceps mineur du corps calleux contiennent également une densité modérée de récepteurs (Figs 14C,D).

- Un marquage dense est observé dans le septum médian surtout postérieur et les régions septales latérales ventrale et dorsale (Fig.14F). Tandis que la partie intermédiaire du septum latéral présente une densité de liaison moins élevée (Fig.14F).

- Les structures de la bande diagonale de Broca et le noyau accumbens (Fig.14D), tout comme le rudiment hippocampique antérieur (taenia tecti ; Fig.14B) présentent une densité de liaison modérée à faible.

- Dans la formation hippocampique les sites de liaison sont principalement concentrés dans la partie ventrale où un marquage dense est observé dans le subiculum (Fig.15C). Des densités de liaison modérées sont enregistrées dans le champ CA4 de la corne d'Ammon (Fig.15F). Elles sont plus faibles dans le champ CA2 (Fig.16A). Aucun marquage n'est détecté dans les champs CA1 et CA3 de la corne d'Ammon.

Une densité de sites très élevée est présente dans le gyrus denté (fascia dentata, Fig.16F). Une liaison d'intensité moyenne est observée dans les couches moléculaire et granulaire du gyrus denté et dans la strie médullaire (Figs 15F,G).

- L'amygdale présente une densité de sites très élevée (Fig.15) avec des distributions différentielles selon les régions comme indiqué dans le Tableau 4.

### Tractus du télencéphale:

Plusieurs tractus du télencéphale présentent une liaison modérée à élevée, dont la fimbria (Figs 15C,F), la strie supracalleuse (Fig.15D) et la strie terminale (Fig.15D). Dans la fimbria la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine apparaît principalement dans sa partie la plus latérale (Fig.15F).

### Diencéphale:

### - Thalamus:

Les accumulations les plus denses de sites de liaison sont visualisées dans la zone incerta (Fig.15D), l'habenula médiane (Fig.15H), le thalamus paracentral (Fig.15B) et antérieur dorsal (Fig.15B). Dans les régions du thalamus ventropostérieur médian, ventropostérieur latéral (Fig.15F) et le noyau reuniens (Fig.15D) un marquage modéré est enregistré. Le

## Fig.15:

Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie *in vitro* sur coupes frontales de cerveau de Cobaye détectés en présence de 125<sub>I</sub>-galanine 1,5 nM.

Une schématisation histologique de chaque coupe, colorée à la thionine, est présentée en regard de la radioautographie correspondante pour une lecture directe de l'information.

Barre d'échelle: 3 mm.













D Prove Prove



noyau paraventriculaire et l'habenula latérale (Fig.15F) présentent une densité de sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine beaucoup plus faible.

Le lemniscus médian dorsolatéral contient un marquage modérément dense (Fig.16A).

- Hypothalamus:

Une densité de sites très élevée est observée dans le noyau supraoptique (Fig.15A). Dans l'hypothalamus antérieur, l'aire préoptique, le chiasma optique (Fig.15A) et le tractus optique (Fig.15C) une liaison modérée est observée.

Dans les noyaux paraventriculaire (Fig.15D), ventro- et dorsomédians (Figs 15F,G) le nombre de sites apparaît également élevé. Cependant, dans le dorsomédian, le marquage concerne seulement la partie postérieure périventriculaire (Fig.15E). Dans le noyau arqué (Fig.15E) et l'éminence médiane (Fig.15F) une liaison de moyenne densité est détectée en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le milieu expérimental.

Il faut enfin noter une grosse concentration de sites dans le noyau mamillaire postérieur (Fig.16C), alors que la région latérale présente des densités de marquage beaucoup plus faibles (Fig.16B).

Dans l'hypophyse, le lobe antérieur apparaît peu marqué, alors qu'au contraire une forte liaison est présente dans le lobe nerveux (Fig.16C).

## Mésencéphale:

Les accumulations les plus denses de sites de liaison sont détectées dans le noyau géniculé ventromédian (Fig.16G), la substance grise centrale périaqueducale (Fig.16G), le noyau péricentral du collicule inférieur (Fig.16H) et le collicule supérieur. Le noyau péripedunculaire (Fig.16B), la pars compacta de la substance noire (Fig.16A), et le noyau du collicule inférieur (Fig.16H) présentent des densités plus modérées de sites. La zone prétectale antérieure et la zone tegmentaire ventrale (Figs A,B) sont faiblement marquées. Les autres zones présentent des densités de marquage faibles ou non détectables.

## Rhombencéphale:

- Le locus coeruleus (Fig.17C), le noyau du tractus solitaire (Fig.17D), le tractus spinal du noyau trigéminé (Fig.17E) contiennent un marquage très dense de sites. Le noyau trigéminé spinocaudal (Fig.17E), le noyau
## Fig.16:

Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie *in vitro* sur coupes frontales de cerveau de Cobaye détectés en présence de 125I-galanine 1,5 nM.

Une schématisation histologique de chaque coupe, colorée à la thionine, est présentée en regard de la radioautographie correspondante pour une lecture directe de l'information.

Barre d'échelle: 3 mm.

















Η

vestibulaire médian (Fig.17D) et le noyau du prepositus hypoglossal (Fig.17C) correspondent à des sites de liaison moins denses.

- Un marquage dense est observé dans le noyau principal trigéminé sensoriel (Fig.17A) et le noyau du tractus spinal du nerf trigéminé (partie orale ; Fig.17B). La liaison est plus modérée dans le noyau trigéminé sensoriel principal (Fig.17A), le noyau moteur trigéminé (Fig.17A), le noyau facial (Fig.17C), le plancher du raphe (Fig.17B), les noyaux du raphe dorsal et médian (Fig.17B), le noyau réticulé tegmentopontin (Fig.16H), et le noyau réticulé parvocellulaire (Fig.17F). Une faible liaison est visualisée dans le plancher du raphe et l'area postrema (Fig.17A).

Aucune liaison spécifique détectable n'est observée dans le cervelet.

# 1-4. Effets de $Mg^{2+}/GTP$ sur l'expression des récepteurs de la galanine:

#### a)Effets directs sur la liaison spécifique:

L'analyse quantitative permet de déterminer la liaison spécifique du radioligand à partir des macroradioautographies. Dans les conditions normales, la liaison spécifique représente approximativement 60% de la liaison totale. L'introduction de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le milieu d'incubation augmente la liaison spécifique de la galanine radiomarquée qui représente alors 80% de la liaison totale. Sous cette condition, la spécificité de la liaison est montrée par absence quasi-totale de marquage en présence de galanine froide (Fig.13). Tandis que sans Mg<sup>2+</sup>/GTP un bruit de fond légèrement saturant apparaît qui n'empêche pas pour autant l'observation de la liaison spécifique du radioligand.

Les résultats obtenus montrent donc que le Mg<sup>2+</sup> 5 mM/GTP 100  $\mu$ M ajouté au milieu d'incubation augmente d'environ 20% la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine à ses récepteurs. Cette condition expérimentale améliore ainsi l'observation des récepteurs de la galanine pour l'étude macroradioautographique.

## Fig.17:

Localisation des sites de liaison de la galanine par radioautographie *in vitro* sur coupes frontales de cerveau de Cobaye détectés en présence de 125<sub>I</sub>-galanine 1,5 nM.

Une schématisation histologique de chaque coupe, colorée à la thionine, est présentée en regard de la radioautographie correspondante pour une lecture directe de l'information.

Barre d'échelle: 3 mm.











Ε

F



# b) Effets régionaux inhibiteurs et stimulateurs de Mg2+/GTP sur la liaison:

Les effets de Mg<sup>2+</sup>/GTP sur la distribution des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye sont étudiés au niveau régional par analyse des données quantitatives (Tableau 4). Selon les structures étudiées, on observe que l'utilisation de Mg<sup>2+</sup>/GTP a un effet inhibiteur (diminution) ou stimulateur (augmentation) sur la liaison spécifique de la 125Igalanine. Pour chaque région, on établit une représentation d'histogrammes comparatifs de quantité de sites par structure pour comparer les effets de Mg<sup>2+</sup>/GTP (Figs 18,19,20,21,22,23,24).

## Rhinencéphale:

Les résultats (Fig.18) indiquent que le  $Mg^{2+}/GTP$  augmente la liaison de la 125I-galanine dans le bulbe olfactif et les régions associées au bulbe, à l'exception du tractus olfactif où il diminue la liaison. Sous cette condition expérimentale, on met en évidence:

a) une augmentation de la liaison dans le bulbe olfactif accessoire (x 1,4), le noyau olfactif antérieur dorsal (x 6,5), postérieur (x 7,9), latéral (x 13,3) et ventral (x 24,1), les îlots de Calleja du tubercule olfactif (x 2,3);

b) une diminution de la liaison dans le tractus olfactif latéral (x 0,8).

De plus, cette condition permet de visualiser des récepteurs dans le noyau olfactif antérieur médian qui ne sont pas détectés en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ . Par contre, au niveau des zones laminaires du bulbe olfactif on constate que le  $Mg^{2+}/GTP$  n'a aucun effet et ne fait pas apparaître la présence de sites de liaison.

## Télencéphale:

L'introduction de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu expérimental induit des effets sur la liaison, variables selon les structures (Fig.19,20). On observe:

a) une augmentation de la densité de sites dans le noyau septal médian (x 1,1), le noyau septal latéral ventral (x 1,1) et intermédiaire (x 1,6), le pallidum ventral (x 2,7), le noyau de la bande diagonale de Broca ventral (x 1,1) et horizontal (x 1,9) ainsi que dans le cortex périrhinal (x 1,1);



télencéphale

#### Rhinencéphale



du

**Fig.18:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le rhinencéphale et le tractus du télencéphale de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

Tractus

AOB: bulbe olfactif accessoire ; AOM: noyau olfactif antérieur médian ; AOD: noyau olfactif antérieur dorsal ; AOL: noyau olfactif antérieur latéral ; AOV: noyau olfactif antérieur ventral ; AOP: noyau olfactif antérieur postérieur ; TOL: tractus olfactif latéral ; TuiCj: îlots de Calleja du tubercule olfactif ; fiE: fimbria externe ; fiI: fimbria interne ; st: strie terminale.

#### Télencéphale



**Fig.19:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le télencéphale de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

MS: noyau septal médian ; LSV: noyau septal latéral ventral ; LSD: noyau septal latéral dorsal ; LSI: noyau septal latéral intermédiaire ; PV: pallidum ventral ; pr: cortex périrhinal ;VDB: noyau vertical de la bande diagonale de Broca ; HDB: noyau horizontal de la bande diagonale de Broca ; CC: corps calleux ; TT: taenia tecti ; AcbM: noyau accumbens médian ; AcbL: noyau accumbens latéral.



**Fig.20:** Histogrammes comparatifs de liaison de la  $^{125}$ I-galanine en présence et en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le système limbique de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

Ce: amygdale centrale ; Me: amygdale médiane ; La: amygdale latérale ; Bl: amygdale basale ; ACo: amygdale corticale postérieure ; AHi: zone hippocampamygdaloïde ; Mol: couche moléculaire du gyrus denté ; GrDG: couche granulaire du gyrus denté ; FD: fascia dentata ; CA2: champ CA2 de la corne d'Ammon ; CA4: champ CA4 de la corne d'Ammon.

b) une diminution de la densité de sites dans le noyau septal latéral dorsal (x 0,8) ainsi que dans le noyau accumbens médian (x 0,9) et latéral (x 0,9). Une diminution de liaison est également détectée dans l'amygdale centrale (x 0,7), médiane (x 0,8), latérale (x 0,8), basale (x 0,8), corticale postérieure (x 0,9), dans la zone hippocampamygdaloïde (x 0,7) et les régions hippocampiques: dans le gyrus denté moléculaire (x 0,6), granulaire (x 0,7), fascia dentata (x 0,9), la strie médullaire (x 0,6), les champs de la corne d'Ammon CA2 (x 0,7), CA4 (x 0,9).

En présence de  $Mg^{2+}/GTP$ , on visualise des récepteurs non détectés dans les conditions standards dans le corps calleux, et le rudiment hippocampique antérieur. Cependant, cette condition ne permet pas de démasquer de sites de liaison non exprimés dans les conditions standards dans le noyau caudé, ni dans les régions corticales, ni dans les champs CA1 et CA3 de la corne d'Ammon.

#### Tractus du télencéphale:

Aux vues des données quantitatives (Tableau 4, Fig.18), il apparaît que l'introduction de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu expérimental induise une diminution la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine dans la fimbria externe (x 0,9) et la fimbria interne (x 0,7), et la strie terminale (x 0,9).

#### Diencéphale:

- Thalamus:

La présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP induit des effets sur la liaison de la  $^{125}$ Igalanine (Fig.21), à savoir:

a) une augmentation de la densité de sites dans le thalamus paracentral (x 1,4), ventropostérieur latéral (x 1,4), ventropostérieur médian (x 1,2), le noyau paraventriculaire (x 6,2) et la zone incerta (x 1,8);

b) une diminution de la liaison dans le thalamus antérodorsal (x 0,7), le noyau reuniens (x 0,9), l'habenula médiane (x 0,7), et le lemniscus médian (x 0,7)

De plus, on constate que l'habenula latérale exprime des sites non détectés sans  $Mg^{2+}/GTP$ . L'absence de sites de liaison dans les régions du thalamus centromédian, antéroventral, ventrolatéral et latérodorsal est confirmée en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ .



Thalamus

**Fig.21:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le thalamus de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

PC: thalamus paracentral ; AD: thalamus antérieur dorsal ; VPL: thalamus postérieur ventrolatéral ; VPM: thalamus postérieur ventromédian ; PV: noyau paraventriculaire ; Re: noyau reuniens ; ZI: zone incerta ; MHb: habenula médiane ; LHb: habenula latérale: LM: lemniscus medialis.

**Hypothalamus** 



**Fig.22:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans l'hypothalamus de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significativement différentes au seuil de 5% (test de t de Student).

OC: chiasma optique ; SO: noyau supraoptique ; AHy/APO: zone hypothalamique antérieure / aire préoptique ; to: tractus optique ; MP: noyau mamillaire postérieur ; MM: noyau mamillaire médian ; ML: noyau mamillaire latéral ; SuM: noyau supramamillaire ; NPV: noyau paraventriculaire ; DM: dorsomédian ; LH: zone hypothalamique latérale ; ME: éminence médiane ; Arc: noyau arqué ; VM: ventromédian ; APit: lobe antérieur de l'hypophyse ; PPit: lobe postérieur de l'hypophyse.

- Hypothalamus:

L'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  a pour effet (Fig.22):

a) une augmentation de la densité de sites dans: le chiasma optique (x 1,4), le noyau supraoptique (x 1,3), l'aire hypothalamique antérieure et l'aire préoptique (x 1,2), le tractus optique (x 1,2), le noyau paraventriculaire (x 1,5), l'hypothalamus dorsomédian (x 1,2), latéral (x 2,0) et ventromédian (x 1,4), l'éminence médiane (x 1,5), le noyau arqué (x 2,6), et dans le lobe antérieur de l'hypophyse (x 1,5);

b) une diminution de sites dans le lobe postérieur de l'hypophyse (x 0,6), les noyaux mamillaires postérieur (x 0,9), médian (x 0,9), et latéral (x 0,6), ainsi que dans le noyau supramamillaire (x 0,8);

#### Mésencéphale:

On observe (Fig.23):

a) une augmentation de la liaison du radioligand dans la zone prétectale antérieure (x 1,8), tegmentaire ventrale (x 2,4), les couches du collicule supérieur (x 1,4), le noyau péricentral du collicule inférieur (x 1,3), le noyau géniculé ventral (x 1,5) et la substance grise centrale périventriculaire (x 1,2) et dorsale (x 1,3);

b) une diminution de la liaison dans le noyau péripedunculaire (x 0,7), la substance noire compacte (x 0,7), le noyau central du collicule inférieur (x 0,7).

Cette condition technique ne modifie pas l'expression des sites de liaison non détectés sans  $Mg^{2+}/GTP$  dans le milieu.

#### Rhombencéphale:

L'incubation avec  $Mg^{2+}/GTP$  des coupes radioautographiées met encore en évidence (Fig.24):

a) une augmentation de la liaison dans le raphe dorsal (x 1,1), médian (x 1,3), pallidus (x 1,2), le noyau thalamique postérieur latéral (x 2,1) et médian (x 1,4), le noyau moteur trigéminé (x 1,9), le noyau vestibulaire médian (x 1,4), le noyau du tractus solitaire (x 1,4), le locus coeruleus (x 1,6), le noyau facial (x 1,2), le noyau trigéminé spinocaudal (x 1,9), le noyau du tractus spinal du nerf trigéminé (x 1,8), le noyau trigéminé sensoriel principal (x 1,2);



#### Mésencéphale

**Fig.23:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le mésencéphale de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

régions

PP: noyau péripédunculaire ; APT: zone prétectale antérieure ; SNC: pars compacta de la substance noire ; SuG: couche grise superficielle du collicule supérieur ; Op: couche du nerf optique du collicule supérieur ; MGV: géniculé ventromédian ; VTA: zone tegmentaire ventrale ; IC: noyau central du collicule inférieur ; PCIC: noyau péricentral du collicule inférieur ; CG: substance grise centrale périventriculaire ; CGD: substance grise centrale dorsale.



**Fig.24:** Histogrammes comparatifs de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine en présence et en absence de  $Mg^{2+}/GTP$  dans le rhombencéphale de Cobaye. Les différences entre les groupes traités sont significatives au seuil de 5% (test de t de Student).

RMg: raphe dorsal; RPn: raphe médian; RPa: raphe pallidus; LPB: noyau thalamique postérieur latéral ; MPB: noyau thalamique postérieur médian; Mo5: noyau moteur trigéminé; MVe: noyau vestibulaire médian; PrH: noyau prepositus hypoglossal; Sol: noyau du tractus solitaire; RtTg: noyau réticulé tegmentopontin; LC: locus coeruleus; 7: noyau facial; PCRt: noyau réticulé parvocellulaire; Sp5I: noyau trigéminé spinocaudal; sp5: tractus spinal du noyau trigéminé; Sp5O: noyau du tractus spinal du nerf trigéminé, partie orale; Pr5: noyau trigéminé sensoriel principal; AP: area postrema. b) une diminution de la liaison dans le noyau prepositus hypoglossal  $(x \ 0,7)$ , le noyau réticulé parvocellulaire  $(x \ 0,9)$ , le tractus spinal du noyau trigéminé  $(x \ 0,8)$  et l'area postrema  $(x \ 0,7)$ .

La comparaison de deux techniques de liaison de la  $^{125}$ I-galanine révèle: d'une part que le Mg<sup>2+</sup>/GTP augmente la spécificité de la liaison sur coupes non-fixées de cerveau de Cobaye, et d'autre part que cette variante technique a des effets régionaux inhibiteurs (noyaux amygdaloïdes, régions hippocampiques), et stimulateurs (éminence médiane, noyau arqué) sur cette liaison.

En conclusion, des sites de liaison de haute affinité de la <sup>125</sup>Igalanine sensibles aux guanylnucléotides sont présents dans l'ensemble du système nerveux de Cobaye, plus particulièrement dans le télencéphale et le diencéphale.

# 2 - Immunocytochimie de la galanine dans l'hypothalamus.

La localisation des structures neuronales à galanine dans l'hypothalamus de Cobaye est étudiée par technique d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps anti-galanine dilué au 1/600e.

La comparaison de la distribution de la galanine avec celles du GnRH et du GRF est réalisée à l'échelle de la microscopie photonique: par méthode de double marquage simultané avec l'anti-GnRH au 1/8000e, et par comparaison de coupes adjacentes avec l'anti-GRF dilué au 1/600e.

Les résultats rapportés traitent successivement de l'identification des structures contenant de la galanine dans l'hypothalamus de Cobaye et de la comparaison de la distribution de la galanine avec celles du GnRH dans l'aire préoptique et du GRF dans le noyau arqué et l'éminence médiane.

#### 2-1. Aire préoptique:

Des neurones sont observés dans la partie ventrolatérale de l'aire préoptique médiane. La distribution s'étend de la partie rostrale du chiasma optique au noyau supra-optique. D'autres corps cellulaires sont vus dans la région périventriculaire. Une troisième partie est observée dans l'aire préoptique latérale.

A côté des corps cellulaires de nombreuses fibres et varicosités sont distribuées dans l'ensemble de l'aire préoptique (Figs 25A, A').

## Fig.25:

Localisation de l'immunoréaction de la galanine dans l'aire préoptique du Cobaye. Relations galanine-GnRH.

A/A': observation de cellules à galanine dans l'aire préoptique ; Grossissement: X 120

B/B': comparaison sur une même coupe de l'immunoréaction obtenue avec un anti-galanine de Lapin (B) et un anti-GnRH de Cobaye (B'). On peut constater que la cellule à GnRH ne réagit pas avec l'anti-galanine ; Grossissement: X 500

C/C': comparaison sur une même coupe de l'immunoréaction obtenue avec l'anti-galanine (C) et l'anti-GnRH (C'). La cellule à GnRH apparaît non immunoréactive à la galanine. Par contre, on constate qu'autour des cellules à GnRH et vraisemblablement au contact de ces cellules sont présentes des terminaisons nerveuses à galanine. Grossissement: X 500.



## Fig.26:

Localisation de l'immunoréaction de la galanine dans le noyau paraventriculaire, le noyau arqué et l'éminence médiane de Cobaye.

A: observation de l'immunoréactivité à la galanine (Gal.) dans les neurones du noyau paraventriculaire (NPV). L'immunoréaction est détectée essentiellement dans les neurones parvocellulaires et en périphérie du ventricule.

Grossissement: X 120.

**B**: immunoréaction des éléments galaninergiques (Gal.) dans le noyau arqué (NA) et l'éminence médiane.

Les corps cellulaires à galanine sont observés dans la partie ventrolatérale du noyau arqué.

Dans l'éminence médiane, le marquage est situé dans la zone externe. Les capillaires sont généralement entourés par de nombreuses terminaisons marquées. Dans la zone interne de l'éminence médiane, la réaction est pratiquement inexistante.

Grossissement: X 120.





#### 2-2. Noyau paraventriculaire:

Un marquage est observé dans des neurones magnocellulaires mais surtout parvocellulaires (Fig.26A). Les réactions sont cependant à dilution comparable de l'anticorps souvent moins intenses que celles détectées dans l'aire préoptique et le noyau arqué.

#### 2-3. Noyau arqué:

Un grand nombre de cellules est observé dans le noyau arqué. Ces cellules sont généralement de taille moyenne et sont surtout détectées dans la partie ventrolatérale (Fig.26B).

Des fibres et varicosités sont également présentes en grand nombre.

#### 2-4. Eminence médiane:

L'éminence médiane est caractérisée par la présence d'une très grande densité de terminaisons nerveuses périvasculaires marquées dans la zone externe de l'éminence médiane (Fig.26B). Par contre peu de marquage est visible dans la zone interne.

La localisation générale rappelle celle des terminaisons nerveuses à GRF chez le Cobaye (Tramu et coll., 1983).

## 2-5. Comparaison de la distribution du GnRH et de la galanine dans l'aire préoptique et dans l'éminence médiane:

L'utilisation d'anticorps fabriqués dans des espèces différentes a permis le double marquage par l'anti-galanine et l'anti-GnRH sur les mêmes coupes (cf. Matériels et Méthodes).

## Fig.27:

Double marquage sur une même coupe avec un anti-galanine fabriqué chez le Lapin et un anti-GnRH fabriqué chez le Cobaye dans l'éminence médiane de Cobaye.

La distribution des deux neuropeptides apparaît superposable.

Grossissement: X 120.



## Fig.28:

Double marquage sur une même coupe avec un anti-galanine fabriqué chez le Lapin et un anti-GnRH fabriqué chez le Cobaye dans l'éminence médiane de Cobaye.

A cette échelle, il n'a pas été possible de mettre en évidence une coexistence des deux neuropeptides dans une même terminaison nerveuse.

Grossissement: X 500.



L'observation a été effectuée chez des mâles, et chez des femelles dans l'après-midi du proestrus.

Aucun double marquage n'a pu être vu dans l'aire préoptique (Figs 25B, B'). Par contre, l'existence d'afférences galaninergiques aux cellules à GnRH est évidente (Figs 25C, C').

Dans l'éminence médiane, on n'observe pas non plus de coexistence des réactions immunocytochimiques. Ceci est nettement visible sur des fibres isolées (Figs 27 et 28).

# 2-6. Comparaison de la distribution du GRF et de la galanine dans le noyau arqué:

Les deux anticorps provenant d'une même espèce (le Lapin), des doubles marquages sur des mêmes coupes n'ont pas pu être effectuées.

De même, la technique d'élution (Tramu et coll., 1983) n'est pas utilisable car quel que soit l'ordre des réactions, le deuxième marquage n'a jamais été positif.

Par conséquent, seule une comparaison sur des coupes adjacentes d'environ  $2 \mu m$  traitées avec des anticorps différents a pu être réalisée.

Il apparaît en superposant les négatifs que, sans aucun doute, on puisse retrouver des cellules dans le noyau arqué contenant à la fois de la galanine et du GRF (Fig.29).

Dans l'éminence médiane, une telle comparaison sur coupes sériées est absolument impossible compte tenu de la taille des terminaisons nerveuses et de l'épaisseur des coupes.

## Fig.29:

Marquage sur coupes adjacentes avec un anti-GRF (A) et un anti-galanine (B) fabriqués chez le Lapin dans le noyau arqué.

Du fait de l'épaisseur, des coupes il est difficile de faire la correspondance, mais dans certains cas (flèches), on peut constater que certaines cellules contiennent et le GRF et la galanine.

Grossissement: X 400.



En conclusion, des structures à galanine sont présentes dans l'hypothalamus de Cobaye essentiellement dans les noyaux médians et latéraux de l'aire préoptique, les noyaux parvocellulaires paraventriculaires et le noyau arqué.

De nombreuses fibres et varicosités à galanine sont présentes dans l'aire préoptique et le noyau arqué. La zone externe de l'éminence médiane présente une accumulation importante de terminaisons nerveuses périvasculaires à galanine.

L'existence d'afférences galaninergiques aux cellules à GnRH est mise en évidence dans l'aire préoptique. Une colocalisation de la galanine et du GRF est démontrée dans le noyau arqué.

# <u>3 - Localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine dans l'éminence médiane:</u> <u>Etude chez le Cobaye et le Rat.</u>

La localisation ultrastructurale des récepteurs de la galanine est étudiée à l'échelle de la microscopie électronique dans l'éminence médiane de Cobaye et de Rat.

L'adaptation des techniques de macroradioautographie à la radioautographie haute résolution permet de localiser précisément les récepteurs de haute affinité de la 125I-galanine sensibles aux guanylnucléotides dans l'éminence médiane de ces deux espèces.

Les récepteurs sont visualisés *in vitro* par incubation de coupes épaisses  $(80 \ \mu\text{m})$  de cerveaux légèrement préfixés, contenant l'éminence médiane, avec la <sup>125</sup>I-galanine 0,2 nM. La liaison non-spécifique est déterminée par addition de galanine froide 100 nM dans le milieu d'incubation.

L'étude est menée simultanément en absence et en présence de  $Mg^{2+}/GTP$  pour déterminer les effets du guanylnucléotide sur la liaison ligandrécepteur.

Dans tous les cas, la liaison non-spécifique n'est pas suffisamment significative pour interférer avec l'observation de la liaison spécifique (Figs 30,33).

Les résultats sont successivement présentés chez le Cobaye: localisation des récepteurs en absence et en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ , puis de la même façon chez le Rat.

# 3-1. Localisation des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine dans l'éminence médiane de Cobaye:

Cette étude menée à l'échelle ultrastructurale nécessite non seulement l'observation de coupes ultrafines en microscopie électronique, mais également celle de coupes semifines en microscopie optique permettant d'évaluer le temps d'exposition des ultrafines et la liaison spécifique du radioligand.

## 3-1.1. en absence de $Mg^{2+}/GTP$ :

#### a) à l'échelle de la microscopie optique:

Sur coupes semifines faites au vibratome incubées en présence de  $125_{I-}$  galanine seule (liaison totale), on observe une densité modérée de sites dans l'ensemble de l'éminence médiane. La densité de grains visualisée présente une hétérogénéité relative (Fig.30A).

Les variations de densité de sites ne peuvent pas être associées à des compartiments histologiques donnés puisque l'éminence médiane contient essentiellement des terminaisons nerveuses, des fibres et des processus épendymaires non discriminables à ce niveau de résolution. Cependant, la distribution de groupements de grains suggère que le marquage pourrait être localisé au niveau de terminaisons nerveuses et de prolongements épendymaires.

De légères variations sont observées entre les animaux expérimentés (n= 6) mais les résultats globaux obtenus sont comparables.

Sur coupes semifines de tissus incubées en présence de galanine froide (liaison non-spécifique), les grains d'argent sont plus rares et complètement dispersés dans le tissu (Fig.30B). On n'observe pas de concentration de grains comme sur les coupes incubées en présence de 125I-galanine seule. De plus, la distribution de grains semble relativement homogène dans ce cas.

Les grains comptés sur les microphotographies de semifines permettent de calculer le pourcentage de liaison spécifique en déduisant la liaison non-spécifique de la liaison totale.

Le nombre de grains d'argent détectés (par mm<sup>2</sup>) sur les coupes incubées en présence de galanine froide représente 28% de ceux comptés sur coupes incubées avec la 125I-galanine seule. La liaison spécifique correspond par conséquent à 72% de la liaison totale.

#### Fig.30:

Coupes semifines (2 µm) d'éminence médiane de Cobaye.

Les coupes sont obtenues à partir de tranches de cerveau incubées avec la 125I-galanine 0,2 nM en présence (GTP+) et en absence (GTP-) de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

La liaison totale (T) est détectée en présence de 125I-galanine seule. Le marquage non-spécifique (NS), déterminé par addition de galanine froide 10<sup>-7</sup> M au milieu d'incubation, empêche la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine.

L'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  augmente la liaison totale et diminue la liaison non-spécifique. On détecte par conséquent un marquage spécifique plus important sous cette condition.

On note l'impossibilité de discrimer les compartiments cellulaires à ce niveau d'observation.

Grossissement: X 1500.



#### b) à l'échelle de la microscopie électronique:

#### \*liaison totale:

Sur coupes incubées avec la <sup>125</sup>I-galanine seule, des grains d'argent sont observables dans toutes les couches de l'éminence médiane, mais la zone externe de l'éminence médiane présente des densités de sites plus élevées. L'analyse est donc réalisée dans la zone externe de l'éminence médiane qui contient essentiellement des terminaisons nerveuses périportales et des éléments gliaux correspondant principalement à des prolongements tanycytaires. L'observation est faite à un grandissement de 12000 X. Cependant, même dans cette région, à cette échelle, les grains sont dispersés et dans la plupart des cas il est difficile d'observer plusieurs structures marquées dans le même champ.

Les grains d'argent apparaissent soit exclusivement localisés à l'intérieur d'une structure (grains exclusifs), soit localisés sur des appositions de membranes appartenant à des structures différentes (grains partagés). Les grains exclusifs sont visibles dans des terminaisons nerveuses ou dans des tanycytes. Les grains partagés sont présents sur des appositions de membranes entre terminaisons nerveuses ou entre terminaison nerveuse et tanycyte. Dans certains cas, des grains d'argent peuvent recouvrir trois ou quatre structures. Quelques grains apparaissent dans l'endothélium fenêtré des capillaires et à l'intérieur de fibres nerveuses, ou localisés sur des appositions de membranes incluant ces structures.

L'observation du marquage permet d'analyser la localisation précise de 1774 grains réels. Parmi ces grains, 1305 constituent des grains partagés alors que 469 sont des grains exclusifs. Ce qui correspond à un pourcentage de 73,6% de grains partagés et de 26,4% de grains exclusifs (Tableau 5).

Lorsque l'on analyse la répartition de grains hypothétiques (travail effectué avec 2412 grains hypothétiques sur les mêmes photographies, Tableau 5), on obtient 950 grains partagés soit 39,4% contre 1462 grains exclusifs soit 60,6%.

	Hypothétiques	Réels (T)*	Réels (NS)**	Réels/Hypothétiques	
	(H) - (%)	(%)	(%)	T/H	NS/H
Grains partagés	39,4	73,6	42,9	1,87	1,09
TN-TN	22,2	38,5	22,9	1,73	1,03
TN-tanycytes	11,8	28,8	14,1	2,44	1,19
Autres structures	5,4	6,3	5,9	1,17	1,09
Grains exclusifs	60,6	26,4	57,1	0,44	0,94
TN	40,9	13,6	37,1	0,33	0,91
Tanycytes	15,8	9,6	16,3	0,61	1,03
Autres structures	3,9	3,2	3,7	0,82	0,95
Partagés/Exclusifs	0,65	2,79	0,75		
Nb de grains comptés	2412	1774	633		

**Tableau 5:** Distribution comparative de grains d'argent hypothétiques (H), réels totaux (T) et réels non-spécifiques (NS) dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ .

\*: significativement différent de la répartition de grains hypothétiques à P< 0,0001 ( $X^2=57,39$ ).

\*\*: significativement différent de la répartition de grains réels totaux à P< 0,0001 ( $X^2=59,21$ ).

	Hypothétiques (%)	Spécifiques* (%)	Spécifiques/Hypothétiques
Grains partagés	39,4	85,6	2,17
TN-TN	22,2	44,6	2,01
TN-tanycytes	11,8	34,6	2,93
Autres structures	5,4	6,4	1,19
Grains exclusifs	60,6	14,4	0,24
TN	40,9	4,4	0,11
Tanycytes	15,8	6,9	0,44
Autres structures	3,9	3,1	0,79
Partagés/Exclusifs	0,65	5,94	

**Tableau 6:** Distribution comparative de grains hypothétiques (H) et spécifiques (S) dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. \*: statistiquement différent de la distribution de grains hypothétiques à P< 0,0001 ( $X^2=104,59$ ).
La distribution aléatoire des grains hypothétiques est significativement différente de celle des grains réels totaux. Ceci est mis en évidence par les rapports du pourcentage de grains réels totaux/hypothétiques, définissant l'enrichissement relatif, qui sont différents de 1 pour les catégories de grains analysées: 1,87 pour les grains partagés et 0,44 pour les grains exclusifs.

Une analyse plus précise de chaque catégorie de grains est réalisée.

Parmi les grains réels totaux partagés 38,5% sont localisés sur des appositions entre terminaisons nerveuses (TN), 28,8% entre terminaison nerveuse et tanycyte, et 6,3% sur des appositions de membranes impliquant des capillaires fenêtrés et des fibres nerveuses.

L'étude de la répartition des grains hypothétiques montre que 22,2% des grains partagés sont localisés sur des appositions entre terminaisons nerveuses, 11,8% entre terminaison nerveuse et tanycyte, et 5,4% entre terminaison nerveuse/ou tanycyte et capillaire/ou fibre nerveuse. Il existe donc un enrichissement en grains réels partagés observé pour les trois grands types d'appositions (TN-TN, TN-tanycyte et autres structures). L'enrichissement est caractérisé par les rapports réels/hypothétiques qui sont de 1,73 pour les grains partagés entre terminaisons nerveuses, 2,44 pour les grains partagés entre terminaison nerveuse et tanycyte, et 1,17 pour les appositions de membranes incluant les autres structures.

Parmi les grains réels totaux exclusifs 13,6% sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 9,6% dans des tanycytes, et 3,2% dans les autres structures. La répartition de grains hypothétiques montre que 40,9% des grains sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 15,8% dans des tanycytes, et 3,9% dans les autres structures (Tableau 5).

Inversement aux grains partagés, il apparaît un appauvrissement net en grains exclusifs réels par rapport aux grains exclusifs hypothétiques. Les rapports réels/hypothétiques étant respectivement de 0,33 pour les terminaisons nerveuses, 0,61 pour les tanycytes et 0,82 pour les autres structures.

#### \*liaison non-spécifique:

L'observation du marquage, obtenu sur coupes incubées avec la 125Igalanine saturée par de la galanine froide, permet d'étudier la localisation précise de 633 grains réels correspondant à une liaison non-spécifique. Dans ce cas, les grains d'argent sont détectés principalement à l'intérieur d'une structure: 57,1% de grains exclusifs contre 42,9% de grains partagés (Tableau 5). L'enrichissement relatif est alors de 0,94 pour les grains exclusifs et de 1,09 pour les grains partagés, soit relativement proche de 1. La distribution des grains réels non-spécifiques est donc assez proche de celle de la répartition aléatoire des grains hypothétiques (Tableau 5).

L'analyse précise de chaque catégorie de grains montre que:

- parmi les grains réels exclusifs: 37,1% des grains sont localisés à l'intérieur des terminaisons nerveuses, 16,3% dans les tanycytes, et 3,7% dans les autres structures (Tableau 5);

- parmi les grains réels partagés: 22,9% correspondent à des grains localisés sur des appositions entre terminaisons nerveuses, 14,1% entre terminaison nerveuse et tanycyte, 5,9% d'appositions avec les autres structures.

Cette étude montre que la distribution des grains non-spécifiques est significativement différente de celle des grains totaux (P< 0,0001) et qu'elle est assez voisine de celle de la répartition des grains hypothétiques (Tableau 5).

#### \*liaison spécifique:

La distribution spécifique (Tableau 6) de sites de liaison de la 1251galanine est obtenue en soustrayant des grains comptés sur les coupes incubées avec la 125I-galanine seule la liaison non-spécifique (cf. Matériels et Méthodes). On constate que la distribution des grains spécifiques évolue dans le même sens que celle des grains réels totaux, la répartition des grains non-spécifiques modifiant peu celle des grains totaux (Tableaux 5 et 6).

#### Fig.31:

Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye. Détection de la liaison de la 125I-galanine en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

Deux tortillons sont observés sur des appositions membranaires: (A) entre terminaisons nerveuses, (B) entre terminaison nerveuse et tanycyte (TAN.).

Grossissement: X 25000.



Les grains spécifiques sont répartis en deux catégories: 85,6% de grains partagés contre 14,4% de grains exclusifs, soit 5,94 fois plus de grains partagés que de grains exclusifs. Cette répartition est significativement différente de la répartition de grains hypothétiques, P< 0,0001 (Tableau 6). Les rapports spécifiques/hypothétiques mettent en évidence un enrichissement en grains partagés (S/H = 2,17) et un appauvrissement en grains exclusifs (S/H = 0,24).

Au vu de ces résultats (Tableau 6), on peut donc conclure que les grains d'argent permettant de visualiser les sites de liaison spécifiques de la 125I-galanine sont essentiellement localisés sur des appositions membranaires (85,6%). Trois types d'appositions sont observés: entre terminaisons nerveuses (44,6%), entre terminaison nerveuse et tanycyte (34,6%) ou sur des appositions de membranes impliquant des capillaires fenêtrés et des fibres nerveuses (6,4%).

Le reste des grains est localisé à l'intérieur de plusieurs structures: terminaisons nerveuses (4,4%), tanycytes (6,9%), cellules endothéliales et fibres nerveuses (3,1%).

#### 3-1.2. en présence de $Mg^{2+}/GTP$ :

a) à l'échelle de la microscopie optique:

Sur coupes semifines incubées en présence de 125I-galanine seule (liaison totale), on observe une densité de grains relativement hétérogène et plus élevée qu'en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP (Fig.30C).

Si les structures de l'éminence médiane ne peuvent pas être discriminées à ce niveau, l'observation des groupements de grains permet néanmoins de penser que les sites de liaison pourraient être localisés au niveau de terminaisons nerveuses et de processus épendymaires.

Les résultats obtenus entre les animaux expérimentés sont comparables (n=6).

Sur coupes semifines incubées en présence de galanine froide (liaison non-spécifique), les grains d'argent sont peu nombreux et disséminés dans le tissu (Fig.30D). Le marquage observé est très homogène, et ne présente plus de concentrations comme sur les coupes incubées en présence de 125I-galanine seule.

Le nombre de grains d'argent détectés (par mm<sup>2</sup>) sur les coupes incubées en présence de galanine froide représente approximativement 11,5% de ceux comptés sur les coupes incubées avec la 125I-galanine seule. La liaison spécifique représente alors 88,5% de la liaison totale.

#### b) à l'échelle de la microscopie électronique:

#### \*liaison totale:

Sur coupes incubées en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule, les grains d'argent sont observés plus particulièrement dans la zone externe. Comme précédemment, l'analyse est réalisée à un grandissement de 12000X.

L'étude du marquage a permis d'analyser la localisation précise de 1858 grains réels (Tableau 7).

Les grains réels totaux sont répartis en deux catégories distinctes: 76,4% de grains réels partagés, pour 23,6% de grains réels exclusifs.

La distribution de grains aléatoires, correspondant à 39,4% de grains hypothétiques partagés pour 60,6% de grains hypothétiques exclusifs, est significativement différente de celle des grains réels. L'enrichissement relatif des grains partagés et exclusifs est respectivement de 1,94 et 0,39.

Les grains réels partagés totaux sont localisés pour 49,2% sur des appositions entre terminaisons nerveuses, 22,2% entre terminaison nerveuse et tanycyte, 5,0% avec d'autres structures (capillaires, fibres nerveuses).

La distribution de grains réels totaux est significativement différente de celle des grains hypothétiques (P< 0,0001). L'enrichissement relatif est de 2,22 pour les appositions entre terminaisons nerveuses, 1,88 entre terminaison nerveuse et tanycyte, 0,93 pour les autres appositions. On observe donc un enrichissement en grains réels dans les deux premiers cas (TN-TN et TN-tanycyte) et un appauvrissement dans le dernier cas (autres structures).

	Hypothétiques	Réels (T)*	Réels (NS)**	Réels/Hyp	othétiques
	(H) - (%)	(%)	(%)	T/H	NS/H
Grains partagés	39,4	76,4	42,8	1,94	1,09
TN-TN	22,2	49,2	23,3	2,22	1,05
TN-tanycytes	11,8	22,2	13,9	1,88	1,18
Autres structures	5,4	5,0	5,6	0,93	1,04
Grains exclusifs	60,6	23,6	57,2	0,39	0,94
TN	40,9	16,2	40,0	0,40	0,98
Tanycytes	15,8	4,9	13,9	0,31	0,88
Autres structures	3,9	2,5	3,3	0,64	0,85
Partagés/Exclusifs	0,65	3,24	0,75		
Nb de grains comptés	2412	1858	680		

**Tableau 7:** Distribution comparative de grains d'argent hypothétiques (H), réels totaux (T) et réels non-spécifiques (NS) dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

\*: significativement différent de la répartition de grains hypothétiques à P< 0,0001 ( $X^2=64,97$ ).

\*\*: significativement différent de la répartition de grains réels totaux à P< 0,0001 ( $X^2$ =68,56).

	Hypothétiques (%)	Spécifiques* (%)	Spécifiques/Hypothétiques
Grains partagés	39,4	80,8	2,05
TN-TN	22,2	52,5	2,36
TN-tanycytes	11,8	23,3	1,97
Autres structures	5,4	5,0	0,93
Grains exclusifs	60,6	19,2	0,32
TN	40,9	13,1	0,32
Tanycytes	15,8	3,7	0,23
Autres structures	3,9	2,4	0,62
Partagés/Exclusifs	0,65	4,21	

**Tableau 8:** Distribution comparative de grains hypothétiques (H) et spécifiques (S) dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. \*: statistiquement différent de la distribution de grains hypothétiques à P< 0,0001 ( $X^2=81,33$ ). Parmi les grains réels exclusifs totaux: 16,2% sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 4,9% dans des tanycytes, et 2,5% dans les autres structures.

Il apparaît un appauvrissement net en grains réels exclusifs par rapport aux grains hypothétiques. Les rapports réels totaux/hypothétiques sont de 0,40 pour les terminaisons nerveuses, 0,31 pour les tanycytes et 0,64 pour les autres structures.

La distribution de grains réels totaux est significativement différente de celle des grains réels non-spécifiques, P< 0,0001 (Tableau 7).

### \*liaison non-spécifique:

L'analyse du marquage permet d'étudier la distribution de 680 grains réels correspondant à une liaison non-spécifique (Tableau 7).

Les grains d'argent sont détectés principalement à l'intérieur d'une structure: 57,2% de grains exclusifs pour 42,8% de grains partagés. Les rapports réels non-spécifiques/hypothétiques correspondent à un appauvrissement en grains exclusifs (0,94), et à un enrichissement de grains partagés (1,09).

Parmi les grains réels exclusifs non-spécifiques, 40,0% sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 13,9% dans des tanycytes et 3,3% dans les autres structures. Les rapports réels non-spécifiques/hypothétiques sont respectivement de 0,98 pour les terminaisons nerveuses, 0,88 pour les tanycytes et 0,85 pour les autres structures.

Les grains réels partagés non-spécifiques sont localisés sur des appositions de membranes: 23,3% entre terminaisons nerveuses, 13,9% entre terminaison nerveuse et tanycyte, 5,6% avec les autres structures.

On constate que les pourcentages de distribution de grains réels nonspécifiques se rapprochent de ceux de la distribution aléatoire, les rapports réels non-spécifiques/hypothétiques étant relativement proche de 1. La distribution de grains réels non-spécifiques est donc significativement différente de celle des grains réels totaux (P < 0,0001) et n'empêche pas la détermination de la liaison spécifique.

#### \*liaison spécifique:

La distribution des grains spécifiques, déterminée à partir de celle des grains réels totaux et non-spécifiques, est significativement différente de la distribution des grains hypothétiques, P < 0,0001 (Tableau 8). On observe que les pourcentages de grains réels totaux et spécifiques évoluent dans le même sens, la liaison non-spécifique étant moindre (Tableaux 7 et 8).

Les grains spécifiques sont répartis en deux catégories: 80,8% de grains partagés et 19,2% de grains exclusifs, équivalent à 4,21 fois plus de grains partagés que de grains exclusifs. La comparaison avec la distribution de grains hypothétiques est significativement différente, P< 0,0001. Les rapports spécifiques/hypothétiques font apparaître un enrichissement en grains partagés (S/H = 2,05) et un appauvrissement en grains exclusifs (S/H = 0,32).

Les grains partagés correspondent pour 52,5% à des grains localisés sur des appositions entre terminaisons nerveuses, 23,3% entre terminaison nerveuse et tanycyte et 5,0% pour les autres appositions. La comparaison avec la distribution de grains hypothétiques met en évidence un enrichissement en grains réels par rapport aux grains partagés pour les appositions entre terminaisons nerveuses (S/H = 2,36), entre terminaison et tanycyte (S/H = 1,97) et un appauvrissement en grains pour ce qui concerne les autres appositions (S/H = 0,93).

Les grains exclusifs sont localisés pour 13,1% dans les terminaisons nerveuses, 3,7% dans des tanycytes et 2,4% dans les autres structures. Il existe un appauvrissement net en grains exclusifs comparés aux grains hypothétiques. Les rapports réels/hypothétiques sont de 0,32 pour les grains localisés dans les terminaisons nerveuses, 0,23 dans les tanycytes et 0,62 dans les autres structures.

### Fig.32:

Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye. Détection de la liaison de la 125I-galanine en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

Sous cette condition, les grains sont plus nombreux et il est possible de visualiser plusieurs tortillons dans le même champ. Des tortillons sont observés sur des appositions membranaires (A,B,C,D) et à l'intérieur d'une terminaison nerveuse (D).

Grossissement: X 25000.



L'analyse des résultats (Tableau 8) indique que les sites de liaison spécifiques de la  $^{125}$ I-galanine en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP sont donc principalement localisés au niveau d'appositions membranaires (80,8%). Trois types d'appositions sont observées: entre terminaisons nerveuses (52,5%), entre terminaison nerveuse et tanycyte (23,3%) ou sur des appositions impliquant des capillaires fenêtrés et des fibres nerveuses (5,0%).

Le reste des grains est localisé à l'intérieur de terminaisons nerveuses (13,1%), de tanycytes (3,7%), de cellules endothéliales et de fibres nerveuses (2,4%).

# 3-1.3. Comparaison de la distribution de grains spécifiques en absence et en présence de $Mg^{2+}/GTP$ :

L'analyse de la distribution de grains spécifiques, dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye (Tableaux 6 et 8), met en évidence que l'apport de Mg<sup>2+</sup>/GTP au milieu expérimental conduit à:

- une augmentation du pourcentage de grains spécifiques partagés entre terminaisons nerveuses (52,5% dans cette condition contre 44,6% en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP);

- et une augmentation du pourcentage de grains spécifiques exclusifs localisés à l'intérieur de terminaisons nerveuses (13,1% contre 4,4% sans  $Mg^{2+}/GTP$ ).

Inversement, on observe une diminution du pourcentage de grains spécifiques partagés et exclusifs dans les autres cas.

En conclusion, des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine ont été détectés dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye, principalement localisés au niveau d'appositions membranaires ( > 80%). Il apparaît que l'apport de Mg<sup>2+/</sup>GTP au milieu expérimental favorise la localisation de ces sites au niveau des terminaisons nerveuses (grains partagés et exclusifs).

138

# 3-2. Localisation des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine dans l'éminence médiane de Rat:

L'étude a été menée dans les mêmes conditions d'étude et d'analyse que celles utilisées pour le Cobaye.

### 3-2.1. en absence de $Mg^{2+}/GTP$ :

#### a) à l'échelle de la microscopie optique:

Sur coupes semifines réalisées au vibratome incubées en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule (liaison totale), un marquage de densité modérée, plus élevée dans la zone externe, est enregistré dans l'ensemble de l'éminence médiane. La densité de grains observée présente une hétérogénéité relative (Fig.33A).

Les sites marqués ne sont pas discriminables à ce niveau de résolution. On peut néanmoins penser qu'ils pourraient être localisés au niveau de terminaisons nerveuses et de processus épendymaires.

Les résultats obtenus entre les animaux sont comparables (n=6).

Les coupes semifines incubées en présence de galanine froide (liaison non-spécifique) présentent une quantité de grains plus faible disséminés dans le tissu (Fig.33B). Le marquage enregistré dans ce cas est beaucoup plus homogène que sur les coupes incubées en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule.

Le nombre de grains d'argent comptés (en mm<sup>2</sup>) sur les coupes incubées en présence de galanine froide représente environ 19% de ceux comptés sur les coupes incubées en présence de 125I-galanine seule. Ces résultats permettent de déterminer un pourcentage de liaison spécifique de 81% par rapport à la liaison totale.

#### Fig.33:

Coupes semifines  $(2 \mu m)$  d'éminence médiane de Rat.

Les coupes sont obtenues à partir de tranches de cerveau incubées avec la 125I-galanine 0,2 nM en présence (GTP+) et en absence (GTP-) de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

La liaison totale (T) est détectée en présence de 125I-galanine seule. Le marquage non-spécifique (NS), déterminé par addition de galanine froide 10<sup>-7</sup> M au milieu d'incubation, empêche la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine.

L'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  augmente la liaison totale et diminue la liaison non-spécifique. On détecte par conséquent un marquage spécifique plus important sous cette condition.

On note l'impossibilité de discrimer les compartiments cellulaires à ce niveau d'observation.

Grossissement: X 1500.



b) à l'échelle de la microscopie électronique:

#### \*liaison totale:

Sur coupes incubées en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule, des grains d'argent sont détectés dans toutes les couches de l'éminence médiane mais principalement dans la zone externe où l'analyse est réalisée.

Les grains réels totaux (n = 1391) sont répartis en deux catégories: 74,8% de grains réels partagés contre 25,2% de grains réels exclusifs.

La distribution de grains hypothétiques est déterminée par l'analyse de la localisation précise de 1844 grains. Cette distribution aléatoire correspondant à 34,2% de grains hypothétiques partagés contre 65,8% de grains hypothétiques exclusifs, est significativement différente de celle des grains réels totaux, P< 0,0001 (Tableau 9).

Les grains réels partagés totaux sont localisés pour 33,6% au niveau d'appositions entre terminaisons nerveuses, 32,7% entre terminaison nerveuse et tanycyte, et 4,0% avec d'autres structures (capillaires, fibres nerveuses). Le rapport de grains réels totaux/hypothétiques montre qu'il apparaît un enrichissement en grains réels pour toutes ces appositions (T/H # 2).

Parmi les grains réels exclusifs totaux 16,8% sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 5,6% dans des tanycytes et 2,8% dans les autres structures.

Il apparaît un appauvrissement net en grains réels exclusifs par rapport aux grains hypothétiques (T/H < 0.8).

La distribution des grains réels totaux est significativement différente de celle des grains réels non-spécifiques, P< 0,0001 (Tableau 9).

#### \*liaison non-spécifique:

Les grains réels non-spécifiques (n = 693) sont essentiellement des grains exclusifs: 63,3% contre 36,7% de grains partagés. Les rapports réels non-spécifiques/hypothétiques sont relativement proches de 1, ce qui permet d'affirmer que la distribution de grains non-spécifiques est comparable à la distribution de grains aléatoires (Tableau 9).

	Hypothétiques	Réels (T)*	Réels (NS)**	Réels/Hyp	othétiques
	(H) - (%)	(%)	(%)	T/H	NS/H
Grains partagés	34,2	74,8	36,7	2,19	1,07
TN-TN	19,1	33,6	21,4	1,76	1,12
TN-tanycytes	11,1	32,7	12,2	2,94	1,09
Autres structures	4,0	8,4	3,1	2,10	0,78
Grains exclusifs	65,8	25,2	63,3	0,38	0,96
TN	49,8	16,8	44,9	0,34	0,90
Tanycytes	12,4	5,6	16,8	0,45	1,35
Autres structures	3,6	2,8	1,6	0,77	0,44
Partagés/Exclusifs	0,52	2,97	0,58		
Nb de grains comptés	1844	1391	693		

**Tableau 9:** Distribution comparative de grains d'argent hypothétiques (H), réels totaux (T) et réels non-spécifiques (NS) dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ .

\*: significativement différent de la répartition de grains hypothétiques à P< 0,0001 (X<sup>2</sup>=83,66).

\*\*: significativement différent de la répartition de grains réels totaux à P< 0,0001 ( $X^2=90,54$ ).

	Hypothétiques (%)	Spécifiques* (%)	Spécifiques/Hypothétiques
Grains partagés	34,2	83,7	2,45
TN-TN	19,1	36,4	1,91
TN-tanycytes	11,1	37,5	3,38
Autres structures	4,0	9,6	2,40
Grains exclusifs	65,8	16,3	0,25
TN	49,8	10,2	0,20
Tanycytes	12,4	3,0	0,24
Autres structures	3,6	3,1	0,86
Partagés/Exclusifs	0,52	5,13	

**Tableau 10:** Distribution comparative de grains hypothétiques (H) et spécifiques (S) dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ .

\*: statistiquement différent de la distribution de grains hypothétiques à P< 0,0001  $(X^2=124,98)$ .

#### \*liaison spécifique:

La distribution de grains spécifiques déterminée à partir de celle des grains réels totaux et non-spécifiques est significativement différente de celle des grains hypothétiques, P< 0,0001 (Tableau 10).

Les grains spécifiques sont répartis en deux catégories: 83,7% de grains partagés pour 16,3% de grains exclusifs, soit 5,13 fois plus de grains partagés que de grains exclusifs. Les rapports spécifiques/hypothétiques font apparaître un enrichissement en grains partagés (S/H = 2,45) et un appauvrissement en grains exclusifs (S/H = 0,25).

Les grains partagés correspondent pour 36,4% à des appositions entre terminaisons nerveuses, 37,5% entre terminaison et tanycyte et 9,6% avec d'autres structures. Par comparaison avec la distribution de grains hypothétiques, il apparaît un enrichissement en grains spécifiques partagés pour ces trois types d'appositions. Les rapports spécifiques/hypothétiques correspondent à 1,91 pour les appositions entre terminaisons nerveuses, 3,38 entre terminaison nerveuse et tanycyte et 2,40 avec les autres structures.

Les grains exclusifs sont localisés pour 10,2% dans des terminaisons nerveuses, 3,0% dans des tanycytes et 3,1% dans les autres structures. Il apparaît un appauvrissement net en grains spécifiques exclusifs par rapport aux grains hypothétiques. Les rapports spécifiques/hypothétiques sont de 0,20 pour les grains localisés dans des terminaisons nerveuses, 0,24 dans les tanycytes et 0,86 dans les autres structures.

L'analyse des résultats montre donc que les sites de liaison spécifique de la 125I-galanine sont localisés principalement au niveau d'appositions membranaires (83,7%), essentiellement au niveau de deux types d'appositions: entre terminaisons nerveuses (36,4%) et entre terminaison nerveuse et tanycyte (37,5%).

Le reste des grains est localisé dans des structures (16,3%) principalement à l'intérieur de terminaisons nerveuses (10,2%).

### 3-2.2. en présence de $Mg^{2+}/GTP$ :

#### a) à l'échelle de la microscopie optique:

Les coupes semifines incubées en présence de 125I-galanine seule (liaison totale) présentent un marquage relativement hétérogène plus dense qu'en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP (Fig.33C). Les observations sont conduites de la même façon que précédemment dans la zone externe de l'éminence médiane qui présente une densité de grains plus élevée que les autres régions de la structure.

Les résultats obtenus entre les animaux sont comparables (n=6).

Les coupes semifines incubées en présence de galanine froide (liaison non-spécifique) révèlent l'existence de grains dispersés (Fig.33D).

Le nombre de grains d'argent comptés (en mm<sup>2</sup>) sur les coupes incubées en présence de galanine froide représente approximativement 11% de la liaison totale. Ces résultats permettent d'estimer un pourcentage de liaison spécifique correspondant à 89% de la liaison totale.

#### b) à l'échelle de la microscopie électronique:

#### \*liaison totale:

Les coupes incubées en présence de <sup>125</sup>I-galanine seule (liaison totale) sont analysées de la même façon que précédemment (Tableau 11).

Les grains d'argent (n = 1582) apparaissent localisés en deux catégories de grains: 74,6% de grains totaux partagés et 25,4% de grains exclusifs. La distribution de grains hypothétiques, correspondant à 34,2% de grains partagés pour 65,8% de grains exclusifs, est significativement différente de celle des grains réels totaux, P< 0,0001 (Tableau 11). L'enrichissement relatif des grains partagés et exclusifs, respectivement 2,18 et 0,39, est différent de 1.

Les grains réels partagés totaux sont localisés pour 41,1% au niveau d'appositions entre terminaisons nerveuses, 25,4% entre terminaison nerveuse et tanycyte, 8,1% avec d'autres structures. La comparaison avec la distribution de grains hypothétiques met en évidence un enrichissement relatif en grains réels totaux (T/H # 2).

	Hypothétiques	Réels (T)*	Réels (NS)**	Réels/Hyp	othétiques
	(H) - (%)	(%)	(%)	I/H	NS/H
Grains partagés	34,2	74,6	36,6	2,18	1,07
TN-TN	19,1	41,1	18,9	2,15	0,99
TN-tanycytes	11,1	25,4	12,8	2,29	1,15
Autres structures	4,0	8,1	4,9	2,03	1,23
Grains exclusifs	65,8	25,4	63,4	0,39	0,96
TN	49,8	16,1	46,1	0,32	0,93
Tanycytes	12,4	7,9	14,3	0,63	1,15
Autres structures	3,6	1,4	3,0	0,39	0,83
Partagés/Exclusifs	0,52	2,94	0,58		
Nb de grains comptés	1844	1582	561		

**Tableau 11:** Distribution comparative de grains d'argent hypothétiques (H), réels totaux (T) et réels non-spécifiques (NS) dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

\*: significativement différent de la répartition de grains hypothétiques à P< 0,0001 ( $X^2=73,75$ ).

\*\*: significativement différent de la répartition de grains réels totaux à P< 0,0001 ( $X^2=82,42$ ).

	Hypothétiques (%)	Spécifiques* (%)	Spécifiques/Hypothétiques
Grains partagés	34,2	79,3	2,32
TN-TN	19,1	43,8	2,29
TN-tanycytes	11,1	27,0	2,43
Autres structures	4,0	8,5	2,13
Grains exclusifs	65,8	20,7	0,31
TN	49,8	12,4	0,25
Tanycytes	12,4	7,1	0,57
Autres structures	3,6	1,2	0,33
Partagés/Exclusifs	0,52	3,83	

**Tableau 12:** Distribution comparative de grains hypothétiques (H) et spécifiques (S) dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. \*: statistiquement différent de la distribution de grains hypothétiques à P< 0,0001

(X<sup>2</sup>=91,73).

Parmi les grains exclusifs totaux, 16,1% sont localisés dans des terminaisons nerveuses, 7,9% dans des tanycytes et 1,4 dans les autres structures. A l'inverse des grains réels partagés, il apparaît un appauvrissement en grains réels exclusifs (T/H < 0,65).

La distribution des grains réels totaux est significativement différente de celle des grains réels non-spécifiques, P< 0,0001 (Tableau 11).

#### \*liaison non-spécifique:

Les grains d'argent (n = 561) détectés sur les coupes ultrafines en présence de galanine froide sont détectés principalement comme des grains exclusifs: 63,4% pour 36,6% de grains réels non-spécifiques (Tableau 11). Le rapport de grains réels non-spécifiques/hypothétiques est relativement proche de 1. La distribution de grains non-spécifiques coïncide donc avec la distribution de grains hypothétiques et peut être considérée comme une répartition aléatoire ne gênant pas la détermination de la distribution de grains spécifiques.

#### \*liaison spécifique:

La distribution des grains spécifiques est significativement différente de celle des grains hypothétiques, P< 0,0001 (Tableau 12).

Les grains partagés spécifiques sont essentiellement présents au niveau d'appositions membranaires: 43,8% entre terminaisons nerveuses, 27,0% entre terminaison nerveuse et tanycyte, 8,5% avec d'autres structures. La comparaison avec la distribution de grains aléatoires montre un enrichissement relatif en grains (S/H = 2,32).

Le reste des grains est localisé pour 12,4% dans des terminaisons nerveuses, 7,1% dans des tanycytes et 1,2% dans les autres structures. On observe un appauvrissement en grains exclusifs spécifiques par rapport à la distribution hypothétique (S/H = 0,31).

#### Fig.34:

Observation à l'échelle ultrastructurale dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat. Détection de la liaison de la 125I-galanine en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

Sous cette condition, les grains sont plus nombreux et il est possible de visualiser plusieurs tortillons dans le même champ. Des tortillons sont observés sur des appositions membranaires (A,B,C).

Grossissement: X 25000.



L'analyse des résultats indique que les sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine, détectés dans la zone externe de l'éminence médiane en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP dans le milieu expérimental, sont présents essentiellement au niveau d'appositions membranaires (79,3% contre 20,7% de grains exclusifs) et plus particulièrement au niveau d'appositions entre terminaisons nerveuses (43,8%).

# 3-3.3. Comparaison de la distribution de grains spécifiques en absence et en présence de $Mg^{2+}/GTP$ :

La comparaison des distributions de grains spécifiques, dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat (Tableaux 10 et 12), montre que l'apport de Mg<sup>2+</sup>/GTP au milieu expérimental induit:

- une augmentation du pourcentage de grains spécifiques partagés entre terminaisons nerveuses (43,8% contre 36,4% en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP) ; - ainsi qu'une augmentation du pourcentage de grains spécifiques exclusifs localisés à l'intérieur de terminaisons nerveuses (12,4% contre 10,2%).

En conclusion, des sites de liaison de la 125I-galanine ont été détectés dans la zone externe de l'éminence médiane de Rat. Ces sites sont localisés essentiellement au niveau d'appositions membranaires ( > 79%). De la même manière que chez le Cobaye, il semble que l'apport de Mg<sup>2+/</sup>GTP favorise la localisation de ces sites au niveau des terminaisons nerveuses (grains partagés et exclusifs).

# DISCUSSION

## <u>1 - Les récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye:</u> <u>Distribution radioautographique des sites de liaison.</u>

Cette étude documente la toute première détection des récepteurs de la galanine dans le système nerveux central de Cobaye, domaine qui restait inexploré jusqu'alors.

La caractérisation récente du récepteur de la galanine, d'un point de vue moléculaire et fonctionnel (Amiranoff et coll., 1992), ouvrant tout juste la voie au clonage du récepteur, aucun anticorps dirigé contre les récepteurs de la galanine n'était disponible pour la réalisation de ce travail.

Seule la méthode de visualisation radioautographique restait envisageable pour cette étude. En outre, cette approche offre plusieurs avantages:

- elle permet de localiser les sites de liaison au niveau régional et de quantifier les résultats par analyse d'image ;

- elle permet l'étude directe du système de transduction membranaire du signal lié à la galanine (couplage à des protéines G).

Le seul outil utilisé jusqu'à présent pour l'étude de ces récepteurs est la galanine porcine synthétique marquée à l'iode 125 ou <sup>125</sup>I-galanine (Melander et coll., 1986b; Skofitsch et coll., 1986).

Des études menées sur lignées de cellules  $\beta$ -pancréatiques de Rat ont démontré la conservation de l'activité biologique pour ce radioligand (Lagny-Pourmir et coll., 1989a).

De plus, des travaux ont montré que la galanine porcine agit comme un neuropeptide inhibiteur sur les neurones cholinergiques myentériques et mésentériques d'intestin de Cobaye (Ekblad et coll., 1985 ; Yau et coll., 1986 ; Fox et coll., 1988 ; Takaki et coll., 1992).

Le terme de sites de liaison de la galanine est par conséquent étendu en terme de récepteurs de la galanine.

La galanine porcine possède deux résidus tyrosine  $(Tyr^9 \text{ et } Tyr^{26})$  qui peuvent être iodés en présence de chloramine T (cf. Matériels et Méthodes). La galanine monoiodée est utilisée spécifiquement pour l'étude des sites de liaison de la galanine (Amiranoff et coll., 1987 ; Servin et coll., 1987). La galanine iodée en position 26: 125I-Tyr<sup>26</sup>galanine est considérée comme plus réactive que la galanine iodée en position 9: 125I-Tyr<sup>9</sup>-galanine (Land et coll., 1991). La forme monoiodée en position 26, extérieure à la partie interagissant avec le récepteur, ne gêne pas la reconnaissance de la molécule au niveau du site actif du récepteur.

Le choix de ce radioligand est rendu possible par la forte conservation phylogénétique des 15 premiers acides aminés N-terminaux de la molécule de galanine qui constitue la portion interactive avec le récepteur (cf. Généralités).

Si la galanine de Cobaye n'a pas été séquencée, des études menées dans le tractus gastro-intestinal ont montré l'existence d'une seule forme moléculaire de galanine chez le Cobaye différent de celle des autres espèces par une hétérogénéité moléculaire non spécifiée liée à la partie C-terminale (Bauer et coll., 1986a).

Aux vues de ces résultats, il était donc concevable d'utiliser la galanine porcine monoiodée comme marqueur des récepteurs de la galanine dans le système nerveux central de Cobaye du fait de la conservation de la région N-terminale impliquée dans l'interaction avec le récepteur (cf. Généralités).

151

### 2- Caractérisation des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye

La détection des sites de liaison de la galanine nécessite avant toute chose la connaissance des caractéristiques physico-chimiques du radioligand employé pour la mise au point d'une technique expérimentale la plus appropriée possible (cf. Matériels et Méthodes).

Jusqu'ici, les récepteurs de la galanine, détectés avec la <sup>125</sup>I-galanine porcine, ont été caractérisés essentiellement chez les mammifères et plus particulièrement chez le Rat (Servin et coll., 1987 ; Fisone et coll., 1989a ; Köhler et coll., 1989a ; Chen et coll., 1992).

Il s'agit d'une seule classe de sites de haute affinité ( $K_D$  de 0,2 à 2 nM) et de capacité voisine de celles des autres récepteurs peptidergiques du système nerveux central (100 fmol/mg de protéines tissulaires).

Aucune caractérisation des récepteurs de la galanine n'a encore été réalisée chez le Cobaye.

Les expériences préliminaires nécessaires à l'étude de distribution des sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye ont permis de caractériser ces récepteurs pour plusieurs régions du système nerveux central choisies en fonction du degré de densité de sites exprimés (élevé, moyen, faible).

Les conditions optimales de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine ont été déterminées *in vitro* sur coupes de cerveau non fixé de Cobaye par macroradioautographie quantitative qui constitue une méthode de détection fiable pour la détermination des caractéristiques du radioligand au niveau régional (Skofitsch et coll., 1986).

L'analyse des courbes de Scatchard obtenues pour l'amygdale centrale, la strie médullaire, la zone incerta, l'hypothalamus latéral et l'éminence

médiane, a permis de démontrer, comme pour les autres espèces, l'existence d'une seule classe de sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine (cf. Matériels et Méthodes).

Les résultats discutés ici ne concernent que la partie du travail réalisé dans les conditions standard, en absence de  $Mg^{2+}/GTP$ . Les autres résultats (travail en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ ) seront discutés plus loin (cf. Régulation du récepteur de la galanine).

Les valeurs de K<sub>D</sub> de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine déterminées sur coupes de cerveau de Cobaye varient entre 1,00 nM et 1,16 nM et sont compatibles avec celles obtenues dans le système nerveux central des mammifères (Melander et coll., 1986b ; Skofitsch et coll., 1986 ; Köhler et coll., 1989a). La capacité de ces sites de liaison ( $B_{max}$ ) est comprise entre 6,75 et 143,69 fmol/mg de protéines tissulaires, et comparable à celles obtenues dans le système nerveux central des autres espèces de mammifères déjà investiguées (Skofitsch et coll., 1986 ; Servin et coll., 1987 ; Köhler et coll., 1989a).

Cette étude démontre l'existence de récepteurs de la galanine de haute affinité et spécifiques dans le système nerveux central de Cobaye, dont les caractéristiques cinétiques et physicochimiques sont voisines de celles des autres récepteurs peptidergiques du système nerveux central:  $K_D$  de 1,00 à 1,16 nM dans un modèle à une classe de sites (Tableau 3).

Ces données correspondent à une étape préliminaire permettant de déterminer les conditions optimales pour l'étude de la distribution des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye. Elles sont cependant insuffisantes pour tester l'hypothèse de plusieurs classes ou isotypes de récepteurs de la galanine. Des expériences de déplacement par des fragments ou des dérivés de la galanine constituent une des approches possibles.

# <u>3 - Localisation des sites de liaison de la galanine</u> <u>dans le cerveau de Cobaye:</u> <u>Comparaison avec les autres espèces.</u>

# 3-1. Aspects généraux de la cartographie des récepteurs de la galanine établie avec la <sup>125</sup>I-galanine:

Ce travail confirme les qualités techniques de la <sup>125</sup>I-galanine comme radioligand utilisé pour une visualisation des récepteurs de la galanine dans le système nerveux central de Cobaye. En plus d'un temps très court d'exposition pour l'obtention de radioautographies suffisamment contrastées, la liaison non-spécifique détectée est négligeable dans la plupart des régions du système nerveux central (cf. Résultats).

En général, les informations biochimiques de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine chez le Cobaye sont similaires à celles obtenues chez les autres mammifères et nos mesures densitométriques sont du même ordre (cf. chapitre précédent). Les expérimentations ont été conduites avec la <sup>125</sup>Igalanine utilisée à la concentration saturante de 1,5 nM comme antérieurement chez le Rat (Melander et coll., 1986b).

Chez le Cobaye, les quantités de sites de liaison de <sup>125</sup>I-galanine sont obtenues à partir de standards réalisés à partir d'homogénats de cerveau qui donnent une calibration assez exacte de la quantité de liaison sur coupes de cerveau. La distribution de la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine était similaire chez tous les animaux expérimentés et la quantité de liaison ne varie pas significativement entre les cerveaux.

La concentration mesurée est une moyenne de la liaison dans chaque région ou noyau. Cependant, quelques régions ou noyaux présentent des différences régionales en concentration de liaison (Tableau 4 ; Figs 14 à 17). Par exemple, dans le septum médian la densité de liaison est élevée essentiellement dans la région postérieure où elle présente une quantité de liaison de <sup>125</sup>I-galanine atteignant 28,73 fmol/mg de protéines tissulaires, tandis que les autres aires présentent des densités de sites moins

importantes (Figs 14 E,F). Par contre, au niveau de l'hippocampe, la distribution régionale de liaison peut être rapportée clairement aux différentes aires du gyrus denté (Figs 15 et 16). Ainsi un écart standard à la moyenne élevé peut concrètement indiquer une différence subrégionale de liaison de la galanine, qui peut être relative à des différences neuromorphologiques, neurochimiques, aussi bien que fonctionnelles dans la même région ou le même noyau.

Les expériences de radioautographie ont permis de montrer la présence de sites de liaison de la galanine dans le cerveau de Cobaye pour lesquels une distribution quantitative est établie. La liaison de la <sup>125</sup>I-galanine est présente dans des régions très riches en corps cellulaires, dans des zones constituées essentiellement de prolongements nerveux, et également dans des tractus de fibres.

Ainsi, la galanine par l'intermédiaire de récepteurs galaninergiques pourrait posséder des actions modulatrices sur des tractus de fibres neuronales et sur des corps cellulaires ou leurs prolongements. La liaison à des récepteurs qui sont transportés dans des fibres neuronales, de même qu'une localisation gliale de la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine, doivent également être considérées.

# **3-2. Distribution comparative des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye et des autres mammifères:**

Cette étude comparative est menée à partir des distributions établies dans des conditions expérimentales similaires chez le Cobaye (conditions standard: en absence de Mg<sup>2+</sup>/GTP, cf. Résultats), chez le Rat (Melander et coll., 1986b, 1988 ; Skofitsch et coll., 1986), chez le Singe (Köhler et coll., 1989a,b) et chez l'Homme (Köhler et coll., 1989b ; Köhler et Chan-Palay, 1990).

Toutes les données ont été rapportées en terme de densité relative de sites de liaison (faible, moyenne, élevée, très élevée) pour établir une analyse comparative entre les régions cérébrales des différentes espèces.

**Tableau 13:** Comparaison des densités de sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine détectées chez le Cobaye, le Rat (Gaymann et Falke, 1990 ; Hulting et al, 1991 ; Melander et al, 1986b, 1988 ; Skofitsch et al, 1986), le Singe (Köhler et al, 1989a,b) et l'Homme (Köhler et al, 1989b ; Köhler et Chan-Palay, 1990).

	Cobaye	Rat	Singe	Homme
Rhinencéphale				
Zones laminaires				
couche glomérulaire	-	+++		
couche plexiforme externe	-	+++		
couche plexiforme interne	-	+++		
couche granulaire	-	+++		
Bulbe olfactif accessoire	++	<b>+++</b> +		
Noyau olfactif antérieur				
médian	+	+++		
dorsal	-	++		
latéral	+	+		
ventral	+	+		
postérieur	+			
Tubercule olfactif				+++
couche moléculaire	-	+		
ilôts de Calleja	+	++		
Télencéphale				
Cortex préfrontal médian				
Cortex olfactif primaire		+	+ T F	
Cortex frontal		ـــــ		444
Cortex frontonariétal		ττ		TTT
Cortex nérirhinal	<b>*</b> *	<u>+++</u>		
Cortex insulaire	- T T	+++	<u>тт</u>	
Cortex niriforme		++	+++	<u>++++</u>
Cortex somatosensoriel		-		
Cortex cingulé	-	-		++
Cortex entorhinal	-	+++		+++
Néocortex		,		+++
Novau septal médian	+++	++	+	
Novau septal latéral			++++	
nartie ventrale	+++	++		
partie dorsale	+++	+		
partie intermédiaire	+	+++		
Novau de la bande diagonale de Broca	++	++	+++	
Novau du lit de la strie terminale	++++	+++	++++	++++
Amygdale				
subdivision médiane	++++	+++		+++
subdivision centrale	++++	+++	++++	+++
subdivision latérale	++++	+	++++	++
subdivision basale	++++	++		++
corticale postérieure	++++	++++		
aire amygdalohippocampique	++++	++	+++	
Corps calleux	-	-		
Pallidum ventral	+	+++		
Noyau basal de Meynert		++	++++	+++
Noyau accumbens	++	++	++++	
Caudé/Putamen	-	+	+	-
Globus Pallidus		-	+	

++++: densité de sites très élevée ; +++: élevée ; ++: modérée ; +: faible ; -: non détectée.

	Cobaye	Rat	Singe	Homme
Rudiment hippocampique antérieur	-	+++		
subiculum dorsal		_	_	++
subiculum ventral	++	++++	-	++++
Champs de la corne d'Ammon				
CA1	-	++	+	+++
CA2	++	-	-	
CA3	-	+	++	
CA4	+++	-	-	
Gyrus dente				
couche moleculaire	++++	-	+++	+++
fascia dentata		-	+++	++++
Strie médullaire	***	-	++++	TTTT
Strie medunane				
Tractus du télencéphale			-	
Fimbria			+++	
segment interne	++	+		
segment externe	+++	+++		
Strie terminale	++++	+++	++++	
Diencéphale				
Thalamus			+	
antérieur dorsal	+++			
paracentral	+++	+		
centromédian	-	+++	++	
centrolateral		+++		
ventrolateral		+		
ventronostérieur médian	**	+		
latérodorsal	-	+		
novau thalamique paraventriculaire	+	+++		
noyau périventriculaire		++		
noyau reuniens	++	++	++	
zone incerta	+++	++	+++	
habenula médiane	++++	+++		
lemniscus médian	++			
noyau prétectal médian		+++		
Hypothalamus				
novau supraoptique		<b></b>		
tractus optique	+++	$\mathbf{T}\mathbf{T}\mathbf{T}$	+++	
aire préoptique	++	+	++++	++++
aire hypothalamique antérieure	++	, ++		
aire hypothalamique latérale	+	+++	+++	
hypothalamus paraventriculaire	+++	+++	+++	
noyau dorsomédian	+++	+++	++	
noyau ventromédian	+++	++	++	
hypothalamus périventriculaire		++		
noyau arqué	+	+	++	
eminence mediane	**	++	++	
corps maminaire	+++	+	++	
novau supramamillaire	<u></u>	++ +		
noyau supramaminane	777	++	++	

++++: densité de sites très élevée ; +++: élevée ; ++: modérée ; +: faible ; -: non détectée.

	Cobaye	Rat	Singe	Homme
Hypophyse				
lobe antérieur	+	-		
lobe postérieur	+++	-		
looo posteriou				
Mésencéphale				
Novau péripedunculaire	+++	***		
Novau interpedunculaire	-	+		++++
Géniculé ventral	+++			
Aire antérieure prétectale	+	+		
Substance Noire				
pars compacta	+++	++	++	++
pars réticulata	+	-		
Aire tegmentaire ventrale	+	++	++	++
Collicule supérieur			++	++
couche grise superficielle	++	++		
couche nerveuse optique	++	+++		
Collicule inferieur		+		++++
noyau central	++			
noyau pericentral	+++			
substance grise centrale	<b>E</b> 1 1		++	++++
dorsale		++ ++		
uoisaic	TTT	ŦŦ		
Pons/Medulla oblongata				
Raphe dorsal	++	++	***	++++
Raphe médian	++	++		++
Raphe pallidus	+++	++		+++
Noyau vestibulaire médian	++			
Noyau du prepositus hypoglossal	++			
Noyau cunéiforme		++		
Noyau réticulé tegmentopontin	-	++		+++
Locus coeruleus	+++	+++	+++	+++
Noyau pontin		-		+
Noyau trigéminé spinocaudal	+++	+++		
Noyau trigéminé du tractus spinal	++++	+	++	
Noyau du tractus spinal du nerf	+++	++		
trigéminé, partie orale				
Noyau moteur trigemine	++			
Noyau migemine sensoriel principal	++	<u></u>		
A rea postrema	+++	+++	****	
Novau parabrachial	<b>••</b>	+++	+++	++++
Novau réticulé parvocellulaire	l ++			+++
Novau facial	<u>+</u> +		•	
Complexe vague dorsal		+++		
Comprone rugue dorour				
Cervelet	-	-	++	

++++: densité de sites très élevée ; +++: élevée ; ++: modérée ; +: faible ; -: non détectée.

La comparaison avec les travaux réalisés antérieurement permet d'observer des variations inter-espèces dans la distribution des sites de liaison (Tableau 13).

#### \* Rhinencéphale:

Chez le Cobaye, des sites de liaison ont été détectés dans le bulbe olfactif accessoire, le noyau olfactif antérieur et le tubercule olfactif. Les densités de sites enregistrées dans ces régions semblent plus faiblement exprimées que chez le Rat. A ce niveau, la principale différence réside dans l'expression de sites fortement marqués chez le Rat dans les zones laminaires: couche glomérulaire, couches plexiformes et granulaire, qui sont dépourvues de sites chez le Cobaye.

#### \* Télencéphale:

Chez le Cobaye, le cortex périrhinal présente une liaison modérée, alors que toutes les autres régions corticales semblent dépourvues de sites de liaison spécifique. Cette distribution est fortement différente de celle des autres espèces. Chez le Rat, de nombreuses régions corticales expriment une densité relativement élevée de récepteurs de la galanine (préfrontal médian, piriforme, périrhinal et entorhinal). Chez l'Homme, presque toutes les couches du néocortex sont marquées. Cette distribution néocorticale est moins étendue chez le Rat, et semble totalement absente chez le Cobaye.

Dans le cerveau antérieur basal, la distribution des sites de liaison est sensiblement la même chez toutes les espèces. Cependant, des récepteurs sont exprimés dans le noyau basal de Meynert et le caudé/putamen uniquement chez le Rat et les primates. Un marquage faible est présent uniquement dans le globus pallidus du Singe.

Dans le complexe amygdaloïde du Cobaye, les récepteurs sont distribués et présents en densité très élevée dans toutes les subdivisions du complexe. Chez le Rat, les mêmes observations ont été effectuées dans ces régions à l'exception de la subdivision latérale du complexe amygdaloïde qui apparaît faiblement marqué. Chez le Singe, des sites de liaison sont présents dans le complexe amygdaloïde de la même façon que chez le Cobaye. Chez l'Homme, toutes les subdivisions présentent un marquage élevé à l'exception des aires latérales et basales qui sont modérément marquées.

Le noyau du lit de la strie terminale contient des densités de sites très élevées chez le Cobaye et les primates. La liaison exprimée dans cette région, chez le Rat, est moins marquée, mais reste néanmoins élevée.

Chez le Cobaye, le subiculum dorsal de la formation hippocampique présente un marquage modéré, tandis que le subiculum ventral apparaît totalement dépourvu de sites de liaison. Les champs de la corne d'Ammon CA4 et CA1 exhibent un marquage respectivement élevé et modéré, alors que les champs CA1 et CA3 ne présentent pas de sites. Le gyrus denté et la strie médullaire contiennent des densités de sites de liaison très élevées à élevées. Chez le Rat, le subiculum ventral présente des densités de sites très élevées. Dans les champs CA1 et CA3 ventraux des densités de sites faibles à modérées ont été détectées, tout comme chez les primates. Le subiculum dorsal et les champs CA2 et CA4 de la corne d'Ammon ne présentaient pas de marquage chez ces espèces. Chez le Rat, il n'a pas été montré de sites de liaison dans le gyrus denté. Chez les primates, un marquage de densité élevée à très élevée est détecté dans le gyrus denté de la même manière que chez le Cobaye. Il apparaît donc que ces régions sont source de variations inter-espèces considérables.

#### \* Tractus du télencéphale:

Chez toutes les espèces, la fimbria et la strie terminale expriment des densités de sites élevées.

#### \* Diencéphale:

#### - Thalamus:

La distribution des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine est relativement comparable chez le Cobaye et chez le Rat. Néanmoins, des récepteurs détectés chez le Rat dans le thalamus central, latéral dorsal et ventral, dans le noyau périventriculaire et dans le noyau prétectal médian n'ont
pas été mis en évidence dans nos conditions d'expérimentation chez le Cobaye. A l'inverse, un marquage apparaît dans le thalamus antérodorsal chez le Cobaye qui est absent chez le Rat. Chez les primates, le thalamus est faiblement marqué. Seuls les noyaux reuniens, centromédian et la zone incerta expriment des densités de sites de liaison modérées à élevées.

### - Hypothalamus:

Les comparaisons des densités de sites de liaison entre le Cobaye et le Rat permettent de constater une grande similitude dans la distribution et même dans les proportions relatives de ces sites. Chez les primates, la différence essentielle concerne surtout l'hypothalamus médiobasal où très peu de récepteurs ont pu être mis en évidence.

L'observation de sites de liaison dans l'hypophyse antérieure et surtout dans le lobe nerveux que nous observons chez le Cobaye n'a par contre jamais été décrite chez les autres espèces dans les mêmes conditions d'utilisation (Gaymann et Falke, 1990 ; Hulting et coll., 1991).

### \* Mésencéphale:

La distribution des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine est globalement la même chez le Cobaye et chez le Rat à quelques exceptions près. Le noyau interpedunculaire exprimant une faible densité de sites chez le Rat n'est pas marqué chez le Cobaye. Des différences de densités apparaissent également dans le collicule inférieur, la pars compacta de la substance noire et la substance grise centrale qui semblent plus élevées chez le Cobaye. De plus, un marquage élevé apparaît au niveau du géniculé ventral chez le Cobaye, non détecté chez le Rat. Chez les primates, un marquage modéré à élevé, proche de celui détecté chez le Cobaye, est existent dans le collicule supérieur, la pars compacta de la substance noire, l'aire tegmentaire ventrale et la substance grise centrale.

### \* Rhombencéphale:

La distribution de sites détectés dans la majeure partie des structures est voisine chez le Cobaye et chez le Rat. Cependant des variations de densités plus élevées chez le Cobaye apparaissent dans le noyau trigéminé du tractus spinal, le noyau du tractus spinal du nerf trigéminé (partie orale) et l'area postrema. Des sites détectés dans le noyau vestibulaire médian, le noyau du prepositus hypoglossal, le noyau moteur trigéminé, le noyau trigéminé sensoriel principal et le noyau facial de Cobaye, n'ont pas été mis en évidence chez le Rat. A l'inverse, des sites marqués dans le noyau cunéiforme et le complexe vague dorsal du Rat n'apparaissent pas chez le Cobaye. Chez le Rat et les primates, le noyau réticulé tegmentopontin et le noyau parabrachial expriment des sites qui n'ont pas été observés chez le Cobaye.

### \* Cervelet:

Chez le Cobaye et le Rat aucune liaison spécifique n'a pu être détectée dans le cervelet. Cependant, chez le Singe, l'existence de sites de liaison a été démontrée.

## 3-3. Synthèse

L'ensemble des études de distribution de la <sup>125</sup>I-galanine dans le système nerveux central des différentes espèces met en évidence l'existence de variations inter-espèces.

Dans certaines régions, les divergences sont relatives à des variations de densités. Dans d'autres cas, des sites de liaison fortement marqués dans une espèce sont non exprimés dans une autre:

- Dans le rhinencéphale un marquage élevé est détecté dans les zones laminaires non mis en évidence chez le Cobaye.

- Dans le télencéphale, une forte dissimilitude apparaît dans les régions corticales, qui présentent un marquage largement étendu chez les primates, moins important chez le Rat et uniquement présent chez le Cobaye dans le cortex périrhinal. Dans l'hippocampe, des sites de liaison sont fortement exprimés dans le subiculum ventral du Rat à la différence du Cobaye. A l'inverse des sites sont détectés dans le gyrus denté du Cobaye, tout comme chez les primates qui n'apparaissent pas chez le Rat. - De manière générale, les densités de sites les plus élevées sont détectées dans le diencéphale et plus particulièrement dans l'hypothalamus quelle que soit l'espèce. Néanmoins des inégalités sont existantes dans le thalamus centromédian présentant des sites chez le Rat et le Singe, non détectés chez l'Homme et le Cobaye. Dans l'hypothalamus, le corps mamillaire contient des densités de sites plus élevées chez le Cobaye que chez les autres espèces. Dans l'hypophyse, un marquage élevé a été mis en évidence dans le lobe postérieur, alors qu'aucune information n'a été rapportée pour les autres espèces avec ce même type de ligand (<sup>125</sup>I-galanine). Dans le lobe antérieur, la liaison est très faible.

L'absence de mise en évidence de sites de liaison dans une structure cérébrale (par exemple au niveau cortical), n'est pas synonyme de non existence de sites de liaison. Plusieurs éléments de discussion doivent être soulignés:

(1) L'utilisation de la 125I-galanine porcine peut être un élément discutable.

Il est à noter que la structure moléculaire de la galanine n'est pas connue chez le Cobaye et il est clairement établi que la séquence de la molécule diffère selon les espèces (cf. Généralités). Ainsi, les différences structurales de la molécule endogène de Cobaye et de Porc pourrait influencer le caractère biochimique de la liaison.

Les études antérieures ont démontré que la partie N-terminale de la séquence de galanine est commune dans toutes les espèces de mammifères où la galanine est connue. D'autre part, cette région N-terminale est essentielle pour la reconnaissance de la galanine par son récepteur, tandis que la portion C-terminale, variable selon l'espèce, semble impliquée dans l'activité biologique du peptide (cf. Généralités).

Au vu de ces observations, on peut donc penser que les différences structurales de la molécule de galanine liées à l'espèce ne sont pas directement impliquées dans le caractère biochimique de la liaison. Néanmoins, le récepteur de la galanine n'a pas été cristallisé et aucun modèle tridimensionnel n'a été proposé. En absence de données concernant les caractéristiques structurales requises pour les interrelations de la galanine à son récepteur, on ne peut totalement exclure que le fait d'utiliser la <sup>125</sup>I-galanine porcine pour visualiser des récepteurs chez le Cobaye ne modifie pas les caractéristiques de liaison.

(2) Les conditions expérimentales peuvent influencer la détection des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine.

La localisation des récepteurs de la galanine a été réalisée essentiellement chez le Rat par radioautographie qualitative et quantitative avec la 125Igalanine (Melander et coll., 1986b, 1988; Skofitsch et coll., 1986; Bonnefond et coll., 1990). Dans l'ensemble, ces études concordent pour montrer la présence de sites de liaison de la 125I-galanine dans des régions où la galanine peut être détectée par des dosages radioimmunologiques (Melander et coll., 1988). Cependant, au sein de l'hypothalamus, les données sont contradictoires. Des travaux sur tissus frais congelés mettent en évidence la présence de récepteurs de la galanine uniquement dans les noyaux hypothalamiques ventromédian et dans l'hypothalamus antérieur et latéral. Par contre, dans des régions connues pour être riches en terminaisons nerveuses à galanine comme le noyau paraventriculaire, l'hypothalamus médiobasal y compris l'éminence médiane, la plupart des résultats mettent en évidence peu ou pas de sites de liaison (Skofitsch et coll., 1986 ; Bonnefond et coll., 1990). En revanche, d'autres études rapportent une distribution plus large dans l'hypothalamus après perfusion du cerveau avec un tampon Tyrode (Melander et coll., 1986b, 1988). Ces observations soulèvent la question d'un masquage des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine par des taux élevés de ligand endogène présent dans cette région.

Des résultats récents ont confirmé cette hypothèse (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992). Les auteurs ont montré que la <sup>125</sup>I-galanine se dissocie très lentement des récepteurs sur coupes décongelées *in vitro*. Ces données démontrent ainsi l'existence d'un masquage de ces sites par de la galanine endogène fortement liée notamment dans nos conditions d'étude. L'absence de dissociation des complexes récepteurs-galanine sur coupes de cerveau peut être détournée par une méthode de désaturation des récepteurs par exemple par utilisation d'une préincubation acide de force ionique élevée (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992).

Les expériences préliminaires à la détection des sites de liaison de la <sup>125</sup>Igalanine à l'échelle ultrastructurale dans l'éminence médiane convergent de toute évidence dans ce sens (cf. Matériels et Méthodes). L'étude de différentes préfixations permet d'observer une augmentation de la liaison spécifique comparée à celles de coupes de tissus frais incubées dans les mêmes conditions. Il est vraisemblable que la préfixation favorise un démasquage des sites par la galanine endogène. (3) L'affinité de la <sup>125</sup>I-galanine pour les récepteurs peut présenter une sensibilité aux guanylnucléotides.

Les données de la littérature indiquent que les récepteurs de la galanine pourraient appartenir à une famille de récepteurs couplés à des protéines de liaison des guanylnucléotides (cf. Généralités).

Une désaturation des récepteurs couplés à une protéine G peut être crée en augmentant leur taux de dissociation en présence de guanylnucléotides (Chang et coll., 1983).

Il a été démontré antérieurement qu'une incubation en présence de GTP inhibe la liaison de la 125I-somatostatine sur coupes de cerveau (Leroux et coll., 1988 ; Bertherat et coll., 1991) et qu'une étape de préincubation avec le GTP désature les récepteurs de la somatostatine hypothalamiques (Leroux et coll., 1985). Cependant, l'incubation directe avec le GTP ou ses analogues peut aussi augmenter régionalement la liaison de l'agoniste pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (Rouot et coll., 1980) et A1-adénosinergiques (Fastbom et Fredholm, 1990).

Des travaux récents ont mis en évidence l'existence d'effets régionaux stimulateurs et inhibiteurs des guanylnucléotides sur la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine dans le cerveau de Rat (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992).

En conséquence, si les récepteurs de la galanine de Cobaye (GAL-R<sub>1</sub>) sont couplés à une ou plusieurs protéines G, comme chez le Rat, il est vraisemblable que les guanylnucléotides modifient l'affinité du ligand pour ses récepteurs. Nous avons par conséquent étudié l'influence du Mg<sup>2+</sup> et du GTP sur l'expression des sites de liaison de la 125I-galanine dans le cerveau de Cobaye (cf. chapitre suivant) en vue d'optimiser les conditions de détection de ces sites dans l'éminence médiane à l'échelle ultrastructurale.

(4) L'existence d'autres classes de récepteurs de la galanine est également à envisager.

Très récemment, l'existence d'un autre type de récepteur de la galanine a été suggérée (Wynick et coll., 1993a). L'utilisation de galanine porcine marquée à l'iode 125 en son extrémité N-terminale par la méthode de Bolton et Hunter (1973) a permis de caractériser un récepteur de haute affinité de la galanine ( $K_D = 4,4$  nM) dans l'adénohypophyse de Rat (GAL-R<sub>2</sub>) différent du récepteur caractérisé antérieurement dans le

cerveau et l'intestin (GAL- $R_1$ ). Les auteurs ont montré que la région 3-10 de la galanine et l'acide aminé en position 25 (Lysine) sont cruciaux pour la liaison et l'activité biologique relatives au récepteur GAL- $R_2$ , en contraste avec les données obtenues pour le récepteur GAL- $R_1$ .

Ce récepteur non détectable avec le ligand classique, la <sup>125</sup>I-galanine, serait exclusivement exprimé dans l'adénohypophyse et l'hypothalamus (Wynick et coll., 1993a).

La distribution des sites de liaison de la 125I-galanine dans le cerveau de Cobaye a été réalisée avec la galanine porcine marquée par la méthode à la chloramine T et utilisée à la concentration saturante de 1,5 nM. Nos conditions d'expérimentation diffèrent donc totalement de celles qui ont été définies par Wynick et collaborateurs (1993) pour la détection du récepteur de type GAL-R<sub>2</sub>. En effet, la galanine porcine marquée en son extrêmité N-terminale libre par la méthode de Bolton et Hunter met en évidence un récepteur GAL-R<sub>2</sub> dont le K<sub>D</sub> est de 4,4 nM. Ces données permettent d'affirmer que les récepteurs détectés par nous-même chez le Cobaye sont de type GAL-R<sub>1</sub>.

L'étude que nous avons menée chez le Cobaye a permis cependant de détecter une densité faible de récepteurs GAL-R<sub>1</sub> dans l'adénohypophyse. Le récepteur GAL-R<sub>2</sub> ne semble donc pas exclusivement exprimé dans l'adénohypophyse. Il pourrait s'agir d'une variation inter-espèce. D'autre part, la sensibilité des techniques classiques de radioautographies utilisées antérieurement peut également être remise en question. Un masquage des sites par la galanine endogène fortement liée aux récepteurs GAL-R<sub>1</sub> peut être supposé.

En conclusion, les études de macroradioautographie quantitative mettent en évidence l'existence de sites de liaison de haute affinité de la 125I-galanine, GAL-R<sub>1</sub>, dans le système nerveux central de Cobaye.

La comparaison avec les cartographies réalisées antérieurement dans des conditions techniques comparables permet d'observer des variations inter-espèces quant à la distribution de ces sites.

## 4 - Mise en évidence d'un couplage des récepteurs de la galanine avec des protéines G chez le Cobaye: Influence des guanylnucléotides

L'étude de la régulation des sites de liaison de la 125I-galanine en présence de guanylnucléotides a été envisagée dans les différentes régions cérébrales du Cobaye pour permettre d'induire une désaturation des récepteurs occupés par la galanine endogène, en particulier dans les régions hypothalamiques dont l'éminence médiane. En outre, de telles expériences offraient l'avantage 1) de confirmer l'appartenance des récepteurs de la galanine cérébraux du Cobaye à la famille des récepteurs couplés à des protéines G et 2) de rechercher une éventuelle hétérogénéité régionale de couplage des récepteurs de la galanine à des protéines G chez le Cobaye.

La désaturation des récepteurs occupés par le ligand endogène peut être obtenue en ajoutant du GTP et du  $Mg^{2+}$  au milieu expérimental. Ceci permet également de démontrer l'existence d'une interaction entre un récepteur membranaire et une protéine G (voir références dans Birnbaumer et coll., 1985). Nous avons, par conséquent, étudié la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine dans le cerveau de Cobaye en présence de  $Mg^{2+}$  et de GTP.

Nos expériences ont été réalisées en présence de concentrations supraphysiologiques de  $Mg^{2+}$  (5 mM) dans le tampon de préincubation et de GTP (10 mM) dans le milieu d'incubation. Dans de telles conditions, l'activation des protéines G est accélérée et augmentée (Birnbaumer et coll., 1985). En fait, l'activation des différents types de protéines G par les guanylnucléotides est optimale pour des concentrations de  $Mg^{2+}$ variant entre 1 et 10 mM qui correspondent aux concentrations requises pour l'échange GDP/GTP sur la protéine G (Gilman, 1987). La comparaison des deux conditions de liaison (avec et sans  $Mg^{2+}/GTP$ ) permet de constater que l'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  a des effets inverses sur la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine selon les régions étudiées.

- Un effet inhibiteur du  $Mg^{2+}$  et du GTP sur la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine est mis en évidence dans certaines régions dont le cortex amygdaloïde, le cortex hippocampique, les noyaux mamillaires et la neurohypophyse.

- Un effet stimulant du Mg<sup>2+</sup> et du GTP sur la liaison spécifique de la <sup>125</sup>I-galanine est observé dans d'autres régions notamment la zone incerta, les noyaux hypothalamiques dorso- et ventromédians, l'éminence médiane, le noyau arqué et l'adénohypophyse.

- Par ailleurs, l'apport du  $Mg^{2+}$  et du GTP a permis de révéler des sites de liaison non détectés dans les conditions standard d'incubation.

A l'exception de la dernière observation, les effets liés au  $Mg^{2+}/GTP$  sur l'expression des sites de liaison de la <sup>125</sup>I-galanine sont comparables à des résultats décrits chez le Rat.

En effet, chez le Rat, en présence de  $Mg^{2+}$  (5 mM), les guanylnucléotides inhibent la liaison de la 125I-galanine dans le lobe frontal et vraisemblablement dans toutes les régions télencéphaliques (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992 ; Lagny-Pourmir et Crépel, 1993). Dans l'hippocampe ventral de Rat, en absence de  $Mg^{2+}$ , le GTP inhibe de manière dose-dépendante la liaison de la 125I-galanine (Fisone et coll., 1989a). Cette dernière observation a été décrite pour d'autres récepteurs peptidergiques couplés à des protéines G comme le récepteur de la substance P (Cascieri et Liang, 1983 ; Iverfeld et coll., 1988) et le récepteur du neuropeptide Y (Undén et Bartfai, 1984).

De façon comparable aux résultats que nous obtenons chez le Cobaye, en présence de  $Mg^{2+}$  (5 mM), un effet stimulant des guanylnucléotides sur la liaison de la 125I-galanine a été mis en évidence chez le Rat dans les noyaux hypothalamiques dorso- et ventromédians, péri- et paraventriculaires, dans le noyau arqué et l'éminence médiane, ainsi que

dans la portion commissurale du noyau du tractus solitaire (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992). Ce phénomène pourrait être lié à une dissociation de la galanine endogène relative à une activation des protéines G par les guanylnucléotides: l'activation provoquant une baisse de l'affinité des récepteurs. Un tel mécanisme a déjà été décrit pour d'autres récepteurs couplés à des protéines G comme les récepteurs adrénergiques (De Lean et coll., 1980 ; Rouot et coll., 1980), A1 adénosinergiques (Fastbom et Fredholm, 1990), et ceux de la somatostatine (Leroux et coll., 1988 ; Bertherat et coll., 1991).

Ces résultats permettent ainsi d'affirmer que les récepteurs de la galanine détectés par la 125I-galanine dans le cerveau de Cobaye sont effectivement couplés à une ou plusieurs protéines G, comme celà a été démontré antérieurement chez le Rat, puisqu'ils présentent de toute évidence une sensibilité à l'action conjointe du Mg<sup>2+</sup> et du GTP.

Pour essayer de comprendre comment le  $Mg^{2+}/GTP$  pourrait provoquer des effets inverses selon les régions, nous avons analysé les données de saturation (K<sub>D</sub> et Bmax) et les cinétiques dans quelques régions précises.

Dans l'amygdale centrale et la strie médullaire, les résultats des analyses de Scatchard montrent que le  $Mg^{2+}/GTP$  induit une diminution apparente de la capacité de liaison (Bmax) et une baisse d'affinité des récepteurs pour la <sup>125</sup>I-galanine (1/K<sub>D</sub>).

Il est probable que la 125I-galanine marque essentiellement les sites de haute affinité aux concentrations utilisées (0,2 à 5 nM). Ainsi, la diminution apparente du Bmax dans ces régions pourrait être expliquée par une modification d'une partie des récepteurs de la galanine vers un état de faible affinité qui ne seraient plus détectables compte-tenu des concentrations de traceur utilisées. De telles observations ont été rapportées pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique avec un agoniste de synthèse (Williams et Lefkowitz, 1977).

Par extension, on peut penser que toutes les régions pour lesquelles un effet inhibiteur lié au  $Mg^{2+}/GTP$  est observé sont vraisemblablement soumises à ce mécanisme.

Dans l'éminence médiane comme dans l'hypothalamus latéral et la zone incerta, le Mg<sup>2+</sup>/GTP augmente le Bmax alors qu'aucun effet significatif sur l'affinité apparente des récepteurs n'a été mis en évidence. A la vue de ces résultats, on pourrait penser que l'augmentation de liaison causée par le Mg<sup>2+</sup>/GTP est liée au fait que l'équilibre de liaison ne soit pas atteint pour ces régions dans les conditions standard. Au contraire, le calcul des  $\theta_{1/2}$  indique que le Mg<sup>2+</sup>/GTP augmente le temps requis pour atteindre l'équilibre.

Par conséquent, cette interprétation ne semble pas justifiée puisque l'étude des cinétiques indique que pour un temps d'incubation de 120 min (utilisé pour les études de saturation) nous nous plaçons effectivement dans des conditions de liaison à l'équilibre.

De manière générale, il semble que la liaison spécifique augmente plus par une diminution de la liaison non-spécifique que par une augmentation de la liaison totale. Il est possible que l'aspect biphasique curieusement observé pour les cinétiques de liaison en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP soit en relation avec des modifications induites au niveau des récepteurs de la galanine couplés aux protéines G qui ne seraient pas encore stabilisées. Au vu des courbes de cinétiques, il semble que deux sites de liaison de la galanine soient détectés dans les conditions de travail. L'apport de Mg<sup>2+</sup>/GTP abaisserait l'affinité d'un site et on n'observerait plus alors qu'un site de haute affinité. L'observation des courbes de cinétiques de liaison non-spécifique dans les conditions standard (Fig.6) suggère l'existence d'un site de haute affinité que nous détectons (mis en évidence par les études de saturation). Cependant, à la vue de certaines courbes et notamment celles concernant l'éminence médiane, on peut suspecter l'existence d'un deuxième site.

Ces résultats sont à rapprocher des observations de Wynick et collaborateurs (1993) qui démontrent l'existence d'un type de récepteur GAL-R2 dans l'hypothalamus et l'hypophyse.

Dans les conditions de liaison à l'équilibre le  $Mg^{2+}/GTP$  augmente la spécificité de la liaison d'approximativement 20% dans toutes les régions étudiées. Par conséquent, on peut penser qu'il existe dans les conditions standard une compétition importante entre la 125I-galanine et la galanine endogène dans ces régions.

Une telle suggestion a déjà été formulée chez le Rat (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992). En accord avec cette hypothèse, il a été montré chez le Rat que la concentration locale de galanine est élevée dans certaines régions hypothalamiques et que la dissociabilité agoniste-récepteur est très lente. La dissociabilité lente de la galanine endogène pourrait donc expliquer les effets stimulants des guanylnucléotides sur la liaison de la 125I-galanine à l'équilibre dans les régions où la concentration de galanine endogène est suffisamment élevée pour occuper une bonne partie des sites.

Par analogie avec les observations faites pour les récepteurs cérébraux A<sub>1</sub> de l'adénosine (Fastbom et Fredholm, 1990), il est concevable que les effets régionaux inverses liés au Mg<sup>2+</sup>/GTP sur la liaison de la  $^{125}I$ -galanine soient en relation avec des différences de sensibilité des protéines G couplées aux récepteurs de la galanine.

Nos observations pourraient ainsi être rapportées à la nature ou à un état de couplage différentiel des récepteurs de la galanine aux protéines G. Néanmoins, cette hypothèse demande à être vérifiée par des études complémentaires qui n'ont pas fait l'objet de ce travail.

L'ensemble de ces données et nos observations suggèrent que les effets stimulateurs de  $Mg^{2+}/GTP$  sur la liaison détectés dans différentes régions du cerveau de Cobaye peuvent être liées à un fort taux d'occupation des récepteurs par la galanine endogène et/ou à un état de couplage différentiel des récepteurs dans ces régions. Une explication identique peut être proposée pour les régions qui expriment des sites de liaison en présence de  $Mg^{2+}/GTP$  non visualisés dans les conditions standard.

En conclusion, les divers effets régionaux liés au  $Mg^{2+}/GTP$  détectés pour la cartographie par macroradioautographie quantitative pourraient être expliqués en terme d'interférence de liaison avec la galanine endogène liée aux coupes de cerveau et/ou en terme de couplage différentiel des protéines G aux récepteurs de la galanine ou de récepteurs différentiels dans les différentes structures. La compréhension des mécanismes des divers effets liés au  $Mg^{2+}$  et au GTP nécessite d'autres données qui n'ont pas été envisagées dans ce travail. Il serait intéressant d'étudier indépendamment les effets du  $Mg^{2+}$  et du GTP sur la liaison de la 125I-galanine. La nature des protéines G couplées aux récepteurs cérébraux restent également à déterminer.

Cette étude démontre donc l'existence de sites de liaison de haute affinité de la galanine dans le cerveau de Cobaye dont la sensibilité aux guanylnucléotides est établie. Chez le Cobaye, les sites de liaison de la galanine seraient couplés à un système de transduction membranaire impliquant une ou des protéines G, de la même manière que chez le Rat. Néanmoins, cette étude ne permet pas de déterminer la nature des protéines G impliquées dans les mécanismes de transduction.

## <u>5 - Distribution de la galanine dans l'hypothalamus</u> <u>de Cobaye</u>

### 5-1. Considérations méthodologiques.

La distribution de la galanine dans l'hypothalamus de Cobaye a été envisagée par détection immunocytochimique classique de type indirecte. Une étude de distribution comparative a été établie avec celle du GnRH dans l'aire préoptique et celle du GRF dans le noyau arqué et l'éminence médiane mis en évidence par la même méthode.

La spécificité des différents anticorps a été testée et a permis la publication de nombreux travaux (Barry et coll., 1973a, 1974 ; Beauvillain et Tramu, 1980 ; Beauvillain et coll., 1987).

Les tests de spécificité des doubles marquages ont été effectués et aucune réaction croisée n'apparaît.

### 5-2. Distribution de la galanine: Comparaison inter-espèce.

### 5-2.1. Aire préoptique:

La distribution générale de la galanine dans l'aire préoptique du Cobaye est semblable à celle décrite chez le Rat (Ch'ng et coll., 1985 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985, 1986 ; Melander et coll., 1986 ; Merchenthaler et coll., 1990, 1991). De nombreuses cellules à galanine sont détectées dans les noyaux médians et latéraux de l'aire préoptique de ces deux espèces.

Chez le Cobaye, l'étude comparative de la distribution de la galanine et du GnRH ne permet pas de déceler une coexpression des deux peptides dans les mêmes cellules.

Ceci est différent du Rat, chez lequel il existe de toute évidence une coexpression de la galanine et du GnRH qui est sexuellement dimorphique, puisque plus fréquente chez la femelle que chez le mâle (Merchenthaler et coll., 1990).

Cette coexpression n'a pas été retrouvée chez le Cobaye, dans l'aire préoptique, quel que soit le sexe. Cependant, l'existence d'afférences galaninergiques aux cellules à GnRH a été montrée dans l'aire préoptique du Cobaye.

Plusieurs explications sont envisageables:

- Ces observations permettent de suggérer l'existence d'une différence inter-espèce qui a déjà été mise en évidence pour d'autres systèmes neuropeptidergiques (par exemple: somatostatine-enképhaline chez le Cobaye et CRF-enképhaline chez le Rat).

- Cependant, il est possible qu'il existe une expression de la galanine dans les cellules à GRF pendant un moment très court chez le Cobaye, alors que chez le Rat il apparaît un pic de galanine pendant 24 heures à partir du proestrus dans les cellules à GnRH (Merchenthaler et coll., 1990). Dans l'éminence médiane, les expériences n'ont pas permis non plus de mettre en évidence de coexpression galanine-GnRH. Par contre, ceci a pu être observé chez la Ratte (Beauvillain, communication personnelle).

- Il est possible que chez le Cobaye la structure de la galanine coexprimée avec le GnRH soit différente et non détectable avec l'anticorps utilisé. Cette hypothèse paraît cependant peu probable.

## 5-2.2. Noyau paraventriculaire:

Dans le noyau paraventriculaire, le marquage observé semble souvent moins intense chez le Cobaye que chez le Rat (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Melander et coll., 1986a ; Meister et coll., 1989).

La baisse d'intensité est surtout remarquable dans les magnocellules. Nos observations du noyau paraventriculaire sont d'ailleurs cohérentes avec le marquage très faible observé dans la zone interne de l'éminence médiane de Cobaye. Par contre, les neurones parvocellulaires semblent plus visibles. Chez le Rat, il a été montré que ces cellules à galanine de la

subdivision parvocellulaire se projettent dans l'éminence médiane externe (Merchenthaler et coll., 1991b).

### 5-2.3. Noyau arqué:

Chez le Cobaye, un grand nombre de cellules est détectable dans le noyau arqué essentiellement dans la partie ventrolatérale. Le marquage obtenu est comparable à celui observé chez le Rat (Ch'ng et coll., 1985; Skofitsch et Jacobowitz, 1985; Melander et coll., 1986).

Compte tenu de la localisation des cellules immunopositives à la galanine chez le Cobaye, il paraissait vraisemblable qu'une grande partie des cellules à galanine correspondent à des cellules à GRF, comme cela a été démontré antérieurement chez le Rat (Meister et coll., 1989).

En fait, la comparaison sur coupes sériées, permet de constater que des cellules contiennent les deux neuropeptides. Une superposition plus précise par double marquage sur une même coupe n'a pas pu être réalisée faute d'anticorps disponibles pour ce type de méthodologie.

Par conséquent, la proportion des cellules coexprimant les deux peptides n'a pas pu être déterminée mais il est vraisemblable, compte-tenu du marquage observé dans la zone externe de l'éminence médiane, qu'un pourcentage très important de cellules à GRF coexprime la galanine.

Chez le Rat, il a été montré que la majorité des cellules à galanine de la portion ventrolatérale du noyau arqué, qui correspondent pour la plupart à des cellules à GRF, envoient leurs projections vers la zone externe de l'éminence médiane (Niimi et coll., 1990 ; Merchenthaler et coll., 1991b).

Dans l'éminence médiane de Cobaye, une comparaison de la distribution de la galanine et du GRF réalisée sur coupes sériées (l'anti-galanine et l'anti-GRF étant fabriqués chez le Lapin) s'est révélée impossible comptetenu de la taille des terminaisons nerveuses et de l'épaisseur des coupes.

Quelques cellules du noyau arqué médio-dorsal sont également galaninepositives. La localisation de ces cellules laissent à penser qu'elles pourraient être des cellules à Dopamine.

### 5-2.4. Eminence médiane:

Chez le Cobaye, la distribution de la galanine dans la zone externe de l'éminence médiane est semblable à celle qui a été observée chez le Rat (Rökaeus et coll., 1984 ; Skofitsch et Jacobowitz, 1985, 1986 ; Melander et coll., 1986). Cette localisation de la galanine au contact des capillaires suggère un rôle neurohormonal. Chez le Cobaye, ceci n'a pas été montré, mais chez le Rat, il a pu être détecté une concentration de galanine dans le sang porte supérieure à celle du sang périphérique (Lopez et coll., 1991).

Compte tenu des résultats précédents, cette galanine peut donc être localisée dans les terminaisons nerveuses provenant essentiellement des neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire ainsi que des neurones à GRF et à Dopamine du noyau arqué. Cependant, il paraît vraisemblable que la majorité corresponde à des terminaisons contenant également du GRF.

## 5-3. Distribution comparative du peptide et de ses récepteurs: Comparaison inter-espèce

La comparaison des études de détection immunocytochimiques de la galanine et radioautographique de ses récepteurs met en évidence une bonne corrélation des données, dans l'hypothalamus du Cobaye.

- Dans l'aire préoptique, la liaison de la <sup>125</sup>I-galanine est modérée et ceci correspond également à un taux modéré de cellules et de terminaisons nerveuses à galanine.

Cette situation correspond sensiblement aux données obtenues chez le Rat (Merchenthaler et coll., 1993).

- Dans le **noyau paraventriculaire**, un marquage relativement élevé des sites de liaison est détectable dans des zones où l'on observe à la fois des péricaryons à galanine et des fibres immunopositives.

Cette situation est assez comparable à celle observée chez le Rat (Merchenthaler et coll., 1993).

- Le **noyau arqué** contient une densité de sites de liaison modérée. Par contre, l'immunoréactivité à la galanine est élevée.

Des observations identiques ont été réalisées chez le Rat (Merchenthaler et coll., 1993).

- Dans l'éminence médiane, un taux de sites de liaison modéré a été enregistré. Cependant, une grande densité de fibres et de terminaisons nerveuses à galanine est apparente.

Cependant chez le Rat, si les études immunocytochimiques concordent pour démontrer l'existence de densités élevées de fibres et terminaisons nerveuses à galanine, l'existence de récepteurs est controversée. En effet, certains auteurs ne visualisent que peu ou pas de sites de liaison dans l'éminence médiane (Skofitsch et coll., 1986 ; Bonnefond et coll., 1990) alors que d'autres détectent des densités importantes de récepteurs à ce niveau (Melander et coll., 1986b, 1988 ; Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992).

### 5-4. Implications fonctionnelles

# 5-4.1. Effets comportementaux: Stimulation de la prise alimentaire:

Ce travail a permis de mettre en évidence chez le Cobaye l'existence de récepteurs et de cellules et fibres à galanine dans le noyau paraventriculaire et plus particulièrement dans la subdivision parvocellulaire.

Chez le Rat, des études ont montré que des injections *in vivo* de galanine, réalisées spécifiquement dans la subdivision parvocellulaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus du Rat adulte, induisent une forte stimulation de la prise alimentaire (Kyrkouli et coll., 1986, 1990) et plus particulièrement de lipides (Tempel et coll., 1988). De plus, il a été récemment rapporté que les taux de galanine sont élevés chez des rats génétiquement obèses et que la prise alimentaire peut être bloquée par un antagoniste de la galanine (Leibowitz et coll., 1992).

D'autre part, des travaux ont établi que la galanine injectée dans le cerveau diminue la sécrétion d'insuline (Tempel et Leibowitz, 1990b).

Au vu de ces données, il est possible que la galanine intervienne dans la régulation des stocks énergétiques et de la balance calorique chez le Cobaye comme chez le Rat adulte.

## 5-4.2. Rôle de la galanine dans la régulation de la sécrétion des hormones gonadotropes:

Chez le Cobaye, nous avons montré que l'aire préoptique et l'éminence médiane contiennent à la fois des récepteurs et des structures immunopositives à galanine. Notre travail n'a pas permis d'établir de coexistence galanine-GnRH dans ces régions. Cependant, l'existence d'afférences galaninergiques aux cellules à GnRH a été mise en évidence dans l'aire préoptique, ce qui signifie qu'il peut y avoir une modulation des péricaryons à GnRH par la galanine. Ceci est intéressant car par ailleurs on sait que des neurones à galanine possèdent des récepteurs aux stéroïdes sexuels (revue dans Merchenthaler et coll., 1993).

Pour ce qui est de l'éminence médiane, rien ne nous indique que chez le Cobaye, la galanine observée dans les terminaisons nerveuses puisse avoir une action sur l'axe gonadotrope. Cependant, chez le Rat, de nombreux travaux (revue dans Merchenthaler et coll., 1993) concordent pour dire que (1) la galanine de l'éminence médiane intervient sur la libération de GnRH par une action locale (2) que de la galanine est aussi libérée dans le sang porte et peut potentialiser l'action du GnRH sur les cellules gonadotropes (Lopez et coll., 1991b).

Chez le Cobaye, la visualisation de récepteurs dans l'éminence médiane est en faveur de l'existence d'une action locale mais rien ne nous permet d'affirmer qu'elle module effectivement la libération de gonadolibérine.

## 5-4.3. Rôle de la galanine dans la régulation de la sécrétion de la prolactine:

L'observation de neurones à galanine appartenant au tractus infundibulaire dopaminergique suggère que la galanine pourrait intervenir sur la régulation de la prolactine.

De fait, l'effet de ce peptide a été montré chez le Rat. Il peut s'exercer au niveau hypothalamique (Ottlecz et coll., 1988) mais aussi au niveau hypophysaire (Guérineau et coll., 1990).

## 5-4.4. Rôle de la galanine dans la régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance:

Chez le Rat, il ne fait aucun doute que la galanine a une action stimulante sur l'hormone de croissance. Des travaux ont montré qu'une grande partie des actions de la galanine se faisait à un niveau hypothalamique et notamment au niveau de l'éminence médiane (revue dans Merchenthaler et coll., 1993). En fait, les modulations de la galanine semblent s'exercer directement sur les cellules à GRF mais aussi sur tous les systèmes qui régulent la libération de GRF. En particulier les cellules à somatostatine périventriculaires reçoivent des afférences à galanine provenant du noyau arqué (Fodor et coll., 1993).

Chez le Cobaye, l'existence de récepteurs dans la zone externe de l'éminence médiane laisse à penser qu'une action locale de la galanine peut s'exercer en vue de moduler la libération de GRF.

Cette étude a permis de corréler la distribution de la galanine à celle de ses récepteurs dans l'hypothalamus de Cobaye. La comparaison de ces données avec la distribution du GnRH et du GRF montre que la galanine hypothalamique peut être considérée comme un régulateur des fonctions neuroendocrines. Ces données soulignent l'importance de la galanine localisée dans l'éminence médiane qui pourrait avoir une action directe sur l'hypophyse ou un rôle local discuté dans la dernière partie de ce travail.

## <u>6 - Localisation ultrastructurale des récepteurs</u> <u>de la galanine dans l'éminence médiane:</u> <u>Etude comparative chez le Cobaye et le Rat</u>

### 6-1. Considérations méthodologiques:

La visualisation à l'échelle photonique de sites de liaison de la galanine dans l'hypothalamus médio-basal et en particulier dans l'éminence médiane nous a amené à effectuer une étude à l'échelle ultrastructurale afin de savoir exactement où étaient localisés les sites de liaison de ce peptide.

La technique de détection *in vitro* de récepteurs par liaison de radioligand sur coupes de tissus légèrement préfixés a été adaptée antérieurement pour d'autres récepteurs neuropeptidergiques (Hamel et Beaudet, 1987; Dana et coll., 1989; Szigethy et coll., 1990; Beauvillain et coll., 1992).

Dans un premier temps, nous avons recherché le fixateur le plus approprié pour réaliser notre étude. Cette préfixation est réalisée par immersion dans le fixateur froid ce qui permet une meilleure préservation de la morphologie de l'éminence médiane que celle obtenue par perfusion intracardiaque.

Le mode de fixation qui nous est apparu le plus adapté à la fois pour conserver une bonne liaison spécifique et pour garder une préservation ultrastructurale correcte est identique à celui utilisé pour l'étude des récepteurs opioïdes de type  $\mu$  (Hamel et Beaudet, 1987 ; Beauvillain et coll., 1992).

Dans cette étude, le marquage non-spécifique détecté en présence de galanine froide est négligeable quelles que soient les conditions.

Les expériences ont été envisagées ches les deux espèces en absence et en présence de  $Mg^{2+}/GTP$  pour permettre de mettre en évidence une éventuelle influence des guanylnucléotides sur la localisation des sites de liaison de la galanine.

Comme démontré antérieurement par radioautographie quantitative, l'apport de  $Mg^{2+}/GTP$  induit une augmentation du pourcentage de liaison spécifique:

- Chez le Cobaye, la liaison spécifique, déterminée à partir des coupes semi-fines, équivaut à 72% de la liaison totale dans les conditions standard d'incubation et représente 88,5% en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP. La liaison spécifique est par conséquent augmentée d'un facteur de 1,2 en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP.

- Chez le Rat, la comparaison des deux techniques de liaison conduit à des observations identiques. Néanmoins, le pourcentage de liaison spécifique, représentant 81% de la liaison totale dans les conditions standard est plus élevé chez le Rat que chez le Cobaye. Par contre, en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP, le signal spécifique correspond à 89% de la liaison totale et avoisine alors celui déterminé chez le Cobaye. La liaison spécifique est multipliée par 1,1 en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP chez le Rat.

La comparaison des liaisons spécifiques déterminées dans les conditions standard chez le Cobaye et chez le Rat indique une liaison plus élevée chez le Rat. Cette observation pourrait être expliquée par une occupation plus importante des sites et/ou une dissociabilité plus lente de la galanine endogène chez le Cobaye. Par ailleurs, l'affinité des récepteurs pour la 125I-galanine n'est pas tout à fait identique pour les deux espèces, les expériences ayant été menées avec une concentration identique de ligand. Cependant, la liaison spécifique déterminée en présence de Mg<sup>2+</sup>/GTP est équivalente pour les deux espèces. Il est probable que sous ces conditions, on induise un démasquage identique des sites et ainsi une accessibilité semblable de la 125I-galanine aux récepteurs.

A l'échelle de la microscopie électronique, la présence de sites de liaison de la 125I-galanine se manifeste par des tortillons d'argent de taille relativement importante (0,4 à 0,5 µm) par rapport aux structures sousjacentes. Afin d'évaluer objectivement les différentes localisations du marquage nous avons procédé à l'examen de tous les grains photographiés conformément à la méthode de Blackett et Parry (1977) modifiée par Hamel et Beaudet (1984) et les résultats ont été exprimés en terme de pourcentage de grains spécifiques.

La radioautographie haute-résolution a permis de montrer que des sites de liaison spécifiques sont présents dans la zone externe de l'éminence médiane de Cobaye et de Rat et leur distribution a été établie. Ces sites sont détectés essentiellement au niveau d'appositions membranaires (grains partagés) et de compartiments intracellulaires (grains exclusifs) de terminaisons nerveuses et de tanycytes.

Quelles que soient les conditions, les grains localisés au niveau de structures qui diffèrent des terminaisons nerveuses et des tanycytes correspondent à des populations mineures de sites dont la répartition se rapproche étroitement de la distribution aléatoire. En conséquence, nous nous permettons donc d'écarter cette population de sites qui peut être considérée comme négligeable.

La faible variabilité du nombre de sites de liaison dans l'ensemble de nos expériences pour chaque espèce est vraisemblablement liée au fait que nous avons étudié des animaux mâles de même poids et de même âge.

### 6-2. Localisation des récepteurs de la galanine:

Au niveau ultrastructural, les récepteurs de la galanine apparaissent essentiellement au niveau d'appositions membranaires dans la zone externe de l'éminence médiane des deux espèces.

Chez le Cobaye, l'enrichissement de la liaison pour les grains localisés sur des appositions membranaires est de 2, alors que l'index de marquage pour les grains distribués à l'intérieur de compartiments cellulaires est de 0,25. Cette donnée indique que les sites de liaison de la galanine sont localisés en majorité au niveau de membranes plasmiques.

Cependant les sites de liaison spécifiques intracellulaires ont probablement une importance significative puisqu'ils représentent 14,4% du marquage. Ils pourraient vraisemblablement correspondre à des récepteurs synthétisés *de novo* en voie d'externalisation et/ou à des récepteurs de la galanine internalisés. Il est à noter que 4,4% de ces grains sont situés à l'intérieur de terminaisons nerveuses et 6,9% à l'intérieur de tanycytes.

Les sites de liaison localisés au niveau d'appositions membranaires sont visualisés principalement sur deux types d'appositions: entre terminaisons nerveuses (44,6%) et entre terminaison nerveuse et tanycyte (34,6%).

Néanmoins, cette technique d'étude ne permet pas de déterminer dans ces appositions, laquelle des deux membranes contient le site de liaison. Par conséquent, on peut être certain que les membranes des terminaisons nerveuses présentent des récepteurs, mais on ne peut pas affirmer que les membranes des tanycytes en possèdent.

Chez le Rat, l'ensemble des données rejoint les observations réalisées chez le Cobaye. L'enrichissement pour les grains localisés au niveau d'appositions membranaires est de 2, et l'index de marquage pour les grains intracellulaires est de 0,25. Les sites de liaison intracellulaires correspondent à 16,3% des sites spécifiquement exprimés et sont répartis en 10,2% dans des terminaisons nerveuses et pour 3,0% à l'intérieur de tanycytes. Par comparaison avec le Cobaye, il apparaît ici une densité de grains nettement plus élevée dans les terminaisons nerveuses, alors que le pourcentage de grains localisés dans les tanycytes est plus faible. Il est donc possible que cette localisation ait une signification fonctionnelle propre à l'espèce.

Les grains localisés sur des appositions membranaires sont distribués comme chez le Cobaye essentiellement sur deux types d'appositions membranaires: entre terminaisons nerveuses (36,4%) et entre terminaison nerveuse et tanycyte (37,5%). La différence entre ces deux types de localisations membranaires est moins étendue que chez le Cobaye.

## 6-3. Influence des guanylnucléotides:

Chez les deux espèces étudiées, le  $Mg^{2+}/GTP$  a eu pour effet d'augmenter le pourcentage de sites (1) sur les appositions membranaires entre terminaisons nerveuses et (2) à l'intérieur des terminaisons nerveuses. Parallèlement, une diminution du nombre de grains sur les appositions impliquant les tanycytes ou à l'intérieur des tanycytes a été observée.

Ceci suggère que l'addition de  $Mg^{2+}/GTP$  provoque d'une part un démasquage des sites localisés sur les terminaisons nerveuses et d'autre part une activation du transport axonique des récepteurs et/ou une internalisation des récepteurs de la galanine. Par contre, ce phénomène ne semble pas affecter les tanycytes.

Ces différences de distribution induites par les guanylnucléotides semblent constituer des arguments en faveur d'une localisation des récepteurs de la galanine essentiellement au niveau des terminaisons nerveuses. Cependant la liaison spécifique pour la détection sur les tanycytes reste significative. Nos résultats suggèrent par conséquent qu'il peut y avoir des récepteurs de la galanine au niveau des tanycytes, mais vraisemblablement en nombre très réduit.

### 6-4. Implications fonctionnelles:

En conséquence, il est probable que les actions médiées par la galanine dans l'éminence médiane soient exercées en partie via des sites de liaison localisés sur les membranes de certaines terminaisons nerveuses.

L'éminence médiane est totalement dépourvue de synapses au sens propre du terme. Nos observations constituent donc un argument important en faveur de l'existence d'une action locale de type paracrine et/ou autocrine par la galanine dans l'éminence médiane du Cobaye et du Rat.

L'observation des microradioautographies permet de penser que plusieurs types de terminaisons nerveuses possèdent ces récepteurs puisque des granules de sécrétion de tailles différentes ont pu être observés à l'intérieur de terminaisons possédant les sites de liaison. Une étude précise de la nature de ces terminaisons nerveuses devrait permettre d'établir et/ou de confirmer l'existence d'un effet local de la galanine sur plusieurs systèmes hypophysiotropes: GRF, GnRH, Dopamine... chez les deux espèces Cobaye et Rat.

Une action locale est vraisemblablement médiée par la galanine au niveau des tanycytes. Le rôle des tanycytes dans la régulation des sécrétions des neurohormones est effectivement souvent envisagée (Everitt et coll., 1986; Beauvillain et coll., 1992): ils pourraient notamment s'insinuer entre les terminaisons nerveuses et moduler le passage des neurohormones dans le sang porte.

Nos résultats permettent d'établir une similitude de localisation des récepteurs de la galanine dans la zone externe de l'éminence médiane chez le Cobaye et chez le Rat.

La présence de récepteurs de la galanine sur des appositions membranaires entre des terminaisons nerveuses dans cette région est en faveur d'une modulation locale par la galanine de la libération de facteurs hypophysiotropes (GRF, GnRH, Dopamine...). Une action locale de la galanine sur les tanycytes est également possible.

## CONCLUSION

Depuis sa découverte en 1983, la galanine est apparue comme un neuropeptide largement distribué dans le système nerveux central. Cependant de nombreux résultats controversés n'ont pas permis d'établir la signification physiologique de la galanine centrale.

Notre travail a été envisagé chez le Cobaye pour permettre de progresser dans ce domaine. L'essentiel de cette étude morphologique s'est intéressé plus spécialement aux récepteurs de la galanine.

La distribution des récepteurs de la galanine dans le cerveau de Cobaye et leur sensibilité potentielle aux guanylnucléotides, étudiées *in vitro* par macroradioautographie quantitative avec la <sup>125</sup>I-galanine, démontrent l'**existence de récepteurs de la galanine sensibles aux** guanylnucléotides dans le système nerveux central de Cobaye. Comme chez les autres espèces, nous avons caractérisé une classe de sites de haute affinité et de capacité voisine de celles des autres récepteurs peptidergiques du système nerveux central. Par ailleurs, certaines de nos observations pourraient suggérer l'existence d'une seconde classe de sites.

Les récepteurs de la galanine détectés *in vitro* sur coupes de tissu non fixés apparaissent largement distribués dans le cerveau de Cobaye. Les régions présentant une plus grande concentration de sites sont situées dans le télencéphale et le diencéphale. Des **différences inter-espèces** sont **appréciables** notamment dans le cortex, la région hippocampique et l'hypophyse. Aucun travail n'avait permis jusqu'ici de mettre en évidence l'existence de récepteurs dans l'hypophyse avec la <sup>125</sup>I-galanine. Le Cobaye pourrait donc constituer un **modèle** expérimental **déterminant** pour la compréhension des fonctions de la **galanine hypophysaire** comme pour la neuropharmacologie.

L'utilisation d'une technique de désaturation par apport de  $Mg^{2+}/GTP$ induit des effets inverses sur la liaison selon les régions chez le Cobaye: inhibiteurs (amygdale, hippocampe, noyaux mamillaires) et stimulateurs (zone incerta, éminence médiane, noyau arqué). Ces résultats, interprétés en terme d'interférence de liaison avec la galanine endogène et/ou en terme d'hétérogénéité régionale de nature, ou de couplage différentiel des protéines G aux récepteurs de la galanine, démontrent le couplage des récepteurs de la galanine à un système de transduction membranaire impliquant une ou plusieurs protéines G chez le Cobaye. L'étude immunocytochimique développée dans l'hypothalamus de Cobaye a permis de corréler la distribution de la galanine à celle de ses récepteurs.

Nos observations ne sont pas incompatibles avec un effet comportemental de la galanine hypothalamique sur la stimulation de la prise alimentaire et suggèrent surtout que le peptide pourrait intervenir dans la régulation de fonctions neuroendocrines. Ces données soulignent l'importance de la galanine dans l'éminence médiane où une grande densité de terminaisons nerveuses est présente dans la zone externe. La galanine pourrait donc être libérée dans les vaisseaux portes et avoir une action directe sur l'hypophyse ou agir localement.

La méthode de détection par radioautographie de haute résolution que nous avons utilisée pour l'étude de l'éminence médiane démontre que les sites de liaison de la galanine sont présents essentiellement sur des appositions membranaires dans la zone externe de l'éminence médiane chez le Cobaye et chez le Rat. Une localisation apparaît également à l'intérieur de terminaisons nerveuses et de tanycytes.

L'utilisation de la technique de désaturation, en présence de  $Mg^{2+}/GTP$ , fait apparaître une augmentation du pourcentage de sites spécifiquement localisés au niveau d'appositions membranaires entre terminaisons nerveuses et à l'intérieur des terminaisons nerveuses.

La présence de récepteurs de la galanine sur des appositions membranaires entre des terminaisons nerveuses constitue un argument important en faveur d'une modulation locale par la galanine de la libération de facteurs hypophysiotropes (GRF, LHRH, dopamine...). Une action locale de la galanine sur les tanycytes est également vraisemblable.

La poursuite logique de ce travail devrait permettre de déterminer précisément la nature des terminaisons nerveuses possédant des sites de liaison de la galanine et ainsi les systèmes hypophysiotropes modulés par la galanine. Le rôle de la galanine localisée au niveau des tanycytes demande aussi à être étudié. BIBLIOGRAPHIE

Ahrén B., Arkhammar P., Berggren P.-O. and Nilsson T., Galanin inhibits glucose-stimulated insulin release by a mechanism involving hyperpolarization and lowering of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140 (1986) 1059-1063.

Amiranoff B., Servin A.L., Rouyer-Fessard C., Couvineau A., Tatemoto K. and Laburthe M., Galanin receptors in a hamster pancreatic  $\beta$ -cell tumor: identification and molecular characterization, *Endocrinology*, 121 (1987) 284-289.

Amiranoff B., Lorinet A.-M., Lagny-Pourmir I. and Laburthe M., Mechanism of galanin-inhibited insulin release- Occurrence of a pertussis-toxinsensitive inhibition of adenylate cyclase, *Eur.J.Biochem.*, 177 (1988) 147-152.

Amiranoff B., Lorinet A.-M. and Laburthe M., Galanin receptor in the rat pancreatic  $\beta$  cell line rin m 5F, *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1989a) 20714-20717.

Amiranoff B., Lorinet A.-M., Yanaihara N. and Laburthe M., Structural requirement for galanin action in the pancreatic  $\beta$  cell line Rin m 5F, *European Journal of Pharmacology*, 163 (1989b) 205-207.

Amiranoff B., Lorinet A.-M. and Laburthe M., A clonal rat pancreatic  $\delta$  cell line (Rin14B) expresses a high number of galanin receptors negatively coupled to a pertussis-toxin-sensitive cAMP-production pathway, *Eur. J. Biochem.*, 195 (1991) 459-463.

Amiranoff B., Chen Y.H., Lorinet A.-M., Couvineau A. and Laburthe M., Galanin receptor in endocrine pancreas and brain: functional and molecular characterization, *Biomedical Research*, 13 S2 (1992) 319-323.

Arai R. and Calas A., Ultrastructural localization of galanin immunoreactivity in the rat median eminence, *Brain Research*, 562 (1991) 339-343.

Arrang J.M., Gulat-Marnay C., Defontaine N. and Schwartz J.C., Regulation of histamine release in rat hypothalamus and hippocampus by presynaptic galanin receptors, *Peptides*, 12 (1991) 1113-1117.

Arvidsson U., Ulfhake B., Cullheim S., Bergstrand A., Theodorsson E. and Hökfelt T., Distribution of <sup>125</sup>I-galanin binding sites, immunoreactive galanin, and its coexistence with 5-hydroxytryptamine in the cat spinal cord: biochemical, histochemical, and experimental studies at the light and electron microscopic level, *The Journal of Comparative Neurology*, 308 (1991) 115-138.

Austin M.C., Cottingham S.L., Paul S.M. and Crawley J.N., Tyrosine hydroxylase and galanin m RNA levels in locus coeruleus neurons are increased following reserpine administration, *Synapse*, 6 (1990) 351-357.

**Barry J., Dubois M.P. and Poulain P.**, LRF-producing cells of mammalian hypothalamus: a fluorescent antibody study, Z. Zellforsch, 146 (1973a) 351-366.

Barry J., Dubois M.P., Poulain P. and Leonardelli J., Caractérisation et topographie des neurones hypothalamiques de la région tubéro-infundibulaire chez le cobaye mâle normal ou castré, C.R. Acad Sci. Paris, 266 (1973b) 15-18.

**Barry J., Dubois M.P., Carette B.**, Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway in the normal, castrated or testosterone treated male guinea pig, *Endocrinology*, 95 (1974) 1416.

Bartfai T., Iverfeldt K. and Fisone G., Regulation of the release of coexisting neurotransmitters, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 28 (1988) 285-310.

Bartfai T., Fisone G. and Langel U, Galanin and galanin antagonists: molecular and biochemical perspectives, *TiPS*, 13 (1992) 312-317.

Bauer F.E., Adrian T.E., Christophides N.D., Ferri G-L., Yanaihara N., Polak J.M. and Bloom S.R., Distribution and molecular heterogeneity of galanin in human, pig, guinea pig, and rat gastrointestinal tracts, *Gastroenterology*, 91 (1986a) 877-883.

Bauer F.E., Christophides N.D., Hacker G.W., Blank M.A., Polak J.M. and Bloom S.R., Distribution of galanin immunoreactivity in the genitourinary tract of man and rat, *Peptides*, 7 (1986b) 5-10.

Bauer F.E., Venetikou M., Burrin J.M., Ginsberg L., MacKay D.J. and Bloom S.R., Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide, *The Lancet*, 2 (1986c) 192-195.

Beal M.F., Gabriel S.M., Swartz K.J. and McGarvey U.M., Distribution of galanin-like immunoreactivity in baboon brain, *Peptides*, 9 (1988) 847-851.

Beal M.F., MacGarvey U. and Swartz K.J., Galanin immunoreactivity is increased in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, Annals of Neurology, 28 (1990a) 157-161.

**Beal M.F.**, Galanin in the primate CNS and dementing neurologic diseases, dans Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system, T. Hökfelt, T. Bartfai, D. Jacobowitz, D. Ottoson, eds, MacMillan Press, (1990b) 407-417.

**Beauvillain J.C. and Tramu G.**, Immunocytochemical demonstration of LH-RH, somatostatin, and ACTH-like peptide in Osmium-postfixed, resin-embedded median eminence, *J. of Histochem. Cytochem.*, 28 (1980) 1014-1017.

Beauvillain J.C., Tramu G. and Mazzuca M., Fine structural studies of Growth-Hormone-Releasing-Factor (GRF)-immunoreactive neurons and their synaptic connections in the guinea pig arcuate nucleus, *J. Comp. Neurol.*, 255 (1987) 110-123.

Beauvillain J.C., Moyse E., Dutriez I., Mitchell V., Poulain P. and Mazzuca M., Localisation of mu opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanycytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography, *Neuroscience*, 49 (1992) 925-936.

Ben Ari Y. and Ladzunski M., Galanin protects hippocampal neurons from the functional effects of anoxia, *European Journal of Pharmacology*, 165 (1989) 331-332.

**Ben Ari Y.**, Galanin and gibenclamide modulate the anoxic release of glutamate in rat CA3 hippocampal neurons, *European Journal of Neuroscience*, 2 (1990) 62-68.

Bersani M., Johnsen A.H., Hojrup P., Dunning B.E., Andreasen J.J. and Holst J.J., Human galanin: primary structure and identification of two molecular forms, *FEBS Letters*, 283 (1991) 189-194.

Bertherat J., Slama A., Kordon C., Videau C. and Epelbaum J., Characterization of pericellular [<sup>125</sup>I]TyrO DTrp8 somatostatin binding sites in the rat arcuate nucleus by a newly developed method: quantitative highresolution light microscopic radioautography, *Neuroscience*, 41 (1991) 571-579.

Birnbaumer L., Codina J., Mattera R., Cerione R.A., Hildebrandt J.D., Sunyer T., Rojas F.J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. and Iyengar R., Regulation of hormone receptors and adenylyl cyclases by guanyl nucleotide binding N proteins, *Recent Progress in Hormone Research*, 41 (1985) 41-99.

**Blackett N.M. and Parry D.M.**, A simplified method of "hypothetical grain" analysis of electron microscope autoradiographs, *J. Histochem. Neurochem.*, 25 (1977) 206-214.

Block G.J., Eckersell C. and Mills R., Distribution of galanin-immunoreactive cells within sexually dimorphic components of the medial preoptic area of the male and female rat, *Brain Research*, 620 (1993) 259-268.

**Bolton A.E. and Hunter W.M.**, The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a 125I-containing acylating agent - Application to the radioimmunoassay, *Biochemical Journal*, 133 (1973) 529-539.

**Bonnefond C., Palacios J.M., Probst A. and Mengod G.**, Distribution of galanin mRNA containing cells and galanin receptor binding sites in human and rat hypothalamus, *European Journal of Neuroscience*, 2 (1990) 629-637.

Bretherton-Watt D., Kenny M.J., Ghatei M.A. and Bloom S.R., The distribution of galanin message-associated peptide-like immunoreactivity in the pig, *Regulatory Peptides*, 27 (1990) 307-315.

#### C

Cascieri M.A. and Liang T., Characterization of the substance P receptor in rat brain cortex membranes and the inhibition of radioligand binding by guanine nucleotides, *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (1983) 5158-5164.

Ceccatelli S., Eriksson M. and Hökfelt T., Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus, *Neuroendocrinology*, 49 (1989) 309-323.

Cella S.G., Locatelli V., De Gennaro V., Bondiolotti G.P., Pintor C., Loche S., Provezza M. and Müller E.E., Epinephrine mediates the growth hormonereleasing effect of galanin in infant rats, *Endocrinology*, 122 (1988) 855-859.

Ch'ng J.L.C., Christophides N.D., Anand P., Gibson S.J., Allen Y.S., Su H.C., Tatemoto K., Morrison J.F.B., Polak J.M. and Bloom S.R., Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the responses of galanin-containing neuronal pathways to injury, *Neuroscience*, 16 (1985) 343-354.

**Chan-Palay V.**, Galanine hyperinnervates surviving neurons of the human basal nucleus of Meynert in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease: a hypothesis for the role of galanin in accentuating cholinergic dysfunction in dementia, *The Journal of Comparative Neurology*, 273 (1988a) 543-557.

**Chan-Palay V.**, Neurons with galanin innervate cholinergic cells in the human basal forebrain and galanin and acetylcholine coexist, *Brain Research Bulletin*, 21 (1988b) 465-472.

Chang K.-J., Blanchard S.G. and Cuatrecasas P., Unmasking of magnesiumdependent high-affinity binding sites for [DAla<sup>2</sup>, DLeu<sup>5</sup>] enkephalin after pretreatment of brain membranes with guanine nucleotides, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 80 (1983) 940-944.

Chen Y., Couvineau A., Laburthe M. and Amiranoff B., Solubilization and molecular characterization of active galanin receptors from rat brain, *Biochemistry*, 31 (1992) 2415-2422.

Chen Y., Fournier A., Couvineau A., Laburthe M. and Amiranoff B., Purification of a galanin receptor from pig brain, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 90 (1993) 3845-3849.

Cheung A. and Hall T.R., Direct stimulation of growth hormone secretion by galanin in the Domestic Fowl, *Journal of Neuroendocrinology*, 2 (1990) 285-289.

Consolo S., Bertorelli R., La Porta C., Palazzi E., Zambelli M., Fisone G. and Bartfai T., Galanin regulation of acetylcholine realease and carbacholstimulated phosphoinositide turnover in rat ventral hippocampus, dans Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system, T. Hökfelt, T. Bartfai, D. Jacobowitz, D. Ottoson, eds, MacMillan Press, (1990a) 247-258.

Consolo S., Palazzi E., Bertorelli R., Fisone G., Crawley J., Hökfelt T. and Bartfai T., Functional aspects of acetylcholine-galanin coexistence in the brain, *Progress in Brain Research*, 84 (1990b) 279-287.

Consolo S., Bertorelli R., Girotti P., La Porta C., Bartfai T., Parenti M. and Zambelli M., Pertussis toxin-sensitive G-protein mediates galanin's inhibition of scopolamine-evoked acetylcholine release in vivo and carbachol-stimulated phosphoinositide turnover in rat ventral hippocampus, *Neuroscience Letters*, 126 (1991) 29-32.

Cormont M., Le Marchand-Brustel Y., Van Obberghen E., Spiegel A.M. and Sharp G.W.G., Identification of G protein a-subunits in RINm5F cells and their selective interaction with galanin receptor, *Diabetes*, 40 (1991) 1170-1176.

Crawley J.N. and Wenk G.L., Co-existence of galanin and acetylcholine: is galanin involved in memory processes and dementia?, *TINS*, 12 (1989) 278-282.

Crawley J.N., Coexistence of neuropeptides and "classical" neurotransmitters -Functional interactions between galanin and acetylcholine, *Annals New York Academy of Sciences*, 579 (1990) 233-245.

Crawley J.N., Austin M.C., Fiske S.M., Martin B., Consolo S., Berthold M., Langel U., Fisone G. and Bartfai T., Activity of centrally administred galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus, *The Journal of Neuroscience*, 10 (1990) 3695-3700.

Cridland R.A. and Henry J.L., Effects of intrathecal administration of neuropeptides on a spinal nociceptive reflex in the rat: VIP, galanin, CGRP, TRH, somatostatin and angiotensin II, *Neuropeptides*, 11 (1988) 23-32.

#### D

Dana C., Vial M., Leonard K., Beauregard A., Kitabgi P., Vincent J.P., Rostène W. and Beaudet A., Electron microscopic localization of neurotensin binding sites in the midbrain tegmentum of the rat: I. Ventral tegmental area and interfascicular nucleus, *Journal of Neuroscience*, 9 (1989) 2247-2257.

De Lean A., Stadel J.M. and Lefkowitz R.J., A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclasecoupled  $\beta$ -adrenergic receptor, *The Journal of Biochemical Chemistry*, 255 (1980) 7108-7117.

Delvaux M., Botella A., Fioramonti J., Frexinos J. and Bueno L., Galanin induces contraction of isolated cells from circular muscle layer of pig ileum, *Regulatory Peptides*, 32 (1991) 369-374.

**DeWeille J., Schmid-Antomarchi H., Fosset M. and Ladzunski M.**, ATPsensitive K<sup>+</sup> channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85 (1988) 1312-1316.

**Dubois-Dauphin M., Tribollet E. and Dreyfuss J.J.**, Distribution of neurohypophysial peptides in the guinea pig brain. I. An immunocytochemical study of the vasopressin-related glycopeptide, *Brain Research*, 495 (1989) 45-65.

**Dunne M.J., Bullett M.J., Li G., Wollheim C.B. and Petersen O.H.**, Galanin activates nucleotide-dependent K<sup>+</sup> channels in insulin-secreting cells via a pertussis toxin-sensitive G-protein, *The EMBO Journal*, 8 (1989) 413-420.

#### E

Ekblad E., Rökaeus A., Hakanson R. and Sundler F., Galanin nerve fibers in the rat gut: distribution, origin and projections, *Neuroscience*, 16 (1985) 355-363.

Evans H.F. and Shine J., Human galanin: molecular cloning reveals a unique structure, *Endocrinology*, 129 (1991) 1682-1684.

Everitt H.J., Meister B., Hokfelt T., Melander T., Terenius L., Rökaeus A., Theodorssson-Norheim E., Dockray G., Edwardson J., Cuello C., Elde R., Goldstein M., Hemmings M., Ouimet C., Walaas I., Greengard P., Vale W., Weber E., Wu J.Y. and Chang K.J., The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons, *Brain Research Reviews*, 11 (1986) 97-155.

#### F

Faris P.L., Komisaruk B.R., Watkins L.R. and Mayer D.J., Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia, *Science*, 219 (1983) 310-312.

**Fastbom J. and Fredholm B.B.**, Regional differences in the effect of guanine nucleotides on agonist and antagonist binding to adenosine A<sub>1</sub>-receptors in rat brain, as revealed by autoradiography, *Neuroscience*, 34 (1990) 759-769.

Fisone G., Wu C.F., Consolo S., Nordström O., Brynne N., Bartfai T., Melander T. and Hökfelt T., Galanin inhibits acetylcholine release in the ventral hippocampus of the rat: Histochemical, autoradiographic, *in vivo*, and *in vitro* studies, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 84 (1987) 7339-7343.

Fisone G., Langel U., Carlquist M., Bergman T., Consolo S., Hökfelt T., Undén A., Andell S. and Bartfai T., Galanin receptor and its ligands in the rat hippocampus, *European Journal of Biochemistry*, 181 (1989a) 269-276.

Fisone G., Berthold M., Bedecs K., Undén A., Bartfai T., Bertolli R., Consolo S., Crawley J., Martin B., Nilsson S. and Hökfelt T., N-terminal galanin-(1-16) fragment is an agonist at the hippocampal galanin receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86 (1989b) 9588-9591.

Fisone G., Bartfai T., Nilsson S. and Hökfelt T., Galanin inhibits the potassium-evoked release of acetylcholine and the muscarinic receptormediated stimulation of phosphoinositide turnover in slices of monkey hippocampus, *Brain Research*, 568 (1992) 279-284. Fodor M., Csaba Zs., Kordon C. and Epelbaum J., Intrahypothalamic neuropeptide-containing afferents to the periventricular nucleus of the rat, XXII Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale - Louvain, 8-10 Septembre 1993, résumé dans Annales d'Endocrinologie, 54 (1993) 21.

Fox J.E.T., Brooks B., McDonald T.J., Barnett W., Kostolanska F., Yanaihara C., Yanaihara N. and Rökaeus A., Actions of galanin fragments on rat, guinea-pig, and canine intestinal motility, *Peptides*, 9 (1988) 1183-1189.

Fuxe K., Hedlund P., Von Euler G., Lundgren K., Martire M., Ögren S.O., Eneroth P. and Agnati L.F., Galanin/5-HT interactions in the rat central nervous system. Relevance for depression, dans Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system, T. Hökfelt, T. Bartfai, D. Jacobowitz, D. Ottoson, eds, MacMillan Press, (1990) 221-235.

#### G

Gabriel S.M., MacGarvey U.M., Koenig J.I., Swartz K.J., Martin J.B. and Beal M.F., Characterization of galanin-like immunoreactivity in the rat brain: effects of neonatal glutamate treatment, *Neuroscience Letters*, 87 (1988) 114-126.

Gabriel S.M., Kaplan L.M., Martin J.B. and Koenig J.I., Tissue-specific sex differences in galanin-like immunoreactivity and galanin mRNA during development in the rat, *Peptides*, 10 (1989) 369-374.

Gabriel S.M., Koenig J.I. and Kaplan L.M., Galanin-like immunoreactivity is influenced by estrogen in peripubertal and adult rats, *Neuroendocrinology*, 51 (1990) 168-173.

Gai W.P., Geffen L.B. and Blessing W.W., Galanin immunoreactivite neurons in the human hypothalamus: colocalization with vasopressin-containing neurons, *The Journal of Comparative Neurology*, 298 (1990) 265-280.

Gaymann W. and Martin R., Immunoreactive galanin-like material in magnocellular hypothalamo-neurohypophysial neurones of the rat, *Cell Tissue Research*, 255 (1989) 139-147.

Gaymann W. and Falke N., Galanin lacks binding sites in the porcine pituitary and has no detectable effect on oxytocin and vasopressin release from rat neurosecretory endings, *Neuroscience Letters*, 112 (1990) 114-119.

Gentleman S.M., Falkai P., Bogerts B., Herrero M.T., Polak J.M. and Roberts G.W., Distribution of galanin-like immunoreactivity in the human brain, *Brain Research*, 505 (1989) 311-315.

Gilbey S.G., Stephenson J., O'Halloran D.J., Burrin J. and Bloom S.R., High-dose porcine galanin infusion and effect on intravenous glucose tolerance in humans, *Diabetes*, 38 (1989) 1114-1116.

Gilman A.G., G proteins: transducers of receptor-generated signals, Annuals Review of Biochemistry, 56 (1987) 615-649.
Giustina A., Schettino M., Bodini C., Doga M., Licini M. and Giustina G., Effect of galanin on the growth hormone response to growth hormone-realeasing hormone in acromegaly, *Metabolism*, 41 (1992) 1291-1294.

Gorski R.A., Critical role for the medial preoptic area in the sexual differentiation of the brain, *Progress in Brain Research*, 61 (1984) 129-146.

Guérineau N., Drouhault R., Corcuff J.B., Vacher A.M., Vilayleck N. and Mollard P., Galanin evokes a cytosolic calcium bursting mode and hormone release in GH3/B6 pituitary cells, *FEBS Letters*, 276 (1990) 111-114.

Gundlach A.L., Rutherfurd S.D. and Louis W.J., Increase in galanin and neuropeptide Y mRNA in locus coeruleus following acute reserpine treatment, *European Journal of Pharmacology*, 184 (1990) 163-167.

#### Η

Hamel E. and Beaudet A., Localization of opioid binding sites in rat brain by electron microscopic radiautography, *J. Electron Microsc. Tech.*, 1 (1984a) 317-329.

Hamel E. and Beaudet A., Electron microscopic autoradiographic localization of opioid receptors in rat neostriatum, *Nature*, 312 (1984b) 155-157.

Hamel E and Beaudet A., Opioid receptors in rat neostriatum: radioautographic distribution at the electron microscopic level, *Brain Research*, 401 (1987) 239-257.

Hedlund P., Von Euler G. and Fuxe K., Activation of 5-hydroxytryptamine1A receptors increases the affinity of galanin receptors in di- and telencephalic areas of the rat, *Brain Research*, 560 (1991) 251-259.

Holets V.R., Hökfelt T., Rökaeus A., Terenius L. and Goldstein M., Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin an their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus, *Neuroscience*, 24 (1988) 893-906.

Holmqvist B.I. and Ekström P., Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the Atlantic salmon (Salmo salar), The Journal of Comparative Neurology, 306 (1991) 361-381.

Holmqvist B.I. and Carlberg M., Galanin receptors in the brain of a teleost: Autoradiographic distribution of binding sites in the Atlantic Salmon, *The Journal of Comparative Neurology*, 326 (1992) 44-60.

Hooi S.C., Maiter D.M., Martin J.B. and Koenig J.I., Galaninergic mechanisms are involved in the regulation of corticotropin and thyrotropin secretion in the rat, *Endocrinology*, 127 (1990) 2281-2289.

Hsu D.W., El-Azouzi M., McL.Black P., Chin W.W., Hedley-Whyte E.T. and Kaplan L.M., Estrogen increases galanin immunoreactivity in hyperplastic prolactin-secreting cells in fisher 344 rats, *Endocrinology*, 126 (1990) 3159-3167.

Hulting A.L., Meister B., Carlsson L., Hilding A. and Isaksson O., On the role of the peptide galanin in regulation of growth hormone secretion, *Acta Endocrinologica*, 125 (1991) 518-525.

# I

**Iverfeld K., Ögren S.-O. and Bartfai T.**, Substance P receptors in the rat spinal cord: the effect of GTP and of chronic antidepressant treatment, *Acta Physiologica Scandinavica*, 132 (1988) 175-179.

# J

Jacobowitz D.M., Multifactorial control of pituitary hormone secretion: "The wheels" of the brain, *Synapse*, 2 (1988) 186-192.

Johard H.A.D., Lundquist C.T., Rökaeus A. and Nässel D.R., Autoradiographic localization of <sup>125</sup>I-galanin binding sites in the blowfly brain, *Regulatory Peptides*, 42 (1992) 123-134.

# Κ

Kaplan L.M., Gabriel S.M., Koenig J.I., Sunday M.E., Spindel E.R., Martin E.R., Martin J.B. and Chin W.W., Galanin is an estrogen-inductible, secretory product of the rat anterior pituitary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 7408-7412.

Köhler C., Ericson H., Watanabe T., Polak J., Palay S.L., Palay V. and Chan-Palay V., Galanin immunoreactivity in hypothalamic histamine neurons: further evidence for multiple chemical messengers in the tuberomammillary nucleus, *The Journal of Comparative Neurology*, 250 (1986) 58-64.

Köhler C., Hallman H, Melander T., Hökfelt T. and Norheim E., Autoradiographic mapping of galanin receptors in the monkey brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2 (1989a) 269-284.

Köhler C., Persson A., Melander T., Theodorsson E., Sedvall G. and Hökfelt T., Distribution of galanin-binding sites in the monkey and human telencephalon: preliminary observations, *Experimental Brain Research*, 75 (1989b) 375-380.

Köhler C. and Chan-Palay V., Galanin receptors in the post mortem human brain. Regional distribution of <sup>125</sup>I-galanin binding sites using the method of in vitro receptor autoradiography, *Neuroscience Letters*, 120 (1990) 179-182.

Kordower J.H. and Mufson E.J., Galanin-like immunoreactivity within the primate basal forebrain: differential staining patterns between humans and monkeys, *The Journal of Comparative Neurology*, 294 (1990) 281-292.

Kordower J.H., Le H.K. and Mufson E.J., Galanin immunoreactivity in the primate central nervous system, *The Journal of Comparative Neurology*, 319 (1992) 479-500.

Koshiyama H., Kato Y., Inoue T., Murakami Y., Ishikawa Y., Yanaihara N. and Imura H., Central galanin stimulates pituitary prolactin secretion in rats: possible involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide, *Neuroscience Letters*, 75 (1987) 49-54.

Kowal N.W. and Beal M.F., Galanin-like immunoreactivity is present in human substance innominata and in senile plaques in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 98 (1989) 118-123.

Kyrkouli S.E., Stanley B.G. and Leibowitz S.F., Galanin: Stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide, *European Journal of Pharmacology*, 122 (1986) 159-160.

Kyrkouli S.E., Stanley B.G., Hutchinson R., Seirafi R.D. and Leibowitz S.F., Peptide-amine interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus: analysis of galanin and neuropeptide Y in relation to feeding, *Brain Research*, 521 (1990a) 185-191.

Kyrkouli S.E., Stanley B.G., Seirafi R.D. and Leibowitz S.F., Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain, *Peptides*, 11 (1990b) 995-1001.

### L

Lagny-Pourmir I., Amiranoff B., Lorinet A.M., Tatemoto K. and Laburthe M., Characterization of galanin receptors in the insulin-secreting cell line Rin m 5F: evidence for coupling with a pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate regulatory protein, *Endocrinology*, 124 (1989a) 2635-2641.

Lagny-Pourmir I., Lorinet A.M., Yanaihara N. and Laburthe M., Structural requirements for galanin interaction with receptors from pancreatic beta cells and from brain tissue of the rat, *Peptides*, 10 (1989b) 757-761.

Lagny-Pourmir I. and Epelbaum J., Regional and inhibitory effects of guanine nucleotides on [125I]Galanin binding in rat brain: relationship with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin, *Neuroscience*, 49 (1992) 829-848.

Lagny-Pourmir I et Crépel F., [<sup>125</sup>I]galanin binding sites in the rat frontal lobe are guanine nucleotide-sensitive and display a low regional index of occupancy, *Neuroscience Letters*, 160 (1993) 29-32.

Land T., Langel U., Löw M., Berthold M., Undén A. and Bartfai T., Linear and cyclic N-terminal galanin fragments and analogs as ligands at the hypothalamic galanin receptor, *International Journal of Peptide and Protein Research*, 38 (1991a) 267-272. Land T., Langel U., Fisone G., Bedecs K. and Bartfai T., Assay for galanin receptor, *Methods in Neurosciences*, 5 (1991b) 225-234.

Landry M., Trembleau A., Arai R. and Calas A., Evidence for a colocalization of oxytocin mRNA and galanin in magnocellular hypothalamic neurons: a study combining in situ hybridization and immunohistochemistry, *Molecular Brain Research*, 10 (1991) 91-95.

Leibowitz S.F., Hypothalamic galanin in relation to feeding behavior and endocrine systems, dans Galanin: A new multifuncional peptide in the neuroendocrine system, T. Hökfelt, T. Bartfai, D. Jacobowitz, D. Ottoson, eds, MacMillan Press, (1991) 393-406.

Leibowitz S.F. and Kim T., Impact of a galanin antagonist on exogenous galanin and natural patterns of fat ingestion, *Brain Research*, 599 (1992) 148-152.

Leroux P., Quirion R. and Pelletier G., Localization and characterization of brain somatostatin receptors as studied with somatostatin-14 and somatostatin-28 receptor radioautography, *Brain Research*, 347 (1985) 74-84.

Leroux P., Gonzalez B.J., Laquerrière A., Bodenant C. and Vaudry H., Autoradiographic study of somatostatin receptors in the rat hypothalamus: validation of a GTP-induced desaturation procedure, *Neuroendocrinology*, 47 (1988) 533-544.

Levin M.C., Sawchenko P.E., Howe P.R.C., Bloom S.R. and Polak J.M., Organization of galanin-immunoreactive inputs to the paraventricular nucleus with special reference to their relationship to catecholaminergic afferents, *The Journal of Comparative Neurology*, 261 (1987) 562-582.

Lopez F.J. and Negro-Vilar A., Galanin stimulates luteinizing hormonereleasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments *in vitro*: involvement of an  $\alpha$ -adrenergic mechanism, *Endocrinology*, 127 (1990a) 2431-2436.

Lopez F.J., Meade E.H., JR and Negro-Vilar A., Development and characterization of a specific and sensitive radioimmunoassay for rat galanin: measurement in brain tissue, hypophyseal portal and peripheral serum, *Brain Research Bulletin*, 24 (1990b) 395-399.

Lopez F.J., Merchenthaler I., Ching M., Wisniewski M. and Negro-Vilar A., Galanin: a hypothalamic-hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 4508-4512.

Lundquist C.T., Rökaeus A. and Nässel D.R., Galanin immunoreactivity in the blowfly nervous system: localization and chromatographic analysis, *The Journal of Comparative Neurology*, 312 (1991) 77-96.

Maiter D.M., Hooi S.C., Koenig J.I. and Martin J.B., Galanin is a physiological regulator of spontaneous pulsatile secretion of growth hormone in the male rat, *Endocrinology*, 126 (1990) 1216-1222.

Mastropaolo J., Nadi N.S., Ostrowski N.L. and Crawley J.N., Galanin antagonizes acetylcholine on a memory task in basal forebrain-lesioned rats, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85 (1988) 9841-9845.

McDonald T.J., Dupre J., Tatemoto K., Greenberg G.R., Radziuk J and Mutt V., Galanin inhibits insulin secretion and induces hyperglycemia in dogs, *Diabetes*, 34 (1985) 192-196.

McKnight G.L., Karlsen A.E., Kowalyk S., Mathewes S.L., Sheppard P.O., O'Hara P.J. and Taborsky G.J., Sequence of human galanin and its inhibition of glucose-stimulated insulin secretion from RIN cells, *Diabetes*, 41 (1992) 82-87.

Meister B. and Hökfelt T., Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion, *Symapse*, 2 (1988) 585-605.

Meister B., Ceccatelli S., Hökfelt T., Andén N.-E., Andén M. and Theodorsson E., Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions, *Exp. Brain Res.*, 76 (1989) 343-368.

Meister B., Cortés R., Villar M.J., Schalling M. and Hökfelt T., Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli : comparison between messenger RNA and peptide / protein levels, *Cell Tissue Res.*, 260 (1990a) 279-297.

Meister B., Scanlon M.F. and Hökfelt T., Occurence of galanin-like immunoreactivity in growth hormone-releasing factor (GRF)-containing neurons of the monkey (*Macaca fascicularis*) infundibular nucleus and median eminence, *Neuroscience Letters*, 119 (1990b) 136-139.

Meister B., Villar M.J., Ceccatelli S. and Hökfelt T., Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations, *Neuroscience*, 37 (1990c) 603-633.

Melander T., Hökfelt T., Rökaeus A, Fahrenkrug J., Tatemoto K. and Mutt V., Distribution of galanin-like immunoreactivity in the gastro-intestinal tract of several mammalian species, *Cell Tissue Res.*, 239 (1985) 253-270.

Melander T., Hökfelt T., Rökaeus A., Cuello A.C., Oertel W.H., Verhofstad A. and Goldstein M., Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS, *Journal of Neuroscience*, 6 (1986) 3640-3654.

Melander T., Hökfelt T. and Rökaeus A., Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system, *The Journal of Comparative Neurology*, 248 (1986a) 475-517.

Melander T., Hökfelt T., Nilsson S. and Brodin E., Visualization of galanin binding sites in the rat central nervous system, *European Journal of Pharmacology*, 124 (1986b) 381-382.

Melander T. and Staines W.A., A galanin-like peptide coexists in putative cholinergic somata of the septum-basal forebrain complex and in acetylcholinesterase-containing fibers and varicosities within the hippocampus in the owl monkey (*Aotus Trivirgatus*), *Neuroscience Letters*, 68 (1986c) 17-22.

Melander T., Fuxe K., Härfstrand A., Eneroth P. and Hökfelt T., Effects of intraventricular injections of galanin on neuroendocrine functions in the male rat. Possible involvement of hypothalamic catecholamine neuronal systems, *Acta Physiol. Scand.*, 131 (1987) 25-32.

Melander T., Köhler C., Nilsson S., Hökfelt T., Brodin E., Theodorsson E. and Bartfai T., Autoradiographic quantitation and anatomical mapping of 125I-galanin binding sites in the rat central nervous system, *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 1 (1988) 213-233.

Merchenthaler I., Lopez F.J. and Negro-Vilar A., Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 6326-6330.

Merchenthaler I., Lopez F.J., Lennard D. and Negro-Vilar A., Sexual differences in the distribution of neurons coexpressing galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in the rat brain, *Endocrinology*, 129 (1991) 1977-1986.

Merchenthaler I., The hypophysiotropic galanin system of the rat brain, *Neuroscience*, 44 (1991) 643-654.

Merchenthaler I., Lopez F.J. and Negro-Vilar A., Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways, *Progress in Neurobiology*, 40 (1993) 711-769.

Michener S.R., Aimone L.D., Yaksh T.L. and Go V.L.W., Distribution of galanin-like immunoreactivity in the pig, rat and human central nervous system, *Peptides*, 11 (1990) 1217-1223.

Miralles P., Peiro E., Dégano P., Silvestre R.A. and Marco J., Inhibition of insulin and somatostatin secretion and stimulation of glucagon release by homologous galanin in perfused rat pancreas, Diabetes, 39 (1990) 996-1001.

Moore R.Y., Cranial motor neurons contain either galanin- or calcitonin generelated peptidelike immunoreactivity, *The Journal of Comparative Neurology*, 282 (1989) 512-522. Moore R.Y. and Gutafson E.L., The distribution of dopamine-betahydroxylase, neuropeptide Y and galanin in locus coeruleus neurons, *Journal* of Chemical Neuroanatomy, 2 (1989) 95-106.

Murakami Y., Kato Y., Koshiyama H., Inoue T., Yanaihara N. and Imura H., Galanin stimulates growth hormone (GH) secretion via GH-releasing factor (GRF) in conscious rats, European *Journal of Pharmacology*, 136 (1987) 415-418.

Murakami Y., Kato Y., Shimatsu A., Koshiyama H., Hattori N., Yanaihara N. and Imura H., Possible mechanisms involved in growth hormone secretion induced by galanin in the rat, *Endocrinology*, 124 (1989) 1224-1229.

#### N

Niimi M., Takahara J., Sato M. and Kawanishi K., Immunohistochemical indentification of galanin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat, *Neuroendocrionology*, 51 (1990) 572-575.

Nishibori M., Oishi R., Itoh Y. and Saeki K., Galanin inhibits noradrenalineinduced accumulation of cyclic AMP in the rat cerebral cortex, *Journal of Neurochemistry*, 51 (1988) 1953-1955.

Norberg A., Sillard R., Carlquist M., Jörnvall H. and Mutt V., Chemical detection of natural peptides by specific structures - Isolation of chicken galanin by monitoring for its N-terminal dipeptide, and determination of the amino acid sequence, *FEBS Letters*, 288 (1991) 151-153.

Nordström O., Melander T., Hökfelt T., Bartfai T. and Goldstein M., Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence, *Neuroscience Letters*, 73 (1987) 21-26.

#### 0

Ögren S.O. and Pramanik A., Galanin stimulates acetylcholine release in rat striatum, *Neuroscience Letters*, 128 (1991) 253-256.

Ottlecz A., Samson W.K. and McCann S.M., Galanin: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, *Peptides*, 7 (1986) 51-53.

Ottlecz A., Snyder G.D. and McCann S.M., Regulatory role of galanin in control of hypothalamic-anterior pituitary function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85 (1988) 9861-9865.

Palazzi E., Fisone G., Hökfelt T., Bartfai T. and Consolo S., Galanin inhibits the muscarinic stimulation of phosphoinositide turnover in rat ventral hippocampus, *European Journal of Pharmacology*, 148 (1988) 479-480.

Palazzi E., Felinska S., Zambelli M., Fisone G., Bartfai T. and Consolo S., Galanin reduces carbachol stimulation of phosphoinositide turnover in rat ventral hippocampus by lowering  $Ca^{2+}$  influx through voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels, *Journal of Neurochemistry*, 56 (1991) 739-747.

**Parsons R.L., Neel D.S., Konopka L.M. and McKeon T.W.**, The presence and possible role of a galanin-like peptide in the mudpuppy heart, *Neuroscience*, 29 (1989) 749-759.

**Parsons R.L. and Konopka L.M.**, Analysis of the galanin-induced decreased in membrane excitability in mudpuppy parasympathetic neurons, *Neuroscience*, 43 (1991) 647-660.

**Post C., Alari L and Hökfelt T.**, Intrathecal galanin increases the latency in the tail-flick and hot-plate tests in mouse, *Acta Physiologica Scandinavica*, 132 (1988) 583-584.

Price D.D. and Dubner R., Neurons that subserve the sensory-discriminate aspects of pain, *Pain*, 3 (1977) 307-338.

### R

Roberts M.H., Speh J.C. and Moore R.Y., The central nervous system of Bulla gouldiana: peptide localization, Peptides, 9 (1989) 1323-1334.

Rökaeus A., Melander T., Hökfelt T., Lundberg J.M., Tatemoto K., Carlquist M. and Mutt V., A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat, *Neuroscience Letters*, 47 (1984) 161-166.

**Rökaeus A and Brownstein M.J.**, Construction of a porcine adrenal medullary cDNA library and nucleotide sequence analysis of two clones encoding a galanin precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 6287-6291.

**Rökaeus A.**, Galanin: a newly isolated biologically active neuropeptide, *TINS*, 10 (1987) 158-164.

**Rökaeus A. and Carlquist M.**, Nucleotide sequence analysis of cDNAs encoding a bovine galanin precursor protein in the adrenal medulla and chemical isolation of bovine gut galanin, *FEBS Letters*, 234 (1988) 400-406.

**Rökaeus A., Young III W.S. and Mezey E.,** Galanin coexists with vasopressin in the normal rat hypothalamus and galanin's synthesis is increased in the Brattleboro (diabetes insipidus) rat, *Neuroscience Letters*, 90 (1988) 45-50.

Rossowski W.J., Rossowski T.M., Zacharia S., Ertan A. and Coy D.H., Galanin binding sites in rat gastric and jejunal smooth muscle membrane preparations, *Peptides*, 11 (1990) 333-338.

Rouot B.M., U'Prichard D.C. and Snyder S.H., Multiple  $\alpha$ 2-noradrenergic receptor sites in rat brain: Selective regulation of high-affinity [<sup>3</sup>H]clonidine binding by guanine nucleotides and divalent cations, *Journal of Neurochemistry*, 34 (1980) 374-384.

S

Sahu A., Crowley W.R., Tatemoto K., Balasubramanian A. and Kalra S.P., Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine<sup>4</sup>-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (OVX) and OVX estrogens, progesterone-treated rats, *Peptides*, 8 (1987) 291-296.

Sano T., Vrontakis M.E., Kovacs K., Asa S.L. and Friesen H.G., Galanin immunoreactivity in neuroendocrine tumors, Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 115 (1991) 926-929.

Schmidt W.E., Kratzin H., Eckart K., Drevs D., Mundkowski G., Clemens A., Katsoulis S., Schäfer H., Gallwitz B. and Creutzfeldt W., Isolation and primary structure of pituitary human galanin, a 30-residue nonamidated neuropeptide, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 88 (1991) 11435-11439.

Schönrock B., Büsselberg D. and Haas H.L., Properties of tuberomammillary histamine neurones and their response to galanin, Agents and Actions, 33 (1991) 135-137.

Servin A.L., Amiranoff B., Rouyer-Fessard C., Tatemoto K. and Laburthe M., Identification and molecular characterization of galanin receptors sites in rat brain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 144 (1987) 298-306.

Sethi T. and Rozengurt E., Galanin stimulates  $Ca^{2+}$  mobilization, inositol phosphate accumulation, and clonal growth in small cell lung cancer cells, *Cancer Research*, 51 (1991a) 1674-1679.

Sethi T. and Rozengurt E., Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of bradykinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin, and neurotensin, *Cancer Research*, 51 (1991b) 3621-3623.

Seutin V., Verbanck P., Massotte L. and Dresse A., Galanin decreases the activity of locus coeruleus neurons in vitro, *European Journal of Pharmacology*, 164 (1989) 373-376.

Sharif N.A. and Hughes J., Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors, *Peptides*, 10 (1989) 499-522.

Sharp G.W.G., Le Marchand-Brustel Y., Yada T., Russo L.L., Bliss C.R., Cormont M., Monge L. and Van Obberghen E., Galanin can inhibit insulin release by a mechanism other than membrane hyperpolarization or inhibition of adenylate cyclase, *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1989) 7302-7309. Shimosegawa T., Moriizumi S., Koizumi M., Kashimura J., Yanaihara N. and Toyota T., Immunohistochemical demonstration of galaninlike immunoreactive nerves in the human pancreas, *Gastroenterology*, 102 (1992) 263-271.

Sillard R., Langel U. and Jörnvall H., Isolation and characterization of galanin from sheep brain, *Peptides*, 12 (1991) 855-859.

Skofitsch G. and Jacobowitz D.M., Immunohistochemical mapping of galaninlike neurons in the rat central nervous system, *Peptides*, 6 (1985) 509-546.

Skofitsch G., Sills M.A. and Jacobowitz D.M., Autoradiographic distribution of 125I-galanin binding sites in the rat central nervous system, *Peptides*, 7 (1986) 1029-1042.

Sundström E., Archer T., Melander T. and Hökfelt T., Galanin impairs acquisition but not retrieval of spatial memory in rats studied in the Morris swim maze, *Neuroscience Letters*, 88 (1988) 331-335.

Szigethy E., Leonard K. and Beaudet A., Ulatrstructural localization of [<sup>125</sup>I]neurotensin binding sites to cholinergic neurons of the rat nucleus basalis magnocellularis, *Neuroscience*, 36 (1990) 377-391.

# Т

Takaki M., Namba T. and Suga H., Prejunctional modulatory action of galanin on cholinergic contraction due to antidromic activation of capsaicin-sensitive sensory nerves in the isolated guinea-pig ileum, *Biomedical Research*, 13 (1992) 107-112.

**Tatemoto K., Rökaeus A., Jörnvall H., McDonald T.J. and Mutt V.**, Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine, *FEBS Letters*, 164 (1983) 124-128.

Tempel D.L., Leibowitz K.J. and Leibowitz S.F., Effects of PVN galanin on macronutrient selection, *Peptides*, 9 (1988) 309-314.

**Tempel D.L. and Leibowitz S.F.**, Diurnal variations in the feeding responses to norepinephrine, neuropeptide Y and galanin in the PVN, *Brain Research Bulletin*, 25 (1990a) 821-825.

Tempel D.L. and Leibowitz S.F., Galanin inhibits insulin and corticosterone release after injection into the PVN, *Brain Research*, 536 (1990b) 353-357.

**Tramu G., Beauvillain J.C., Pillez A. and Mazzuca M.**, Présence d'une substance immunologiquement apparentée à la somatolibérine extraite d'une tumeur pancréatique humaine (hpGRF) dans des neurones de l'aire hypophysiotrope du Cobaye et du Rat, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 297 (1983) 435-440.

Tsuda K., Yokoo H. and Goldstein M., Neuropeptide Y and galanin in norepinephrine release in hypothalamic slices, *Hypertension*, 14 (1989) 81-86.

Ullrich S. and Wollheim C.B., Galanin inhibits insulin secretion by direct interference with exocytosis, *FEBS Letters*, 247 (1989) 401-404.

Undén A. and Bartfai T., Regulation of neuropeptide Y (NPY) binding by guanine nucleotides in the rat cerebral cortex, *FEBS Letters*, 177 (1984) 125-128.

# V

Vallarino M., Feuilloley M., Vandesande F. and Vaudry H., Immunohistochemical mapping of galanin-like immunoreactivity in the brain of the dogfish *Scyliorhinus canicula*, *Peptides*, 12 (1991) 351-357.

Vance V.K., Schnure J.J. and Reichlin M., Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non steroidogenic polymers of BSA and ACTH, Dans: "Protein and polypeptide hormones" (Ed. M. Margoulies) Int. Congr. Ser., 161 (1968) 380-384.

Villar M.J., Meister B., Cortés R., Schalling M., Morris M. and Hökfelt T., Neuropeptide gene expression in hypothalamic magnocellular neurons of normal and hypophysectomized rats: a combined immunohistochemical and *in situ* hybridization study, *Neuroscience*, 36 (1990) 181-199.

Villar M.J., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J., Theodorsson E., Emson P.C. and Hökfelt T., Further studies on galanin-, substance P-, and CGRP-like immunoreactivities in primary sensory neurons and spinal cord: effects of dorsal rhizotomies and sciatic nerve lesions, *Experimental Neurology*, 112 (1991) 29-39.

Vrontakis M.E., Peden L.M., Duckworth M.L. and Friesen H.G., Isolation and characterization of a complementary DNA (galanin) clone from estrogeninduced pituitary tumor messenger RNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (1987) 16755-16758.

Vrontakis M.E., Yamamoto T., Schroedter I.C., Nagy J.I. and Friesen H.G., Estrogen induction of galanin synthesis in the rat anterior pituitary gland demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry, *Neuroscience Letters*, 100 (1989) 59-64.

Vrontakis M.E., Sano T., Kovacs K. and Friesen H.G., Presence of galaninlike immunoreactivity in nontumorous corticotrophs and corticotroph adenomas of the human pituitary, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70 (1990) 747-751. Wåhlander K., Ammälä C., Berggren P.-O., Bokvist K., Juntti-Berggren L and Rorsman P., Galanin inhibits  $\beta$ -cell electrical activity by a G-proteinregulated sulphonylurea-insensitive mechanism, dans Galanin: A new multifunctional peptide in the neuro-endocrine system, T. Hökfelt, T. Bartfai, D. Jacobowitz, D. Ottoson, eds, MacMillan Press, (1990) 237-246.

Walker L.C., Koliatsos V.E., Kitt C.A., Richardson R.T., Rökaeus A. and Price D.L., Peptidergic neurons in the basal forebrain magnocellular complex of the Rhesus Monkey, *The Journal of Comparative Neurology*, 280 (1989) 272-282.

Walker L.C., Rance N.E., Price D.L. and Young III W.S., Galanin mRNA in the nucleus basalis of Meynert complex of baboons and humans, *The Journal of Comparative Neurology*, 303 (1991) 113-120.

Wenk G.L. and Rökaeus A., Basal forebrain lesions differentially alter galanin levels and acetylcholinergic receptors in the hippocampus and neocortex, *Brain Research*, 460 (1988) 17-21.

Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J. and Hökfelt T., Intrathecal galanin at low doses increases spinal reflex excitability in rats more to thermal than mechanical stimuli, *Experimental Brain Research*, 71 (1988) 663-666.

Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J. and Hökfelt T., The effects of intrathecal galanin and C-fiber stimulation on the flexor reflex in the rat, *Brain Research*, 486 (1989a) 205-213.

Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J., Villar M.J. and Hökfelt T., The effect of intrathecal galanin on the flexor reflex in rat: increased depression after sciatic nerve section, *Neuroscience Letters*, 105 (1989b) 149-154.

Wiesenfeld-Hallin, Xu X.J., Villar M.J. and Hökfelt T., Intrathecal galanin potentiates the spinal analgesic effect of morphine: electrophysiological and behavioural studies, *Neuroscience Letters*, 109 (1990) 217-221.

Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J., Langel U., Bedecs K., Hökfelt T. and Bartfai T., Galanin-mediated control pain: enhanced role after nerve injury, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 89 (1992) 3334-3337.

Williams L.T. and Lefkowitz R.J., Slowly reversible binding of catecholamine to a nucleotide-sensitive state of the  $\beta$ -adrenergic receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 252 (1977) 7207-7213.

Woll P.J. and Rozengurt E., Multiple neuropeptides mobilise calcium in small cell lung cancer: effects of vasopressin, bradykinin, cholecystokinin, galanin and neurotensin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 164 (1989) 66-73.

Wynick D., Smith D.M., Ghatei M., Akinsanya K., Bhogal R., Purkiss P., Byfield P., Yanaihara N. and Bloom S.R., Characterization of a high-affinity galanin receptor in the rat anterior pituitary: Absence of biologically effect and reduced membrane binding of the antagonist M15 differentiate it from the brain/gut receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 90 (1993a) 4231-4235.

Wynick D., Hammond P.J., Akinsanya K.O. and Bloom S.R., Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function, *Nature*, 364 (1993b) 529-532.

# Х

Xu X.-J., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M.J. and Hökfelt T., Intrathecal galanin antagonizes the facilitatory effect of substance P on the nociceptive flexor reflex in the rat, *Acta Physiologica Scandinavica*, 137 (1989) 463-464.

# Y

Yau W.M., Dorsett J.A. and Youther M.L., Evidence for galanin as an inhibitory neuropeptide on myenteric cholinergic neurons in the guinea pig small intestine, *Neuroscience Letters*, 72 (1986) 305-308.

#### Ζ

Zini S., Roisin M.-P., Armengaud C. and Ben-Ari Y., Effect of potassium channel modulators of the realease of glutamate induced by ischaemic-like conditions in rat hippocampal slices, *Neuroscience Letters*, 153 (1993) 202-205.