

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

Année Universitaire 1994-1995

THESE

Présentée à

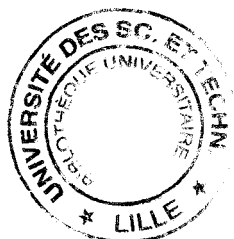
L'UNIVERSITE DE LILLE I

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

par

Frédérique VAROQUEAUX

**Etude morpho-fonctionnelle des projections
du septum latéral médiolatéral vers l'aire préoptique et
l'hypothalamus neuroendocrines chez le cobaye et le rat.**



Soutenu le 13 Juillet 1995 devant le Jury composé de:

| | |
|--------------|--|
| Président: | Monsieur le Professeur Jean Malécha |
| Rapporteurs: | Monsieur le Professeur Dominique Fellmann Monsieur le Professeur Gérard Tramu |
| Examineurs: | Monsieur Jean-Claude Beauvillain Monsieur Pierre Poulain |

A mes parents,
A Philippe

J'aimerais adresser mes plus vifs remerciements

à Monsieur le Professeur M. Mazzuca, qui, en acceptant de m'intégrer dans son laboratoire voici cinq ans, a permis la réalisation de ce travail, qu'il a toujours soutenu avec bienveillance.

à Monsieur le Professeur J. Malécha, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

à Monsieur le Professeur D. Fellmann, qui, malgré de lourdes charges scientifiques et cliniques, a accepté d'être rapporteur de cette thèse. Sa sollicitude ajoutée à sa compétence en neuroendocrinologie m'honorent particulièrement.

à Monsieur le Professeur G. Tramu, dont la notoriété dans le domaine de la neuroendocrinologie rend son avis très précieux quant à l'appréciation de ce travail. Je lui suis très reconnaissante d'avoir accepté, avec beaucoup de gentillesse, la charge supplémentaire que constitue la critique de ce mémoire.

à Monsieur J.-C. Beauvillain, pour sa gentillesse et sa disponibilité, sa participation à ma formation et à la réalisation de ce travail.

à Monsieur P. Poulain, qui a dirigé mes travaux. Cette thèse est le témoignage de la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant à l'Unité. Je lui suis reconnaissante de m'avoir communiqué son intérêt pour la recherche et guidé tout au long de ces années en me laissant toutefois la responsabilité de mon travail.

Je remercie très sincèrement

Monsieur A. Epstein, qui m'a permis d'utiliser les souches virales dont il disposait. Son accueil très amical et ses nombreux conseils m'ont été précieux.

Monsieur Philippe Ciofi, dont l'exceptionnelle motivation et les grandes qualités scientifiques et humaines ont été pour moi une grande chance. Je lui dois beaucoup.

Mademoiselle Soizic Dutoit, pour sa compétence et l'amicale disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard.

Aymeric et Laurence, et tous les membres de l'Unité 156/422 et du laboratoire d'Histologie dont la gentillesse, la bonne humeur et les conseils m'ont aidée pendant toutes ces années.

Ce travail, réalisé au sein de l'Unité INSERM 156 " Neuroendocrinologie expérimentale" dirigée par Mr le Professeur Mazzuca, devenue Unité INSERM 422 " Neuroendocrinologie et Physiopathologie neuronale" dirigée par Mr Beauvillain, a donné lieu aux publications suivantes :

Publication :

Varoqueaux F., Poulain P. (1994) Lateral septal inputs onto tubero-infundibular neurons in the guinea pig hypothalamus, *Cell and Tissue Research* (1994), 278, p 217-225.

Communications :

- Varoqueaux F., Ciofi P., Tramu G., J-C. Beauvillain et Poulain P. A direct projection from the lateral septum to GnRH neurons in the rat. Communication affichée au congrès de la Société des Neurosciences américaine, San Diego, Novembre 1995

- Varoqueaux F., Poulain P. La stimulation électrique du septum latéral induit l'expression de Fos dans l'hypothalamus du rat. Communication affichée au XXIIIème Colloque de la SNE*, Sophia-Antipolis, Septembre 1994

- Warembourg M., Varoqueaux F., Poulain P. Le récepteur à la progestérone dans les neurones hypothalamiques du cobaye : colocalisation avec la TH et projections des neurones vers l'éminence médiane. Communication affichée au XXIIème Colloque de la SNE*, Louvain, Septembre 1993

- Varoqueaux F., Poulain P., Mitchell V. Etude morphologique des projections du septum latéral vers les structures neuroendocrines de l'hypothalamus du cobaye. Communication orale au 75ème Congrès de l'Association des Anatomistes, Lille, Mai 1993

- Varoqueaux F., Poulain P. Afférences du septum latéral aux neurones tubéro-infundibulaires chez le cobaye. Communication affichée au XXIème Colloque de la SNE*, Nancy, Septembre 1992

- Varoqueaux F., Poulain P. Etude des projections du septum latéral vers l'hypothalamus par transport antérograde de Fluoro-Ruby chez le cobaye. Communication affichée au XXème colloque de la SNE*, Genève, Septembre 1991

* SNE : Société de Neuroendocrinologie Expérimentale.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

| | |
|--|------|
| Liste des abréviations utilisées | p.7 |
| Liste des illustrations | p.9 |
| INTRODUCTION ET OBJECTIFS | p.11 |
| ETAT DES CONNAISSANCES | p.13 |
| <u>I - Le septum</u> | p.13 |
| A - Localisation | p.13 |
| B - Terminologie | p.13 |
| <u>II - Le septum latéral (SL)</u> | p.14 |
| A - Neurochimie des corps cellulaires du SL | p.14 |
| 1 - Neuropeptides | p.14 |
| 2 - GABA | p.15 |
| 3 - Acides aminés excitateurs | p.15 |
| 4 - Protéines liant le calcium | p.15 |
| 5 - Récepteurs aux hormones stéroïdes | p.15 |
| B - Connexions du SL | p.16 |
| 1 - Connexions intraseptales | p.16 |
| 2 - Connexions afférentes | p.16 |
| a - Afférences télencéphaliques | p.17 |
| b - Afférences diencéphaliques | p.18 |
| c - Afférences mésencéphaliques | p.19 |
| d - Afférences rhombencéphaliques | p.19 |
| 3 - Connexions efférentes | p.20 |
| a - Efférences télencéphaliques | p.20 |
| b - Efférences diencéphaliques | p.20 |
| c - Efférences du tronc cérébral | p.22 |
| C - Rôles du SL | p.22 |
| 1 - Mémorisation | p.23 |
| a - Rythme θ | p.23 |
| b - Potentialisation à long terme | p.23 |
| 2 - Crainte | p.24 |
| 3 - Fonctions autonomes | p.25 |
| 4 - Agressivité | p.25 |
| 5 - Comportement sexuel | p.26 |
| a - Comportement sexuel mâle | p.26 |
| b - Comportement sexuel femelle : la lordose | p.27 |
| 6 - Comportement alimentaire | p.27 |
| 7 - Immunité | p.28 |
| 8 - Fonctions antéhypophysaires | p.28 |
| a - Fonction LH | p.28 |
| b - Fonction ACTH | p.29 |
| c - Fonction GH | p.29 |
| 9 - Fonctions posthypophysaires | p.29 |

| | |
|---|------|
| MATERIEL ET METHODES | p.31 |
| <u>I - Animaux</u> | p.31 |
| A - Anesthésie | p.31 |
| B - Préparation des tissus | p.31 |
| 1 - Fixation | p.31 |
| 2 - Congélation | p.32 |
| 3 - Confection des coupes histologiques | p.32 |
| <u>II - Techniques de traçage axonal</u> | p.32 |
| A - Stéréotaxie | p.33 |
| 1 - Chez le cobaye | p.33 |
| 2 - Chez le rat | p.33 |
| B - Traceurs axonaux fluorescents | p.33 |
| 1 - Dextran couplé à la tétraméthylrhodamine | p.33 |
| 2 - Fluoro-Gold | p.33 |
| 3 - Modes d'injection | p.34 |
| a - Injection par pression | p.34 |
| b - Injection par iontophorèse | p.34 |
| 4 - Traitement ultérieur | p.34 |
| C - Traceur axonal couplé à la biotine | p.35 |
| 1 - Préparation du tissu pour la microscopie optique | p.35 |
| 2 - Préparation du tissu pour la microscopie électronique | p.36 |
| D - Traceurs axonaux viraux | p.37 |
| <u>III - Techniques de lésion et de stimulation pour la détection du marqueur d'activité Fos</u> | p.38 |
| A - Lésions du SL | p.38 |
| B - Stimulations du SL | p.38 |
| 1 - Stimulation chimique | p.38 |
| 2 - Stimulation électrique | p.38 |
| a - Chez l'animal éveillé | p.38 |
| b - Chez l'animal anesthésié | p.39 |
| C - Détection de la protéine Fos | p.40 |
| D - Détection simultanée de la protéine Fos et du dextran biotinylé | p.40 |
| <u>IV - Techniques d'identification de différentes populations neuronales</u> | p.41 |
| A - Identification des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires | p.41 |
| 1 - Détection des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires | p.41 |
| 2 - Détection simultanée des efférences septales par le F-R et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires par le F-G ou le G-B | p.41 |
| B - Identification des neurones possédant les récepteurs de la progestérone | p.42 |
| 1 - Détection des neurones possédant les récepteurs de la progestérone | p.42 |

| | |
|---|------|
| 2 - Détection simultanée des efférences septales par le F-R et des neurones possédant les récepteurs de la progestérone | p.43 |
| C - Identification des neurones à LHRH | p.43 |
| 1 - Détection des neurones à LHRH | p.43 |
| 2 - Détection simultanée des efférences septales par le dextran biotinylé et des neurones immunoréactifs pour la LHRH | p.43 |
| 3 - Détection simultanée des neurones activés qui expriment Fos après stimulation électrique du SL et des neurones à LHRH | p.44 |
| RESULTATS | p.45 |
| <u>I - Etude de la distribution des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le cobaye par transport axonal antérograde de Fluoro-Ruby</u> | p.45 |
| A - Description du site d'injection | p.45 |
| 1 - Localisation du site d'injection | p.45 |
| 2 - Aspect du site d'injection | p.46 |
| B - Description du marquage obtenu avec le F-R | p.46 |
| 1 - Composante antérograde | p.47 |
| 2 - Composante rétrograde | p.47 |
| C - Description du marquage obtenu avec le F-R couplé au F-G | p.47 |
| D- Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus | p.48 |
| 1 - Trajets empruntés par les fibres septales | p.48 |
| 2 - Aires contenant les efférences septales | p.49 |
| a - Distribution générale des efférences septales | p.49 |
| b - Variation de la distribution des efférences septales selon l'emplacement du site d'injection | p.50 |
| <u>II - Etude de la distribution des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par transport axonal antérograde de dextran biotinylé</u> | p.51 |
| A - Description du site d'injection | p.51 |
| B - Description du marquage obtenu avec le dextran biotinylé | p.51 |
| C - Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus | p.52 |
| 1 - Distribution générale des efférences septales | p.52 |
| 2 - Variation de la distribution des efférences septales selon l'emplacement du site d'injection | p.54 |
| 3 - Détail de la distribution des efférences septales dans les noyaux hypothalamiques | p.55 |
| a - Noyau supraoptique | p.55 |
| b - Noyau suprachiasmatique | p.55 |
| c - Noyau paraventriculaire | p.55 |
| d - Noyau ventromédian | p.56 |
| e - Noyau arqué | p.56 |
| D - Etude à l'échelle ultrastructurale | p.56 |

| | |
|--|------|
| <u>III - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par l'utilisation de traceurs axonaux viraux</u> | p.56 |
| A - Aspect du marquage | p.57 |
| B - Aspect du site d'injection | p.58 |
| C - Distribution du marquage | p.58 |
| <u>IV - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le cobaye et le rat par l'utilisation de la détection immunocytochimique et/ou le transport axonal rétrograde</u> | p.60 |
| A - Neurones possédant les récepteurs nucléaires de la progestérone (étude chez le cobaye) | p.60 |
| B - Neurones hypophysiotropes (étude chez le cobaye) | p.61 |
| 1 - Mise en évidence des neurones hypophysiotropes | p.61 |
| 2 - Mise en évidence des efférences septales | p.61 |
| 3 - Distribution des neurones marqués par transport rétrograde de G-B ou de F-R | p.61 |
| 4 - Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus | p.62 |
| 5 - Distribution des fibres marquées par le F-R contactant des corps cellulaires marqués par le G-B (ou le F-G) | p.62 |
| C - Neurones à LHRH (étude chez le rat) | p.63 |
| 1 - Distribution des neurones à LHRH | p.63 |
| 2 - Mise en évidence des efférences septales | p.64 |
| 3 - Observation des appositions entre les efférences septales et les neurones à LHRH | p.64 |
| D - Neurones magnocellulaires (étude chez le cobaye) | p.65 |
| 1 - Mise en évidence des neurones magnocellulaires | p.65 |
| 2 - Mise en évidence des efférences septales | p.66 |
| 3 - Distribution des neurones magnocellulaires marqués par transport rétrograde de G-B ou de F-G | p.66 |
| 4 - Distribution des fibres marquées par le F-R contactant les corps cellulaires des neurones magnocellulaires | p.66 |
| <u>V - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par l'utilisation du marqueur d'activité neuronale Fos</u> | p.67 |
| A - Etude chez le cobaye | p.67 |
| B - Etude chez le rat | p.67 |
| 1 - Aspect du marquage | p.68 |
| a - Rats anesthésiés et perfusés sans délai : expression basale de Fos | p.68 |
| b - Rats anesthésiés et perfusés après une survie de 2 heures : effet de l'anesthésique | p.69 |
| c - Rats anesthésiés, implantés et perfusés après une survie de 2 heures : effets combinés de l'anesthésique et de l'intervention stéréotaxique | p.70 |
| 2 - Description du marquage Fos observé après lésion électrolytique du SL | p.70 |

| | |
|---|------|
| 3 - Description du marquage Fos observé après stimulation du SL | p.71 |
| a - Description du marquage Fos observé après stimulation chimique du SL | p.71 |
| b - Description du marquage Fos observé après stimulation électrique du SL | p.71 |
| α - Aspect du site | p.72 |
| β - Distribution de la protéine Fos dans l'aire préoptique et l'hypothalamus | p.72 |
| β 1 - Distribution de la protéine Fos chez le rat anesthésié | p.72 |
| β 2 - Comparaison des animaux stimulés endormis ou vigiles | p.73 |
| β 3 - variation du marquage Fos en fonction du site de stimulation | p.74 |
| | |
| <u>VI - Comparaison de la distribution des efférences septales à celle de la protéine Fos induite par une stimulation électrique</u> | p.74 |
| A - Comparaison sur des groupes d'animaux différents | p.74 |
| B - Comparaison sur le même animal | p.77 |
| | |
| <u>VII - Identification des neurones à LHRH produisant Fos après une stimulation électrique du SL</u> | p.78 |
| | |
| DISCUSSION | p.80 |
| | |
| <u>I - Etudes neuroanatomiques des efférences septales</u> | p.80 |
| A - Réexamen des projections directes du SL chez le cobaye et le rat à l'aide de traceurs axonaux antérogrades | p.80 |
| 1 - Considérations méthodologiques | p.80 |
| a - Méthodes d'élucidation des circuits nerveux depuis les corps cellulaires vers les terminaisons axonales | p.80 |
| b - Choix des traceurs | p.84 |
| c - Caractérisation ultrastructurale des efférences septales | p.84 |
| 2 - Apports de l'étude | p.84 |
| a - Comparaison des efférences septales chez le cobaye et chez le rat | p.84 |
| b - Réévaluation de la projection septale | p.85 |
| c - Spécificité du marquage | p.87 |
| B - Examen des projections indirectes du SL chez le rat à l'aide des souches virales comme marqueurs axonaux transsynaptiques et du marqueur d'activité neuronale Fos | p.88 |
| 1 - Utilisation de souches virales comme marqueurs axonaux transsynaptiques | p.88 |
| a - Considérations méthodologiques | p.88 |
| b - Apports neuroanatomiques de l'étude | p.91 |
| 2 - Utilisation du marqueur d'activité Fos | p.93 |
| a - Considérations méthodologiques | p.93 |
| α - Choix de la méthode | p.93 |
| β - Historique | p.94 |
| b - Validité de la technique | p.95 |
| α - Validité de l'outil chez le cobaye et le rat | p.95 |
| β - Choix de la détection de la protéine plutôt que de ses ARNm | p.95 |

| | |
|--|-------|
| γ - Spécificité du marquage Fos | p.96 |
| γ1 - Le marquage nucléaire observé correspond à la présence de la protéine Fos | p.96 |
| γ2 - Le marquage Fos est observé principalement dans les neurones | p.96 |
| γ3 - Le marquage Fos est présent chez les animaux normaux | p.96 |
| γ4 - Le marquage Fos n'est pas consécutif à la manipulation | p.97 |
| γ5 - Le marquage Fos varie en fonction de l'anesthésique | p.98 |
| δ - Validité des stimuli choisis | p.99 |
| δ1 - Lésions | p.99 |
| δ2 - Stimulations | p.100 |
| c - Apports neuroanatomiques de l'étude | p.101 |
| <u>II - Données fonctionnelles sur les efférences septales obtenues à l'aide du marqueur d'activité Fos</u> | p.102 |
| <u>III - Examen des projections directes du SL vers les structures neuroendocrines</u> | p.104 |
| A- Neurones possédant les récepteurs de la progestérone | p.104 |
| 1 - Considérations méthodologiques | p.105 |
| 2 - Analyse des résultats | p.105 |
| B - Neurones magnocellulaires | p.105 |
| 1 - Considérations méthodologiques | p.105 |
| 2 - Analyse des résultats | p.106 |
| C - Neurones hypophysiotropes | p.107 |
| 1 - Considérations méthodologiques | p.107 |
| 2 - Analyse des résultats | p.108 |
| D - Neurones à LHRH | p.109 |
| 1 - Considérations méthodologiques | p.109 |
| 2 - Analyse des résultats | p.110 |
| CONCLUSION | p.111 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | p.114 |
| RESUME | p.137 |

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

| | |
|-------|--|
| 3V | troisième ventricule |
| AHA | aire hypothalamique antérieure |
| AHD | aire hypothalamique dorsale |
| AHL | aire hypothalamique latérale |
| AHP | aire hypothalamique postérieure |
| APL | aire préoptique latérale |
| APM | aire préoptique médiane |
| APMad | aire préoptique médiane antérodorsale |
| APMav | aire préoptique médiane antéroventrale |
| APO | aire préoptique |
| APV | aire hypothalamique périventriculaire |
| AVPV | aire antéroventrale périventriculaire |
| BD | bandelettes diagonales de Broca |
| BDh | partie horizontale des bandelettes diagonales de Broca |
| BDv | partie verticale des bandelettes diagonales de Broca |
| ca | commissure blanche antérieure |
| cc | corps calleux |
| co | chiasma optique |
| CP | noyau caudé putamen |
| em | éminence médiane |
| f | fornix |
| IC | îlots de Calleja |
| MM | région mamillaire |
| mt | faisceau mamillo-thalamique |
| NA | noyau arqué |
| NAcc | noyau accumbens |
| NAI | noyau alaire |
| NDM | noyau dorsomédian |
| NLST | noyau du lit de la strie terminale |
| NMD | noyau magnocellulaire dorsal |
| NMM | noyau mamillaire médian |
| NPM | noyau préoptique médian |
| NPT | noyau paraténial |
| NPV | noyau paraventriculaire |
| NPVa | noyau paraventriculaire antérieur |
| NPVm | noyau paraventriculaire magnocellulaire |
| NPVp | noyau paraventriculaire parvocellulaire |
| NPVT | noyau paraventriculaire du thalamus |
| NRe | noyau reuniens |
| NRh | noyau rhomboïde |
| NSC | noyau suprachiasmatique |
| NSO | noyau supraoptique |
| NVM | noyau ventromédian |
| OSF | organe subfornical |
| ovlt | organe vasculaire de la lame terminale |
| Ped | pédoncule cérébral |
| PM | région prémamillaire |
| SF | noyau septofimbrial |
| SH | noyau septohippocampique |
| SI | substantia innominata |
| SLd | partie dorsale du septum latéral |
| SLi | partie intermédiaire du septum latéral |
| SLml | partie médiolatérale du septum latéral |

| | |
|-------|-----------------------------------|
| SLv | partie ventrale du septum latéral |
| SM | septum médian |
| sm | strie médullaire |
| SubPV | aire subparaventriculaire |
| SuM | région supramamillaire |
| to | tractus optique |
| VL | ventricule latéral |
| ZI | zona incerta |
| zl | zona limitans |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 :** Représentation schématique des sites d'injection de F-R, seul ou associé au F-G, sur 2 plans frontaux du septum du cobaye.
- Figure 2 :** Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus du cobaye observées en fluorescence après injection de F-R et de F-G dans le SL.
- Figure 3 :** Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de F-R dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, après injection iontophorétique de F-R dans le SLml (animal 17 représenté dans la Fig. 1), sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.
- Figure 4 :** Détail de la morphologie des neurones ayant incorporé le dextran biotinylé.
- Figure 5 :** Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de dextran biotinylé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, après injection iontophorétique dans le SLml/v, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.
- Figure 6 :** Microphotographies de coupes frontales du septum et de l'aire préoptique du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.
- Figure 7 :** Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus antérieur et médian du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.
- Figure 8 :** Microphotographies de coupes frontales de l'hypothalamus postérieur et de la région mamillaire du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.
- Figure 9 :** Détails des principaux noyaux de l'aire préoptique et de l'hypothalamus du rat observés après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.
- Figure 10 :** Observations à l'échelle ultrastructurale de coupes effectuées dans l'aire subparaventriculaire, chez un rat ayant reçu une injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.
- Figure 11 :** Détail de la morphologie des neurones ayant incorporé les souches virales herpétiques chez le rat.
- Figure 12 :** Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian du rat observées après injection de souches virales herpétiques dans le SL.
- Figure 13 :** Microphotographies en fluorescence réalisées à la suite d'une injection de F-R dans le SLml du cobaye, combinée à la détection immunocytochimique des neurones possédant les récepteurs de la progestérone.
- Figure 14 :** Représentation schématique de la distribution des efférences septales et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, marqués respectivement après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de F-G ou de G-B, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

Figure 15 : Microphotographies en fluorescence des efférences septales et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, marqués respectivement après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de F-G ou de G-B, sur des coupes frontales.

Figure 16 : Microphotographies en fluorescence d'une coupe frontale du noyau paraventriculaire de cobaye observée après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de G-B.

Figure 17 : Distribution des neurones immunoréactifs pour la LHRH et recevant une innervation d'origine septale visualisée après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v du rat.

Figure 18 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v et détection immunocytochimique des neurones à LHRH en fluorescence.

Figure 19 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats témoins. Détection de la protéine Fos.

Figure 20 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats ayant subi une lésion, ou une stimulation chimique du SL. Détection de la protéine Fos.

Figure 21 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats ayant subi une stimulation électrique du SL. Détection de la protéine Fos.

Figure 22 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rat ayant subi une stimulation électrique du SL. Détection de la protéine Fos.

Figure 23 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Septum et aire préoptique.

Figure 24 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Aire préoptique et hypothalamus antérieur.

Figure 25 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Hypothalamus antérieur et médian.

Figure 26 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Hypothalamus postérieur.

Figure 27 : Détail des juxtapositions observées entre les efférences septales et les neurones exprimant la protéine Fos dans la région subparaventriculaire d'un rat ayant reçu une injection de dextran biotinylé et une stimulation électrique dans le SL.

Figure 28 : Détection immunocytochimique combinée de la LHRH (fluorescéine) et de Fos (marquage à la DAB).

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le septum est un centre limbique qui, depuis sa première description par Meynert en 1867, est l'objet incessant d'études anatomiques et histologiques.

A travers ses connexions nombreuses et réciproques avec les aires télencéphaliques supérieures (hippocampe, amygdale) et les aires diencephaliques (aire préoptique, hypothalamus), et, pour une moindre part, le mésencéphale, le tronc cérébral et la moëlle épinière, le septum latéral (SL) participe au contrôle d'un éventail de processus physiologiques et comportementaux liés aux fonctions cognitives supérieures (apprentissage et mémoire, émotion, peur, agression, stress) ou aux régulations autonomes (prise d'eau et de nourriture, fièvre, hibernation, osmorégulation et réponse humorale) et à l'équilibre endocrinien (libération de l'hormone lutéinisante : LH, de l'hormone adrénocorticotrope : ACTH, de l'hormone de croissance : GH, d'ocytocine, de vasopressine).

Par cette étude, nous avons souhaité étendre le champ des connaissances aux parties médiolatérale (SLml) et ventrale (SLv) du septum latéral, dont les afférences convergentes de l'hippocampe, de l'amygdale et de l'hypothalamus d'une part, et les projections vers l'hypothalamus d'autre part, en font une région charnière dans l'articulation des circuits de régulation hippocampo-septo-hypothalamiques, comprenant notamment le contrôle des fonctions neuroendocrines.

La première partie de ce travail a consisté en un réexamen de la topographie de la distribution des afférences du SLml et du SLv au sein des aires préoptiques et hypothalamiques, sièges de la modulation des fonctions neuroendocrines.

Elle a été rendue possible grâce à l'utilisation de nouveaux outils d'investigation neuroanatomique, en l'occurrence de traceurs axonaux antérogrades performants, que nous avons utilisés chez le cobaye, puis chez le rat.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de préciser la nature de l'implication présumée du SLml et du SLv dans la modulation des cellules neuroendocrines, en visualisant ces dernières par injection d'un traceur axonal rétrograde.

Notre attention s'est focalisée sur deux grands axes neuroendocriniens :

~ D'une part, l'axe reproducteur, qui regroupe plusieurs populations de neurones :

* Les neurones sensibles à la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques, et possédant les récepteurs nucléaires de ces hormones.

* Les neurones à LHRH, neuropeptide contrôlant la libération de LH, et plus globalement les neurones hypophysiotropes, qui se terminent dans la zone externe de l'éminence médiane pour y libérer leurs produits de sécrétion peptidergiques qui contrôlent la libération des hormones produites par l'anté-hypophyse.

~ D'autre part, le système magnocellulaire, constitué des neurones des noyaux hypothalamiques supraoptiques et paraventriculaires qui se projettent dans la post-hypophyse pour y libérer leurs produits de sécrétion, l'ocytocine et la vasopressine.

Comme la régulation exercée par le SLml et le SLv sur ces axes neuroendocrines pourrait nécessiter des circuits polysynaptiques, nous avons tenté d'utiliser des virus neurotropes, employés depuis peu pour leur capacité à franchir les synapses.

Enfin, et de façon inédite, nous avons voulu compléter ces données purement anatomiques par une investigation fonctionnelle de la fonction septale, rendue possible par l'utilisation du marqueur d'activité neuronale Fos. La confrontation de ces deux types d'étude nous a permis de formuler de nouvelles hypothèses quant au fonctionnement du SLml et du SLv, ouvrant de nouvelles perspectives exploratoires.

ETAT DES CONNAISSANCES

ETAT DES CONNAISSANCES

I - Le septum

A- Localisation

Le septum est une structure du télencéphale située entre les cornes antérieures des ventricules latéraux, ventrale au corps calleux et dorsale à la décussation de la commissure blanche antérieure (Fig. 5A-G).

Il est limité à l'avant par le rudiment hippocampique antérieur (taenia tecta) et à l'arrière par les commissures hippocampiques.

Ventrolatéralement, les îlots de Calleja séparent le septum du noyau accumbens.

B - Terminologie

La nomenclature proposée dès 1867 par Meynert après une étude chez le boeuf s'est vue précisée par les travaux d'Andy et Stephan (1959) chez les primates, puis de Swanson et Cowan (1979) chez le rat. Cette dernière terminologie est désormais communément admise, chez le cobaye comme chez le rat (Bleier, 1983; Paxinos et Watson, 1986).

Des critères basés sur la topographie, la cytoarchitecture et les connexions permettent de partager le septum en une région médiane, une région postérieure et une région latérale. Le noyau septal médian regroupe le septum médian et les bandelettes diagonales de Broca (verticales et horizontales). On peut lui associer le noyau septo-hippocampique, situé médialement, sous le corps calleux.

Le noyau septal postérieur englobe le noyau septofimbrial et le noyau triangulaire.

Le noyau septal latéral (SL), qui borde les ventricules latéraux, est subdivisé en régions dorsale (SLd), intermédiaire (SLi) et ventrale (SLv), selon la taille et la densité des neurones qui les peuplent, bien qu'aucune frontière nette ne les sépare.

Le SLi, qui forme l'aire la plus large et la plus hétérogène du SL, peut encore être dissocié en une partie médiane et une partie latérale.

Cette région latérale forme, avec la portion ventrale du SLd et la portion dorsale du SLv, une subdivision appelée septum latéral médiolatéral ou SLml, par Jakab et Leranath (1990b). Elle se distingue par l'abondance de neurones à épines somatiques qu'elle contient.

II - Le septum latéral (SL)

A - Neurochimie des corps cellulaires du SL

Le SL contient la plupart des neurotransmetteurs et substances neuroactives connus (Woodhams et coll, 1983; Palkovits, 1984; revue dans Jakab et Leranath, 1995). La nature chimique de ses afférences est en partie identifiée. Le contenu des fibres et des terminaisons répertoriées dans le SL sera traité dans le chapitre consacré aux connexions afférentes.

1 - Neuropeptides

Le SL contient en particulier les corps cellulaires de neurones à ANP (peptide natriurétique atrial : Kawata et coll, 1985), dynorphine A (Khatchaturian et coll, 1982; Vincent et coll, 1982; Watson et coll, 1982, Weber et coll, 1982), neurotensine (Jennes et coll, 1982; Woodhams et coll, 1983; Köhler et Eriksson, 1984), neuropeptide-Y (Allen et coll, 1983), VIP (peptide intestinal vasoactif : Köves et coll, 1991; Loren et coll, 1979; Senut et coll, 1989; Sims et coll, 1980; Woodhams et coll, 1983) et LHRH (Shivers et coll, 1983; Witkin et coll, 1982). Il renferme également des neurones à met-enkephaline répartis dans le SLi médian (Woodhams et coll, 1983; Gall et Moore, 1984; Costa et coll, 1983; Finley et coll, 1981a, Kivipelto et Panula, 1986; Sar et coll, 1978; Senut et coll, 1989; Wamsley et coll, 1980; Williams et Dockray, 1983) .

Des neurones à somatostatine sont présents dans le SL rostral puis, dans les plans plus postérieurs, dans les SLv et SLd (Bennett-Clarke et coll, 1980; Finley et coll, 1981b; Köhler et Eriksson, 1984; Woodhams et coll, 1983), où sont détectés également des neurones à substance-P (Costa et coll, 1983, Cuello et Kanazawa, 1978; Gall et Moore, 1984; Ljungdahl et coll, 1978; Peterson et Shurlow, 1992; Woodhams et coll, 1983).

Enfin, des neurones immunoréactifs pour la cholécystokinine sont dispersés à travers l'ensemble du SL (Innis et coll, 1979; Senut et coll, 1989; Vanderhaegen et coll, 1980; Woodhams et coll, 1983).

2 - GABA

Les subdivisions dorsales et ventrales du SL contiennent de nombreux neurones GABAergiques, de même que le SLml (Costa et coll, 1983; Köhler et Chan-Palay, 1983; Panula et coll, 1984; Ottersen et Storm-Mathisen, 1984; Onteniente et coll, 1986; Beauvillain et coll, 1991) au sein duquel le GABA est souvent colocalisé avec la calbindine : CaBP (Jakab et Leranthe, 1990b, 1991b).

3 - Acides aminés excitateurs

Bien que pressentie par les études d'Ottersen et Storm-Mathisen (1984) et Carnes et Coll (1990), la présence de corps cellulaires contenant du glutamate et/ou de l'aspartate n'a jamais été démontrée dans le SL.

4 - Protéines liant le calcium

Le SLml et le SLv contiennent en grand nombre les neurones à CaBP (Baimbridge et coll, 1982; Heizmann et Celio, 1987; Celio, 1990; Jakab et coll, 1991a; Doutrelant et coll, 1993a, 1993b).

Quelques neurones immunoréactifs pour la calrétinine sont disséminés dans le SL (Jacobowitz et Winsky, 1991; Resibois et Rogers, 1992), et de rares neurones à parvalbumine sont présents dans le SLd (Leranthe et coll, 1992).

5 - Récepteurs aux hormones stéroïdiennes

Des neurones exprimant l'ARNm du récepteur aux androgènes sont présents dans toute l'étendue du SL, par opposition à la population neuronale exprimant l'ARNm du récepteur aux oestrogènes, dont la répartition est restreinte au SLv (Simerly et coll, 1990 chez le rat).

Les neurones pouvant concentrer les androgènes ou les oestrogènes sont détectés, respectivement, dans l'ensemble du SL et dans le SLv, chez le rat (Pfaff et Keiner, 1973; Sar et Stumpf, 1975; Stumpf et coll, 1975) et chez le cobaye (Warembourg, 1977, Warembourg et coll., 1989; Blaustein et Turcotte, 1989; DonCarlos et coll, 1991).

Il a été montré également qu'un grand nombre de neurones, en particulier du SLml, synthétisait l'aromatase, enzyme qui convertit la testostérone en oestradiol (Jakab et coll, 1993).

B - Connexions du SL

1 - Connexions intraseptales

Dès 1966, les travaux de Raisman faisant appel à des techniques de dégénérescence axonale affirment que près de la moitié des terminaisons axonales présentes dans le septum sont issues de corps cellulaires appartenant au septum lui-même. D'autres études (Swanson et Cowan, 1979; Nyakas et coll, 1987; Staiger et Nürnberger, 1991a et Yoshida et Oka, 1990) ont conforté cette idée. Une organisation des relations intraseptales a été proposée par Staiger et Nürnberger (1991b), chez le cobaye.

D'après ces auteurs, les neurones appartenant à une même subdivision du SL seraient connectés dans l'axe antéro-postérieur. Les neurones de différents sous-noyaux pourraient "communiquer" suivant un axe dorso-ventral. Enfin, il existerait une communication bilatérale ténue, entre les neurones appartenant aux mêmes sous-noyaux d'un hémisphère à l'autre.

D'autre part, l'existence d'une projection massive du SL vers le septum médian a longtemps été présumée (Raisman, 1966a; Swanson et Cowan, 1977, 1979), mais elle est maintenant infirmée par des études plus récentes (Leranth et coll, 1992; Witter et coll, 1992; Staiger et Nürnberger, 1991b; Gulyas et coll, 1991) chez le rat, le cobaye et le singe, qui démontrent que seuls quelques neurones du SLd sont en relation directe avec le septum médian. En fait, il s'avère que des fibres issues du SL se terminent au niveau de la partie latérale des bandelettes diagonales de Broca verticales.

Réciproquement, les collatérales axoniques du complexe septum médian / bandelettes de Broca se terminent dans les noyaux du SL en respectant une organisation horizontale (Swanson et Cowan, 1979; Garris, 1979).

2 - Connexions afférentes

Les afférences au SL proviennent, en règle générale, d'une source homolatérale, chez le cobaye comme chez le rat (Simerly et Swanson, 1988; Staiger et Nürnberger, 1989; Cullinan et Zaborsky, 1991), bien qu'une composante contralatérale soit observée.

Dans ces deux espèces cependant, on relève l'exception notable de la dense innervation enképhalinergique, symétrique et bilatérale, du SLml et du SLv, qui a pour origine un groupe de neurones magnocellulaires topographiquement organisés chez le cobaye, formant le noyau magnocellulaire dorsal (Poulain, 1974, 1983; Poulain et coll,

1984) et dispersés dans l'aire périfornicale chez le rat (Onteniente et coll, 1989; Staiger et Nürnberger, 1989).

De nombreuses fibres et terminaisons présentes dans le SL provenant de l'hypothalamus ou du tronc cérébral empruntent en fait le système périfornical puis le SLv pour se terminer dans la formation hippocampique ou certaines aires corticales. Il est alors difficile de juger si le SL constitue ou non une région cible de ces tractus, hormis dans le cas où ces fibres forment des arrangements périsonatiques autour des corps cellulaires des neurones du SL.

Le SL reçoit des afférences télencéphaliques, diencéphaliques, mésencéphaliques et rhombencéphaliques.

a - Afférences télencéphaliques

Les afférences télencéphaliques au SL se terminent surtout au niveau du champ dendritique des neurones.

L'innervation hippocampique, via le fornix et la fimbria, fournit au SL la source majeure de ces afférences (Raisman, 1966a, 1966b, 1969; Meibach et Siegel, 1977b; Swanson et Cowan, 1977, 1979) -55% d'après les travaux de déafférentation de Raisman (1969)- selon une distribution topographique dorso-ventrale et rostro-caudale bien établie dans le SLi (Siegel et coll, 1974; Swanson, 1978; Swanson et Cowan, 1979).

Ainsi, les champs CA2 et CA3 des cornes d'Ammon innervent bilatéralement les deux-tiers du SL postérieur, alors que les champs CA1 et le subiculum sont en relation de préférence, et de façon unilatérale, avec le SL antérieur (Swanson et Cowan, 1979, Canteras et Swanson, 1992). Il faut souligner que les neurones du champ CA3, par le biais des collatérales de Schaffer, se projettent à la fois dans le SL, dans le champ CA1, le subiculum et le cortex entorhinal (Swanson et coll, 1981).

De même, la partie dorsale des cornes d'Ammon et le subiculum sont plutôt en relation avec le SLd, tandis que le SLi est innervé par les zones intermédiaires de ces régions. Le SLi reçoit également des afférences venant du cortex entorhinal (Alonso et Köhler, 1984).

Le SLv est plutôt en relation avec le pôle temporal. En effet, le noyau amygdaloïde médian (Staiger et Nürnberger, 1989) et le noyau postérieur de l'amygdale chez le rat (Canteras et coll, 1992), mais pas chez le cobaye (Staiger et Nürnberger, 1989), ainsi que le noyau du lit de la strie terminale, se projettent massivement dans le SLv, et en moindres proportions dans le SLi (Staiger et Nürnberger, 1989).

L'amygdale et le noyau du lit de la strie terminale semblent être, au moins en partie, à l'origine de l'innervation vasopressinergique de cette région (De Vries et Buijs, 1983; Van Leeuwen et Caffé, 1983; De Vries et coll, 1985; De Vries, 1990; Caffé et coll, 1987).

Globalement, l'innervation hippocampique du SL, en particulier du SLi qui est le plus densément innervé, est de nature excitatrice, glutamatergique lorsqu'interviennent les collatérales de Schaffer (Joëls et Urban, 1984 a, b; Stevens et Cotman, 1986).

b - Afférences diencéphaliques

Les afférences préoptiques, hypothalamiques et thalamiques au SL empruntent le faisceau médian du télencéphale (Luiten et coll, 1982; Staiger et Nürnberger, 1989; Cullinan et Zaborsky, 1991) et forment souvent des plexus périsonomatiques et péridendritiques qui signaleraient une relation physiologique significative.

De tels arrangements " en corbeille " ont été identifiés comme étant de nature enképhalinergique, mais aussi dopaminergique, sérotoninergique, cholinergique et immunoréactifs pour la substance-P, la neurotensine, l'angiotensine II, la somatostatine, la TRH (hormone thyroïdienne), le CRF (facteur de libération de la corticotropine) et le CGRP (peptide lié au gène de la calcitonine) (voir revue dans Jakab et Leranth, 1995).

Les neurones se projetant dans le SL sont en partie issus de l'aire préoptique latérale et de l'hypothalamus latéral, formant un noyau appelé noyau du lit du faisceau médian du télencéphale (Saper et coll, 1979) au sein duquel les neurones les plus latéraux se terminent dans le SLd alors que les neurones les plus médians ont pour cible le SLv (Staiger et Nürnberger, 1989; Cullinan et Zaborsky, 1991).

Le groupe de neurones situés dans l'aire périfornicale, et formant le NMD chez le cobaye, constitue l'autre source de terminaisons hypothalamiques dans le SLml et le SLv (Poulain, 1974, 1983; Poulain et coll, 1984). Ce tractus hypothalamo-septal a son équivalent chez le rat (Onteniente et coll, 1989; Sakanaka et Magari, 1989), mais les neurones d'origine ne sont pas regroupés en un noyau distinct, ils sont disséminés dans la région périfornicale.

Chez le cobaye, il est exclusivement à l'origine des fibres à enképhaline (Tramu et coll, 1981; Beauvillain et coll, 1982), alors qu'il donne lieu à une innervation mixte à enképhaline (Sakanaka et coll, 1982b; Onteniente et coll, 1989) et à TRH (Ishikawa et coll, 1986) ou à CRF (Sakanaka et coll, 1988) chez le rat, où les deux peptides enképhaline et TRH sont colocalisés dans les cellules périfornicales (Merchenthaler, 1991).

L'ensemble du SL reçoit également une innervation dopaminergique et somatostatinergique venant de neurones de l'aire préoptique médiane antérieure et de l'aire

périvericulaire antérieure (Sakanaka et coll, 1990; Björklund et coll, 1975; Palkovits et coll, 1980, 1982; Jakab et Leranth, 1991a, 1993).

Le SL reçoit une innervation plus anecdotique issue de quelques neurones du noyau suprachiasmatique (Watts et coll, 1987; Staiger et Nürnbergger, 1989), du noyau parvocellulaire antérieur (Ferris et coll, 1990; Staiger et Nürnbergger, 1989; Cullinan et Zaborsky, 1991), du noyau magnocellulaire latéral, des noyaux dorso- et ventromédians (Luiten et coll, 1982; Ter Horst et Luiten, 1986; Staiger et Nürnbergger, 1989; Cullinan et Zaborsky, 1991) et du noyau arqué (Krieger et coll, 1979; Luiten et coll, 1982; Staiger et Nürnbergger, 1989).

Plus postérieurement, de nombreux neurones des régions pré- et supramamillaires et, en moindre proportion, tubéromamillaire, se projettent dans le SL (Swanson, 1982; Staiger et Nürnbergger, 1989).

Parmi les noyaux thalamiques, quelques neurones des noyaux paraventriculaire, paraténial et reuniens ont le SL pour destination (Herkenham, 1978; Swanson et Cowan, 1975; Luiten et coll, 1982; Staiger et Nürnbergger, 1989; Swanson et coll, 1987).

c - Afférences mésencéphaliques

L'aire périaqueducale, l'aire ventrale tegmentale et les noyaux interfasciculaire, interpédonculaire et linéaire central et réticulaire contiennent des neurones qui se projettent dans le SL (Luiten et coll, 1982; Groenevegen et coll, 1986; Vertes et Fass, 1988; Staiger et Nürnbergger, 1989). Ces projections sont en partie dopaminergiques et forment des arrangements périsomatiques dans le SL (Lindvall, 1975; Lindvall et Stenevi, 1978; Fallon et Moore, 1978; Moore, 1978; Swanson, 1982).

d - Afférences rhombencéphaliques

Des fibres septales, sérotoninergiques (Köhler et coll, 1982) pour la plupart, mais aussi dopaminergiques (Stratford et Wirtshafter, 1990), proviennent des neurones des noyaux du raphé dorsal et médian (Segal et Landis, 1974; Azmitia et Segal, 1978; Luiten et coll, 1982; Vertes, 1988, 1991; Staiger et Nürnbergger, 1989).

Le locus coeruleus fournit au SL une innervation noradrénergique qui semble gagner ensuite le cortex et la fimbria (Fuxe, 1965; Moore et coll, 1971; Swanson et Hartman, 1975; Lindvall et Björklund, 1974).

Des fibres cholinergiques (Satoh et Fibiger, 1986; Hallanger et Wainer, 1988) et à substance-P (Sakanaka et coll, 1981, 1982a) proviennent du noyau tegmental latérodorsal.

Le noyau parabrachial, le noyau moteur dorsal du vague, le noyau du tractus solitaire et la moelle ventrolatérale projettent également dans le SL (Saper et Loewy, 1980; Luiten et coll, 1982).

3 - Connexions efférentes

De nombreux auteurs ont décrit, au moins en partie, les aires de projection du SL, principalement chez le rat (Raisman, 1966a; Meibach et Siegel, 1977a; Garris, 1979; Swanson et Cowan, 1977, 1979; Swanson et coll, 1987), mais aussi chez le chat (Krayniak et coll, 1980) ou encore le hamster (Ferris et coll, 1990).

La comparaison de la topographie des efférences septales révèle une grande homologie dans leur distribution. Le SL a pour cible le diencephale, mais innerve de façon plus restreinte le télencéphale et le tronc cérébral.

En règle générale, la projection septale est homolatérale, mais on retrouve, au niveau des régions homolatérales les plus richement innervées, une composante controlatérale ténue.

a - Efférences télencéphaliques

Les études de traçage les plus récentes (Staiger et Nürnberger, 1991b) font état d'une innervation hippocampique discrète du SL, restreinte à quelques fibres présentes dans les champs CA1 et CA3 et le subiculum.

Le SLi se projette faiblement, via la fimbria, dans l'hippocampe ventral, le cortex subiculaire et entorhinal et très peu dans le cortex cingulaire, infralimbique, pédonculaire dorsal, le pallidum ventral, les tubercules olfactifs et la taenia tecta.

Le SL, surtout sa portion médiolatérale, innerve le noyau du lit de la strie terminale dans sa partie antérieure, l'amygdale antérieure et le noyau amygdaloïde médian.

b - Efférences diencephaliques

Le point des connaissances sur les efférences diencephaliques du SL, au moment où notre travail a été entrepris était le suivant :

La distribution des projections septales dans le diencephale a fait l'objet de plusieurs investigations neuroanatomiques. Les études de Raisman (1966a) et Swanson et Cowan (1979) ont montré que le SLd ne se projetait pas dans l'hypothalamus. En revanche, une sous-population de neurones du SLi et du SLv empruntent les bandelettes diagonales de

Broca horizontales et le faisceau médian du télencéphale homolatéral pour se terminer dans l'aire préoptique latérale et l'aire préoptique médiane dorsale, puis dans l'aire hypothalamique latérale. Ils n'entrent pas dans le noyau supraoptique, mais se projettent en grand nombre dans le noyau suprachiasmatique. Les terminaisons septales sont très peu abondantes dans l'hypothalamus médio-basal; notamment, elles sont absentes des noyaux paraventriculaire, ventromédian et arqué, mais elles participent, de façon ténue, à l'innervation de la partie antérieure du noyau dorsomédian. Postérieurement, les fibres marquées dans l'aire hypothalamique latérale pénètrent dans le noyau mamillaire, et semblent se terminer au niveau de la capsule fibreuse entourant le noyau mamillaire latéral puis dans la région supramamillaire. Quelques fibres issues des neurones du SLv sont présentes dans les noyaux paraventriculaire et paraténial thalamiques, après avoir emprunté la strie médullaire.

La composante latérale de l'innervation septale dans l'aire préoptique est également décrite par Conrad et Pfaff (1976a) et Swanson (1976).

Conrad et Pfaff (1976a) et Meibach et Siegel (1977a) font état d'une importante projection septale dans l'aire préoptique médiane. Berk et Finkelstein (1981), Chiba et Murata (1985) et Simerly et Swanson (1986) en soulignent l'aspect abondant et hétérogène.

De nombreux travaux (Tribollet et coll, 1985; Oldfield et coll, 1985; Oldfield et Silverman, 1985; Jhamandas et coll, 1989; Anderson et coll, 1990) démontrent une projection septale en périphérie du noyau supraoptique. Jhamandas et coll (1989) évoquent plus précisément une projection septale dans la partie périnucléaire du noyau supraoptique. Les études de Garris (1979), Zaborsky et coll (1975), Iijima et Ogawa (1981) font état au contraire d'une projection septale dans le noyau supraoptique.

L'implication du SL dans l'innervation de l'aire hypothalamique latérale est décrite par Conrad et Pfaff (1976b), Meibach et Siegel (1977a), Garris (1979), Kita et Oomura (1982) et Barone et coll (1981). Berk et Finkelstein (1981) la définissent comme une innervation en passant plutôt qu'une zone de projection privilégiée du SL.

Meibach et Siegel (1977a) montrent l'absence de projections septales dans l'hypothalamus médiobasal. Cependant, une projection du SL vers le noyau ventromédian est souvent évoquée mais différemment décrite. Ainsi, Garris (1979) décrit une projection du SL au sein du noyau ventromédian, dont les études de De Olmos et Carrer (1978), Luiten et Room (1980) et Berk et Finkelstein (1981) précisent qu'elle est peu importante. Au contraire, Malsbury et coll (1979, chez le hamster) et Kita et Oomura (1982) nient l'existence d'une telle relation. Pour Swanson et Cowan (1979), l'innervation septale est retrouvée en périphérie du noyau ventromédian. De la même façon, Zaborsky (1980, 1982) et Fahrbach et coll (1989) restreignent la projection septale à la région ventrolatérale du noyau ventromédian, ainsi qu'à sa périphérie.

Oldfield et coll (1985) et Tribollet et coll (1985) ne font pas état d'une projection septale vers le noyau paraventriculaire, alors qu'elle est suggérée par les travaux de Conrad et Pfaff (1976b), Silverman et coll (1981), Tribollet et Dreifuss (1981), Kiss et coll (1983) et Berk et Finkelstein (1981). Selon Sawchenko et Swanson (1983), le SL se projette en périphérie du noyau paraventriculaire et peut-être également au sein-même du noyau.

Meibach et Siegel (1977a) et Berk et Finkelstein (1981) font état d'une relation entre le SL et le noyau dorsomédian.

Une projection du SL vers le noyau arqué est établie par Poulain (1977), Hagino et coll (1977) et Garris (1979); ce dernier évoque de surcroît l'existence d'efférences septales dans le noyau ventromédian, l'hypothalamus périventriculaire et l'éminence médiane.

Enfin, la relation du SL avec les régions postérieures de l'hypothalamus a été précisée par Wouterlood et coll (1988), dont les travaux mettent en évidence une projection septale dans les noyaux tubéromamillaire, centromamillaire, supramamillaire et mamillaire.

c - Efférences du tronc cérébral

De très rares fibres issues du SL gagnent la matière grise périaqueducale, l'aire tegmentale ventrale, la substance noire, les noyaux réticulés, interfasciculés, interpedonculés et, plus postérieurement encore, les noyaux du raphé et le noyau tegmental dorsal (Swanson et Cowan, 1979; Staiger et Nürnberger, 1991a).

C - Rôles du SL

Le septum est à l'interface des régions limbiques télencéphaliques, associées à la cognition et à la motivation, d'une part, et des aires hypothalamiques et du tronc cérébral, liées aux fonctions neuroendocrines et autonomes, d'autre part.

Les neurones présentant des épines somatiques (Jakab et Leranth, 1990b) forment la population la plus importante du SL. Répartis essentiellement dans le SLml et le SLv, ils sont principalement de nature GABAergique. Ils sont la cible privilégiée d'afférences convergentes, majoritairement excitatrices, venant des centres limbiques (hippocampe, amygdale, noyau du lit de la strie terminale), de l'hypothalamus et, en moindre part, du tronc cérébral.

De plus, ils participent, par leurs collatérales axoniques, aux connexions intraseptales. Surtout, ils se projettent abondamment en dehors des limites du septum, innervant à la fois l'amygdale et l'hippocampe d'un côté, l'hypothalamus de l'autre.

Ils constituent vraisemblablement le substrat anatomique du maillon septal souvent évoqué dans des circuits de régulation hippocampo-septo-hippocampique, hippocampo-septo-hypothalamique, ou encore hypothalamo-septo-hypothalamique.

1 - Mémorisation

Le SL a été impliqué dans des processus de mémorisation et d'apprentissage, sur la base d'une relation anatomique hippocampe-SL-septum médian-hippocampe.

La relation SL-septum médian ayant été depuis peu réétudiée et considérée maintenant comme beaucoup plus ténue que ce qui était admis auparavant, les rôles attribués au SL semblent dans ce cas revenir au septum médian.

a - Rythme θ

Cependant, quelques auteurs ont impliqué le SL dans les processus de mémorisation, associés au rythme de décharge lent, appelé rythme θ , et dont la production par l'hippocampe est supposée être consécutive à l'un, à l'autre, ou aux deux mécanismes suivants (Leung et coll, 1994) :

~ La synchronisation d'oscillations de potentiels membranaires intrinsèques de neurones hippocampiques aboutirait à ce rythme particulier.

~ L'action synchronisée de neurones du complexe septum médian/bandelettes diagonales de Broca donnerait naissance à ce rythme dans l'hippocampe.

Certains neurones du SL présentent des décharges en phase avec le rythme θ , comme de nombreux neurones du complexe septum médian/bandelettes diagonales de Broca (Stewart et Fox, 1990a, 1990b).

C'est pourquoi le SL reste associé à ce processus de mémorisation.

b - Potentialisation à long terme

La potentialisation à long terme semble également être un mécanisme lié à l'acquisition de la mémoire. Elle consiste en une augmentation soutenue de l'efficacité synaptique induite par des stimulations électriques de haute fréquence. Elle est retrouvée dans de nombreuses régions de l'encéphale, et particulièrement bien étudiée dans l'hippocampe.

Dans l'hippocampe, la potentialisation à long terme de la transmission synaptique est étudiée au niveau des cellules du champ CA1, innervées par les fibres glutamatergiques de la collatérale de Schaffer. Ces mêmes collatérales innervent les neurones du SL et la pharmacologie de la projection hippocampo-septale est semblable à ce qui est observé dans l'hippocampe. La potentialisation à long terme est induite au cours de la transmission excitatrice entre l'hippocampe et le SL (Stevens et Cotman, 1991). La vasopressine augmente la durée de la potentialisation à long terme (Joëls et Urban, 1984c; Van den Hoff et coll, 1990; Garcia et Jaffard, 1992). L'intervention du phénomène dans les processus de mémorisation peut être rapproché des observations suivantes. La vasopressine intraseptale augmente la genèse de la mémoire, alors que celle-ci est affaiblie si on inhibe la vasopressine endogène (DeWield et coll, 1976, 1987; Kovacs et coll, 1979; Veldhuis et coll, 1987). La mémoire sociale et de " reproduction " du rat mâle diminue après injection intraseptale d'antagonistes de la vasopressine (Dantzer et coll, 1988; Sigler et coll, 1990).

Si l'on considère l'importante innervation glutamatergique et vasopressinergique du SL, et sa capacité de potentialisation à long terme, on peut envisager qu'il tienne un rôle important dans les processus de mémorisation, et donc également dans les fonctions comportementales appelées par ce processus (Numan et Quaranta, 1990).

Le SL pourrait également intervenir dans les fonctions de mémorisation en leur attribuant une composante émotionnelle (Thomas, 1988).

2 - Crainte

Selon Thomas et coll (1991), le SL pourrait transmettre l'inhibition des états émotionnels aversifs : en effet, l'activité unitaire des neurones du SL augmente en présence d'un inhibiteur conditionné de peur, et diminue dans le cas opposé.

La stimulation électrique faible du SL (Yadin et coll, 1993; Thomas, 1988), ou l'injection d'un agoniste GABA dans le SL (Drugan et coll, 1986) inhibent les états aversifs, c'est-à-dire qu'ils exercent un effet anxiolytique par l'intermédiaire du SL. De la même façon, Thomas (1988) rapporte que la stimulation du SL s'accompagne d'un état d'éveil plus bas, d'une hypoactivité, d'une baisse de réponse pendant l'expérience, d'un endormissement. De plus, l'autostimulation du SL s'accompagne d'une décélération cardiaque.

A l'inverse, une lésion septale a un effet anxiogénique (Yadin et coll, 1993, Thomas, 1988).

Il semblerait que différentes structures contrôlent de façon indépendante l'expression de différents comportements liés à la crainte (Treit et coll, 1993). Ainsi, l'amygdale et le septum médian produiraient l'anxiété, tandis que le SL l'inhiberait (Thomas, 1988).

3 - Fonctions autonomes

Le SL est connecté de façon réciproque avec l'aire hypothalamique périventriculaire, qui se projette abondamment vers le système moteur autonome et avec l'aire hypothalamique latérale, qui tient un rôle important dans l'initiation de comportements motivés spécifiques.

Par ces relations, le SL participe au contrôle de la prise d'eau et de sel (Gordon et Johnson, 1981), la prise de nourriture (King et Nance, 1986b) et d'autres fonctions autonomes, telles que la régulation de la fièvre (Stuart et coll, 1961; Brück et Zeisberger, 1987, Cooper, 1987) ou les processus thermophysiques impliqués dans l'hibernation (Lee et coll, 1989; Hermes et coll, 1993) et la réponse cardiovasculaire (Calaresu et coll, 1976).

4 - Agressivité

Les neurones du SL modulent également l'agressivité et d'autres comportements liés à la vie sociale et au sexe (Siegel, 1985; Paxinos, 1975; Kondo et coll, 1990; Lisciotto et coll, 1990).

Le système à vasopressine du SL a une importance prépondérante dans ces comportements. L'innervation vasopressinergique du SL présente un dimorphisme sexuel (Compaan et coll, 1993), déterminé par le niveau de testostérone au cours du développement post-natal (Wang et coll, 1993).

Parmi les mâles, le SL est également le siège d'une différenciation individuelle du comportement social, induisant des niveaux d'agressivité différents (Compaan et coll, 1993).

Il est établi que la lésion du SL induit un état d'hyperactivité (Albert et Richmond, 1976; Brutus et coll, 1984) associé à des comportements agressifs et défensifs (Miczek et Grossman, 1972; Blanchard et coll, 1977). Dans ces comportements, les relations entre le SL et l'hypothalamus semblent essentielles (Stoddart-Apter et McDonnel, 1983; Ferris et coll, 1990). En particulier, Ferris et coll (1993) mettent en jeu l'innervation vasopressinergique hypothalamique du SL dans la modulation du comportement de " marquage par le flanc " que présentent les hamsters mâles. Ils établissent une relation

dominant/subordonné, et communiquent leur statut social en déposant sur les objets alentours des phéromones produites par des glandes du flanc.

Ce comportement est inhibé lors d'une lésion septale par l'acide iboténique (Ferris et coll, 1990), mais exacerbé lors d'injections de vasopressine dans le SLv (Irvin et coll, 1990). Cependant, le rôle du SL n'est pas prépondérant puisque l'intégrité bilatérale de l'hypothalamus est indispensable pour activer ce comportement par la vasopressine. En fait, il semble que l'hypothalamus relaie les afférences venues du SL, qui serait lui-même informé par une innervation vasopressinergique hypothalamique (Ferris et coll, 1993).

5 - Comportement sexuel

De nombreux neurones du SLml et du SLv possèdent les récepteurs aux androgènes (Simerly et coll, 1990). Le SLv contient de surcroît les neurones qui concentrent les estrogènes (Pfaff et Keiner, 1973; Simerly et coll, 1990; Don Carlos et coll, 1991). En particulier, les neurones à épines somatiques possèdent l'aromatase, enzyme qui catalyse la conversion de la testostérone en oestradiol (Jakab et coll, 1993).

Par ces caractéristiques, ces neurones du SLml et du SLv sont potentiellement impliqués dans les fonctions limbiques régulées par les hormones stéroïdiennes et en particulier dans les comportements liés à la reproduction.

a - Comportement sexuel mâle

MacLean et Ploog (1962) ont montré, chez le singe écureuil, que la stimulation du SL induit l'érection du pénis.

Les neurones de l'aire préoptique médiane et de l'aire hypothalamique antérieure, sensibles à la testostérone, sont très importants pour les réponses copulatoires du mâle. Ils sont capables de répondre à une stimulation du SL. Ces afférences septales seraient donc également impliquées dans le contrôle du comportement sexuel mâle (Kendrick, 1983). En accord avec cette hypothèse, Kondo et coll (1993a) affirment que le SL et l'aire préoptique médiane ont un rôle excitateur dans la régulation du comportement sexuel mâle.

Une étude réalisée par Kondo et coll en 1990 met en parallèle l'effet facilitateur du SL sur le comportement sexuel mâle (car la lésion du SL supprime le comportement de copulation du rat mâle) et l'effet inhibiteur du SL sur le comportement sexuel femelle (la même lésion du SL augmente le taux de lordose).

b - Comportement sexuel femelle : la lordose

Le SL exerce l'influence inhibitrice la plus importante sur le comportement de lordose chez la ratte (réf ds King et Nance, 1985). Ce comportement dépend de l'action synergique de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs et de neuropeptides, eux-mêmes sous l'influence de l'oestradiol et de la progestérone.

La stimulation électrique du SL inhibe la lordose (Zasorin et coll, 1975). De plus, des lésions électrolytiques du SL (MacGinnis et coll, 1978; Nance et coll, 1974, 1975, 1977; Gorzalka et Gray, 1981), ou des sections bilatérales sous le SLv (Yamanouchi et coll, 1985; Floody, 1993), potentialisent la lordose. La destruction du SL ou l'interruption de ses voies descendantes diminuent la quantité d'oestradiol nécessaire pour une réponse maximale du comportement de lordose (Nance et coll, 1975; Nance, 1983, Yamanouchi et Arai, 1990; Sakuma, 1992).

Cependant, l'influence du SL sur la lordose semble complexe. En effet, une lésion du SL par l'acide kainique diminue le taux de lordose (Nance, 1983; King et Nance, 1985, 1986a; Nance et Myatt, 1987). Dans ce cas, la lésion diminuerait la capacité de réponse aux oestrogènes (King et Nance, 1986b). Le SL pourrait donc moduler le comportement de lordose par des systèmes différents, dont les substrats neuroanatomiques sont mal définis. Kondo et coll (1993b) évoquent la possibilité d'une action inhibitrice du SL sur la lordose par un relais dans la substance grise du mésencéphale, qui contrôlerait ensuite le noyau ventromédian de l'hypothalamus. Le SL et le noyau ventromédian (noyau "ventrolatéral" chez le cobaye) représentent en fait les deux centres nerveux les plus importants dans le déclenchement du phénomène, dans lequel des travaux très récents ont montré l'implication des opiacés (Torii et Kubo, 1994).

6 - Comportement alimentaire

La lésion du SL par l'acide kainique (Wetmore et Nance, 1991) induit, chez la ratte mais pas chez le rat, une augmentation de poids consécutive à une augmentation de la prise alimentaire, normalement régulée au niveau du noyau ventromédian de l'hypothalamus. Il semble que cette lésion supprime les effets anorexiques normalement constatés des oestrogènes sur la prise alimentaire (King et Nance, 1986b).

Le SL pourrait donc, par des connexions directes ou indirectes avec l'hypothalamus médiobasal, réguler la prise de nourriture en transmettant des informations fournies par les oestrogènes.

7 - Immunité

Wetmore et Nance (1991) ont montré que le SL contribue au contrôle central de la réponse immunitaire, qui est supprimée lorsque le SL est lésé, chez la femelle mais pas chez le mâle. Le SL contrôlerait donc la différenciation sexuelle observée lors de la réponse immunitaire.

8 - Fonctions antéhypophysaires

Le SL a été évoqué dans la modulation de plusieurs sécrétions antéhypophysaires, telles que l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et l'hormone de croissance (GH).

a - Fonction LH

Le SL, l'hippocampe et l'aire préoptique sont le siège de la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques. Ils agissent en synergie pour déclencher le pic de LH responsable de l'ovulation (Kawakami et coll, 1978).

L'aire préoptique contient la population de neurones à LHRH (Barry et coll, 1973 chez le cobaye; Merchantaler et coll, 1984 chez le rat).

Bien que l'ovulation ne soit pas supprimée quand on prive l'aire préoptique de ses afférences septales (Taleisnik et coll, 1970), le rôle du SL dans la fonction LH est depuis longtemps évoqué (Hagino et coll, 1977; Halasz et coll, 1989; Krey et Silvermann, 1978). En particulier, la lésion électrolytique du SL diminue le taux de LH (Carreras et coll, 1984), altère la cyclicité vaginale et augmente l'hypertrophie compensatoire ovarienne chez la ratte (Nance, 1983; King et Nance, 1986a). A l'inverse, la stimulation électrique du SL (Carreras et coll, 1984), l'injection de testostérone (Carreras et coll, 1987) ou de progestérone (Kendrick, 1982) dans le SL augmentent la libération de LH.

Ces travaux tendent à attribuer au SL une influence excitatrice sur la sécrétion de LH.

Cependant, la stimulation électrique de l'hippocampe réduit la sécrétion de LH (Velasco et Taleisnik, 1969). Dans le même temps, elle induit une augmentation de la décharge dans le SL. Dans la mesure où l'influence de l'hippocampe sur le SL est de nature excitatrice, on peut penser que l'information inhibitrice globale sur le circuit LH est générée par la mise en jeu de neurones inhibiteurs présents dans le SL (Velasco et Taleisnik, 1969).

b - Fonction ACTH

La stimulation du SL inhibe l'activité de neurones situés dans le noyau paraventriculaire parvocellulaire, qui seraient des neurones à CRF (Saphier et Feldman, 1987). Le SL relaierait une influence inhibitrice de l'hippocampe sur ces neurones (Saphier et Feldman, 1987; Herman et coll, 1992).

En accord avec ces données, il a été rapporté que la stimulation du septum induit une diminution de la sécrétion d'ACTH (Endröczi et Lissak, 1963; Seggie et coll, 1973).

Cependant, le rôle du SL reste ambigu vis-à-vis de la fonction ACTH (Seggie et Brown, 1971), et d'autres études plus récentes viennent contredire ces données. En particulier, une étude menée par Dunn (1987) montre que la stimulation électrique du SLv produit une nette augmentation de la sécrétion d'ACTH.

c -Fonction GH

Borer et coll (1977) ont envisagé un effet inhibiteur du SL sur la sécrétion de GH. Plus récemment, Kato et coll (1988) ont montré que la stimulation électrique du SLml supprime la sécrétion de GH induite par les neurones à GRF. Cette suppression n'est plus observée quand on a préalablement lésé l'aire hypothalamique périvericulaire.

Des expériences électrophysiologiques *in vivo* montrent que le SL relaierait une influence hippocampique inhibitrice sur les neurones à somatostatine (Saphier et Feldman, 1987), localisés dans l'aire hypothalamique périvericulaire. Il est donc possible que le SL agisse sur la fonction GH par l'intermédiaire des neurones à somatostatine.

9 - Fonctions posthypophysaires

Les hormones posthypophysaires, l'ocytocine et la vasopressine, sont sécrétées par les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires dans le lobe postérieur de l'hypophyse, d'où elles gagnent la circulation.

Bien que le SL innerve principalement la périphérie des noyaux magnocellulaires, nombreux arguments électrophysiologiques montrent l'intervention du SL dans l'activité électrique des neurones magnocellulaires eux-mêmes (Sundsten, 1971; Koizumi et Yamashita, 1972; Negoro et coll, 1973; Poulain et coll, 1980, 1981; Pittman et coll, 1981; Lebrun et Poulain, 1982; Ferreyra et coll, 1983; Cirino et Renaud, 1985; Disturnal et coll, 1985; Saphier et Feldman, 1987; Jhamandas et Renaud, 1987).

L'influence du SL semble être de nature inhibitrice, et pourrait se faire par une modulation directe ou indirecte des neurones.

De nombreux travaux, en plus des études électrophysiologiques, font état d'une influence directe du SL sur les neurones magnocellulaires. Des terminaisons septales forment des synapses sur des neurones à vasopressine des noyaux supraoptiques comme des noyaux paraventriculaires (étude ultrastructurale : Oldfield et coll, 1984; étude en microscopie optique : Silverman et Oldfield, 1984, Staiger et Nürnberger, 1991a). Des études électrophysiologiques montrent des relations directes entre le SL et les noyaux supraoptiques : Powell et Rorie, 1967, Tangapregasson et coll, 1974; Zaborsky et coll, 1975.

Il semblerait qu'une partie au moins du tractus septal atteignant les noyaux paraventriculaires soit de nature cholinergique (Oorjitham et coll, 1989).

En rapport avec la sécrétion d'ocytocine, le rôle du SL dans le réflexe d'éjection du lait a été particulièrement bien étudié.

Bien que le SL ne soit pas essentiel à l'expression de ce réflexe (Lebrun et coll, 1983), il semble que l'ocytocine puisse exprimer, au moins en partie, son effet facilitateur dans le réflexe par les neurones du SL.

Les neurones du SLv et du noyau du lit de la strie terminale montrent le même type d'activité que les neurones à ocytocine, c'est-à-dire une activité phasique particulière lors de la tétée, qui provoque l'éjection du lait par les canaux galactophores. L'ocytocine libérée au cours de la tétée dans le SL (Neumann et Landgraf, 1989) agit sur les neurones en facilitant l'activité phasique des neurones à ocytocine (Moos et coll, 1991; Lambert et coll, 1993).

Les neurones du SL pourraient également être le siège de la genèse d' autres effets centraux de l'ocytocine, en particulier dans le comportement sexuel ou maternel (voir Jirikowski, 1989), car ils répondent à l'ocytocine même en l'absence du stimulus de la tétée (Richard et coll, 1991).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

L'ensemble de notre travail a nécessité la mise en oeuvre de trois types de techniques morphofonctionnelles : des techniques de traçage axonal, des techniques de lésion et de stimulation *in vivo* pour la détection du marqueur d'activité Fos et des techniques d'immunohistochimie.

Nous décrivons successivement dans la suite de ce chapitre la préparation des animaux et des tissus, puis le détail des différentes techniques employées.

I - Animaux

La première partie de notre étude a été menée chez des cobayes tricolores femelles de 400 grammes (Cob Labo Cap, Yffignac, France).

La seconde partie a requis l'utilisation de rats Sprague-Dawley mâles de 400 grammes (Iffa Credo, Lyon, France).

A - Anesthésie

Avant toute manipulation ou sacrifice, les animaux sont anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange xylazine/kétamine (Rompun, Bayer, 0,2 ml/kg / Kétalar 50, Parke Davis, 0,4 ml/kg), ou, dans certains cas, par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (Sigma, 50 mg/kg) ou d'uréthane (Sigma, 5 g/kg).

1 - Fixation

Les animaux sont sacrifiés par perfusion intracardiaque de 100 ml d'une solution de NaCl 0,9 % héparinée suivie d'un fixateur aldéhydique (paraformaldéhyde 4 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4), à raison de 800 ml par animal.

Les perfusions sont réalisées à un débit de 40 ml/minute à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex).

Après dissection, les encéphales sont post-fixés par une immersion de deux heures dans le même fixateur. Limités en arrière des corps mamillaires, ils sont alors plongés dans une solution cryoprotectrice (30 % de sucrose dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4) pendant 24 à 48 heures.

2 - Congélation

Les cerveaux sont alors congelés soit :

~ Par une immersion rapide dans un volume d'isopentane refroidi à -35°C par de la carboglace, et enveloppés de papier aluminium.

~ Par une immersion dans de l'isopentane refroidi à -70°C par de l'azote liquide, après enrobage dans du Tissue-Tek (Miles).

Ils sont stockés au congélateur à -80°C .

3 - Confection des coupes histologiques

En règle générale, en raison des traitements ultérieurs qui doivent être réalisés sur des coupes flottantes, nous avons choisi d'effectuer, à l'aide d'un cryotome à glissière (Kryomat 1700, Leitz), des coupes frontales de $40\ \mu\text{m}$ qui sont recueillies dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

Pour les études faisant appel aux traceurs axonaux fluorescents, nous avons préféré réaliser des coupes plus épaisses ($80\ \mu\text{m}$), qui ont été déposées sur des lames gélatinées.

A l'inverse, il a été nécessaire de confectionner des coupes plus fines ($12\ \mu\text{m}$) à l'aide d'un cryostat (2800 Frigocut, Reichert-Jung), dans le cadre de la détection immunocytochimique des récepteurs nucléaires de la progestérone.

II - Techniques de traçage axonal

L'injection des traceurs a été réalisée dans le SL à l'aide de microélectrodes de verre, par pression ou par iontophorèse.

Les microélectrodes sont étirées à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige Scientific Instrument Laboratory) à partir de tubes de verre de 2 mm de diamètre externe. Elles sont recassées sous loupe binoculaire de façon à obtenir un diamètre de 40 à $60\ \mu\text{m}$ à la pointe.

A - Stéréotaxie

1 - Chez le cobaye

Les traceurs sont injectés dans le SL selon les repères stéréotaxiques tirés de l'atlas de Poulain (1974) :

- dans l'axe antéropostérieur : 13 mm en avant de l'axe interauriculaire
- dans l'axe latéral : 1,4 mm à droite de la scissure interhémisphérique
- dans l'axe vertical : 5,3 mm sous la surface du cerveau, appréciée au niveau de la dure-mère.

2 - Chez le rat

Les repères stéréotaxiques choisis pour atteindre le SL du rat sont basés sur les coordonnées de l'atlas de Paxinos et Watson (1986) :

- dans l'axe antéropostérieur : 23,4 mm en avant de l'axe interauriculaire
- dans l'axe latéral : 0,9 mm à droite de la scissure interhémisphérique
- dans l'axe vertical : 5 mm en profondeur à partir de la surface du cortex.

B - Traceurs axonaux fluorescents

1 - Dextran couplé à la tétraméthylrhodamine

Le Fluoro-Ruby (F-R : Schmued et coll, 1990) est un dextran d'un poids moléculaire de 10.000 Da, couplé à une rhodamine fluorescente (Molecular Probes, D-1817). Il est véhiculé par transport axonal et observé en microscopie de fluorescence (Zeiss Axiophot) à l'aide des filtres pour la rhodamine (tableau N° 1).

2 - Fluoro-Gold

Le Fluoro-Gold (F-G : Schmued et Fallon, 1986) est un traceur axonal rétrograde fluorescent, visible sous excitation U.V (tableau N° 1).

3 - Modes d'injection

a - Injection par pression

Une solution de F-R (5 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 : 15 cobayes), ou de F-R associé au F-G (5 % F-R +2 % F-G, dans le même tampon : 4 cobayes) est injectée dans le SL.

L'électrode est reliée par un cathéter souple à une seringue Hamilton de 0,5 µl. L'ensemble du système est rempli d'huile de paraffine et un petit volume de la solution à injecter est prélevé par aspiration. Les volumes délivrés sont de 50 à 200 nl.

b - Injection par iontophorèse

Sept cobayes ont reçu une injection de F-R (10 % dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,4) dans le SL par passage d'un courant iontophorétique positif de 5 µA, appliqué par sessions de 4 secondes toutes les 8 secondes, pendant 15 à 20 minutes (stimulateur isolé A360, WPI).

Lorsque le F-R est associé au F-G (10 % F-R + 2 % F-G dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,4), l'intensité du courant d'iontophorèse est portée à 10 µA. 8 cobayes ont reçu une telle injection dans le SL.

4 - Traitement ultérieur

Pour permettre la migration des traceurs, la durée de survie varie de 5 jours (dans le cas d'une injection double) à 11 jours (quand le F-R est injecté seul).

Après ce laps de temps, les cobayes sont anesthésiés (xylazine/kétamine) et perfusés (description paragraphe IB1). Les coupes de 80 µm sont recueillies sur des lames gélatinées.

Après séchage, elles sont déshydratées dans des bains d'alcools de degrés croissants, imprégnées de toluène, puis montées entre lame et lamelle au Fluoromount (Gurr). Elles sont stockées à 4°C et à l'obscurité.

Elles sont examinées en microscopie optique à épifluorescence (Axiophot, Zeiss).

Tableau N°1 : Caractéristiques des filtres utilisés pour les observations en fluorescence, réalisées à l'aide du microscope Axiophot (Zeiss).

| Fluorochrome | Filtre d'excitation | Diviseur chromatique | Filtre d'arrêt |
|------------------------------|---------------------|----------------------|----------------|
| Fluoro-Ruby Texas-Red | BP 546 | FT 560 | BP 575-640 |
| Fluoro-Gold Granular Blue | G 365 | FT 395 | LP 420 |
| Fluorescéine (FITC) | BP 450-490 | FT 510 | BP 515-565 |

C - Traceur axonal couplé à la biotine

D'un poids moléculaire équivalent à celui du F-R (10.000 Da), un dextran couplé à une molécule de biotine (Molecular Probes, D-1956) en possède les mêmes propriétés de transport axonal. Ce traceur est utilisé en solution à 10 % dans du tampon phosphate 0,01 M pH 7,6. Il est délivré dans le SL de 15 rats par passage d'un courant d'iontophorèse positif de 5 μ A, appliqué par sessions de 4 secondes toutes les 8 secondes, pendant 20 minutes (stimulateur isolé A360, WPI).

La durée de survie des animaux varie de 7 à 25 jours, sans que la qualité du marquage ne soit modifiée.

1 - Préparation du tissu pour la microscopie optique

Après anesthésie (xylazine/kétamine) et perfusion du rat, des coupes flottantes de 40 μ m sont recueillies dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 et traitées par immunocytochimie.

Pour la mise en évidence de la biotine, les coupes sont incubées pendant une heure dans un kit avidine-biotine-peroxydase (kit Vectastain Elite, Vector), selon les proportions indiquées par le fabricant (2 gouttes de solution A + 2 gouttes de solution B + 5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 + 0,25 % de Triton X-100 (Sigma)).

La peroxydase est ensuite révélée par une incubation de 10 minutes, dont l'évolution est suivie sous le microscope, dans une solution de diaminobenzidine (DAB) (Sigma), additionnée ou non de Nickel ammonium sulfate (5 mg de DAB + 10 mg de Nickel dans 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, filtrés, puis additionnés de 30 μ l d'eau oxygénée à 30

%). La réaction est stoppée par un rinçage dans de l'eau distillée ou du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

Le produit de réaction apparaît brun (DAB seule), ou noir (DAB + Nickel).

Les coupes, colorées ainsi de façon permanente, sont montées sur des lames gélatinées, puis séchées, déshydratées dans des bains d'alcools de degrés croissants, délipidées dans le toluène et montées entre lame et lamelle à l'Eukitt (Kindler).

Elles sont observées en lumière blanche (Axiophot, Zeiss).

2 - Préparation du tissu pour la microscopie électronique

Pour l'examen ultrastructural des neurones marqués par le dextran biotinylé, 5 rats sont perfusés par une solution fixatrice différente. Cette solution contient 2 % de paraformaldéhyde, 0,2 % d'acide picrique et 0,5 % de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

Des coupes de 80 µm confectionnées au vibratome après la fixation sont incubées toute la nuit dans le kit avidine-biotine-peroxydase (dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,03 % de Triton X-100) et révélées par la DAB, selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent.

Les coupes sont alors post-fixées 30 minutes dans du tétr oxyde d'osmium (1 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4).

Après rinçages, elles sont déshydratées par passage dans une série d'alcools de degrés croissants.

Elles sont transférées 20 minutes dans de l'oxyde de propylène (Merck) puis 10 minutes dans un mélange moitié oxyde de propylène-moitié araldite.

Les coupes sont alors incluses à plat sur des galettes d'araldite. Cette résine polymérise en étuve à 56°C sur la nuit.

Des coupes semi-fines (2 µm) puis ultrafines (80 nm) sont réalisées à l'ultramicrotome (Ultracut, Reichert). Ces dernières sont déposées sur des grilles de Nickel de 100 mesh membranées et colorées au citrate de Plomb, pour être observées au microscope électronique (Zeiss 902) et photographiées (Kodak 4489).

D - Traceurs axonaux viraux

Différentes souches virales d'Herpes-simplex-virus de type I (HSV-1) ont été produites par le Dr A. Epstein (Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université de Lyon I, Villeurbanne).

Il s'agit des souches :

- F (souche virulente sauvage)
- 17 (souche virulente recombinée)
- 17(Δ 42) (souche 17 défective pour la réplication)

Des aliquots congelés de ces solutions virales, dont le titre avait été préalablement déterminé, nous ont été fournis (F : 10^9 PFU/ml; 17 : $4 \cdot 10^9$ PFU/ml; 17(Δ 42) : $4 \cdot 10^9$ PFU/ml).

Ces solutions sont injectées par pression dans le SL de 15 rats anesthésiés (xylazine/kétamine). L'injection est réalisée avec une seringue Hamilton de 0,5 μ l dont le corps est relié à une aiguille jetable (Terumo, diamètre externe 0,45 μ m) sur laquelle est scellée une microélectrode de verre d'un diamètre de 40 à 60 μ m à la pointe.

- ~ 7 rats ont reçu 1 μ l de la souche F
- ~ 6 rats ont reçu 1 μ l de la souche 17
- ~ 1 rat a reçu 1 μ l de F dans le SL droit et 1 μ l de 17(Δ 42) dans le SL gauche
- ~ 1 rat a reçu 1 μ l de 17 dans le SL droit et 1 μ l de 17(Δ 42) dans le SL gauche.

Après une survie de 1 à 3 jours, les animaux sont anesthésiés (xylazine/kétamine) et perfusés.

Les coupes flottantes de 40 μ m sont ensuite traitées par immunocytochimie à l'aide de deux anticorps primaires différents :

- ~ Anticorps monoclonal de souris anti-HSV-1 (clone 1BD4, Biosys), ou
- ~ Anticorps polyclonal de lapin anti-HSV-1 (Dako)

Un anticorps secondaire biotinylé est ensuite utilisé, amplifié par une incubation dans le kit avidine-biotine-peroxydase, dont la peroxydase est révélée par la DAB (Protocole décrit dans le paragraphe IIC1).

III - Techniques de lésion et de stimulation pour la détection du marqueur d'activité Fos

Des expériences préliminaires ont été réalisées chez 10 cobayes, puis ont été poursuivies chez 80 rats.

A - Lésions du SL

Des lésions électrolytiques du SL sur 15 rats anesthésiés (xylazine/kétamine) ont été réalisées par stéréotaxie.

Un courant négatif de 3 mA, délivré par un stimulateur isolé (A 360, WPI), est appliqué pendant 10 secondes, au travers d'une aiguille de dentiste (diamètre externe : 0,5 mm) vernie et mise à nu sur 0,5 à 1 mm à la pointe.

La durée de survie des animaux varie de 90 minutes à 8 jours après le traitement. Les rats sont ensuite anesthésiés (xylazine/kétamine) et perfusés.

B - Stimulations du SL

1 - Stimulation chimique

Des solutions de glutamate 1 M (Sigma : 2 rats), NMDA + acide kainique 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M (Sigma : 2 + 2 + 2 rats) ou de vasopressine 10^{-6} M (Sigma : 2 rats) sont injectées dans le SL après anesthésie (xylazine/kétamine). Des volumes de l'ordre de 100 nl sont délivrés à l'aide d'une seringue Hamilton reliée à une microélectrode de verre (Protocole décrit dans le paragraphe IID).

La vasopressine est également injectée par iontophorèse (0,15 mM en solution dans du NaCl 0,15 M pH 4,5 : 2 rats); elle est expulsée par un courant positif de 80 nA pendant 20 minutes (stimulateur isolé A 360, WPI).

Les rats sont laissés en survie 2 heures après l'injection.

2 - Stimulation électrique

a - Chez l'animal éveillé

Une électrode bipolaire torsadée en acier (Plastics One) portant une fiche femelle est implantée dans le SL de 10 rats anesthésiés (xylazine/kétamine), puis scellée à la boîte

crânienne par une calotte de ciment dentaire. Chaque pôle des électrodes a un diamètre de contact de 0,45 mm, mis à nu sur une longueur de 0,25 mm.

La semaine suivante, les rats sont quotidiennement habitués à être sortis de leur cage et sont reliés par une fiche connectée à un générateur d'impulsions (Enertec 4415) et à un stimulateur isolé (A 360, WPI), de telle sorte qu'ils restent libres de leurs mouvements.

Le huitième jour, les stimulateurs délivrent un courant électrique sous forme d'impulsions rectangulaires dont les paramètres sont les suivants :

- ~ Intensité : 300 μ A
- ~ Fréquence : 50 Hz
- ~ Durée : 0,5 ms
- ~ Durée totale : 30 minutes

Deux heures après le début de la stimulation, les animaux sont anesthésiés (xylazine/kétamine) et immédiatement perfusés.

b - Chez l'animal anesthésié

Différents anesthésiques sont utilisés:

- ~ mélange xylazine/kétamine : 20 rats
- ~ pentobarbital sodique : 10 rats
- ~ uréthane : 10 rats.

Les 40 rats anesthésiés sont stimulés par la descente ponctuelle par stéréotaxie d'électrodes bipolaires en acier (Rhodes Medical) dans le SL. Chaque pôle des électrodes a un diamètre de contact de 0,2 mm, les contacts sont séparés de 0,5 mm et mis à nu sur 0,2 mm.

Les stimulateurs délivrent un courant électrique sous forme de trains d'impulsions rectangulaires dont les paramètres sont les suivants :

- ~ Intensité : 50 à 400 μ A
- ~ Fréquence : 20 ou 50 Hz
- ~ Durée: 0,5 ms
- ~Durée des trains d'impulsions : 5 secondes toutes les 10 secondes
- ~ Durée totale : 60 minutes

Les rats sont perfusés deux heures après le début de la stimulation.

C - Détection de la protéine Fos

La réaction immunocytochimique de la protéine Fos est réalisée sur des coupes flottantes de 40 µm, dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,25 % de Triton X-100.

Deux anticorps primaires polyclonaux différents sont utilisés :

~ Anticorps de lapin anti-Fos (Oncogene Science)

~ Anticorps de mouton anti-Fos (Cambridge Research Biochemicals)

Ils sont dirigés contre la séquence N-terminale 4-17 de la protéine.

Les coupes sont incubées sous agitation à 4°C pendant 24 heures dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant anticorps primaire (1/5000^{ème}) + sérum normal d'âne (1/100^{ème}).

Après rinçages, elles sont transférées 1 heure dans l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin biotinylé quand l'anticorps primaire est fabriqué chez le lapin, ou d'âne anti-mouton biotinylé quand l'anticorps primaire est fabriqué chez le mouton (1/100^{ème} dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4) (Jackson Immunoresearch).

Après rinçages, les coupes sont mises à incuber 2 heures dans le kit avidine-biotine-peroxydase.

La peroxydase est révélée par une réaction à la DAB couplée au Nickel (décrite dans le paragraphe IIC1).

Les coupes sont étalées sur des lames gélatinées, séchées, déshydratées et montées à l'Eukitt (Kindler).

D - Détection simultanée de la protéine Fos et du dextran biotinylé

Cinq rats reçoivent une injection iontophorétique de dextran biotinylé dans le SL, suivie, dix jours plus tard, d'une stimulation électrique (sous anesthésie au pentobarbital sodique) de la même région.

La détection simultanée de la protéine Fos et du traceur s'effectue de la manière suivante :

~ 2 heures d'incubation dans le kit avidine-biotine-peroxydase, rinçages

~ Révélation par la DAB couplée au Nickel, rinçages

~ 12 heures dans l'anticorps primaire mouton anti-Fos (1/400^{ème} dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 + 0,25 % Triton X-100 + 1 % sérum normal d'âne), rinçages

~ 2 heures d'incubation dans l'anticorps secondaire âne anti-mouton (1/100^{ème} dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 + 0,25 % Triton X-100), rinçages

~ 2 heures d'incubation dans le kit avidine-biotine-peroxydase, rinçages

~ Révélation de la peroxydase par une réaction à la DAB seule (décrite dans le paragraphe IIC1).

IV - Techniques d'identification de différentes populations neuronales

A - Identification des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires

1 - Détection des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires

20 cobayes ont reçu sous anesthésie (xylazine/kétamine) une injection intracardiaque de F-G ou de Granular-Blue : G-B (EMS Polyloy), traceurs axonaux rétrogrades fluorescents.

3 mg de traceur sont dissous dans 300 µl de sérum physiologique (NaCl 0,9 %).

Après sonification, le traceur est injecté à l'aide d'une seringue de 1 ml dans l'espace intercostal entre la quatrième et la cinquième côte, de manière à atteindre le ventricule gauche du cœur.

Les animaux sont anesthésiés de nouveau (xylazine/kétamine) et perfusés, cinq jours après l'injection.

Les encéphales sont congelés et des coupes frontales de 80 µm sont réalisées au cryotome.

Les neurones marqués sont observés en microscopie de fluorescence, à l'aide des filtres appropriés, qui sont identiques pour le F-G et le G-B (tableau N°1).

2 - Détection simultanée des efférences septales par le F-R et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires par le F-G ou le G-B

Les 20 cobayes anesthésiés (xylazine/kétamine) ont reçu dans le SL une injection iontophorétique de F-R (décrite dans le paragraphe IIB3b), suivie, six jours plus tard, d'une injection intracardiaque de F-G ou de G-B (décrite dans le paragraphe précédent).

L'examen des coupes au microscope à fluorescence permet d'observer alternativement les fibres marquées par le F-R et les neurones marqués par le F-G ou le G-B à l'aide des filtres appropriés, dont les caractéristiques sont données dans le tableau N°1.

B- Identification des neurones possédant les récepteurs de la progestérone

1 - Détection des neurones possédant les récepteurs de la progestérone

L'identification des neurones possédant les récepteurs à la progestérone a été réalisée sur 5 cobayes de 200 g, ovariectomisés et traités à l'oestradiol. L'animal reçoit quotidiennement, pendant 5 jours, une injection sous-cutanée de 10 µg de 17β-oestradiol (Sigma). L'hormone est dissoute à raison d'1 mg pour 100 µl d'alcool absolu, puis mélangée à 25 ml d'huile de sésame. Ce traitement induit l'expression des récepteurs de la progestérone.

La mise en évidence des récepteurs nécessite l'utilisation d'un fixateur particulier, le P.A.F (Picric Acid Formaldehyde, Stefanini et coll, 1967), composé de 2 % de paraformaldéhyde + 0,4 % d'acide picrique dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4.

Après anesthésie (xylazine/kétamine) et perfusion de l'animal, les cerveaux sont congelés puis débités en coupes de 12 µm au cryostat. Les coupes sont déposées sur des lames gélatinées.

Les lames portant les coupes réalisées dans la région de l'aire préoptique et du noyau arqué subissent le traitement immunocytochimique suivant :

~24 heures d'incubation à 4°C avec un anticorps monoclonal de souris anti-récepteur de la progestérone (Let 64), dilué à 3 µg/ml dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 + 5 % sérum normal de mouton, rinçages

~ 90 minutes d'incubation à 4°C avec un anticorps secondaire mouton anti-souris biotinylé (Amersham), dilué au 1/30^{ème}, rinçages

~ 90 minutes d'incubation à 4°C avec une streptavidine couplée au Texas-Red (Amersham), diluée au 1/60^{ème}, rinçages.

Les lames sont montées avec un mélange constitué de 90 ml de glycérine + 10 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,9 % NaCl + 100 mg de para-phénylène diamine (Sigma), selon le protocole de Platt et Michael (1983). Ce milieu empêche la rapide extinction de la fluorescence, qui se produit lorsque la glycérine est employée seule.

Les coupes sont observées en microscopie de fluorescence avec les filtres utilisés pour le F-R (tableau N°1).

2 - Détection simultanée des efférences septales par le F-R et des neurones possédant les récepteurs de la progestérone

Les 5 cobayes anesthésiés (xylazine/kétamine) ont reçu dans le SL une injection de F-R (décrite dans le paragraphe IIB3b), puis ont subi, 3 jours après, une ovariectomie suivie du traitement à l'oestradiol. Ils sont anesthésiés (xylazine/kétamine) et perfusés à la fin du traitement.

L'examen des coupes au microscope de fluorescence permet d'observer simultanément les fibres marquées par le F-R et les noyaux des neurones marqués par le Texas-Red, à l'aide des filtres utilisés pour le F-R (tableau N° 1).

C - Identification des neurones à LHRH

1 - Détection des neurones à LHRH

Les neurones à LHRH sont détectés à l'aide d'un anticorps primaire produit chez le lapin par le Pr. G. Tramu (Université de Bordeaux I); ils sont révélés ensuite par une deuxième réaction avec un anticorps secondaire d'âne anti-lapin marqué à la fluorescéine.

Dans notre étude, ce marquage est associé soit à la détection des efférences septales par le dextran biotinylé, soit à la détection des populations neuronales activées après stimulation électrique du SL.

2 - Détection simultanée des efférences septales par le dextran biotinylé et des neurones immunoréactifs pour la LHRH

7 rats sont traités comme indiqué dans le paragraphe IIC1.

Les coupes flottantes de 40 µm subissent le traitement suivant (sous agitation):

~ 2 heures d'incubation dans le kit avidine-biotine-peroxydase, rinçages

~ Révélation à la DAB, rinçages

~ 12 heures d'incubation à 4°C dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,25 % de Triton X-100 + 1 % de sérum normal d'âne + l'anticorps primaire lapin anti-LHRH (1/1500^{ème}), rinçages

~ 90 minutes d'incubation dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,25 % de Triton X-100 + l'anticorps secondaire âne anti-lapin marqué à la fluorescéine (1/150^{ème}), rinçages.

Les lames sont montées avec le mélange constitué de 90 ml de glycérine + 10 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,9 % NaCl + 100 mg de para-phénylène diamine.

Le microscope à fluorescence permet d'alterner l'observation des fibres marquées par le dextran, en lumière blanche, et l'observation des neurones à LHRH en fluorescence, à l'aide des filtres pour la fluorescéine (tableau N°1).

3 - Détection simultanée des neurones activés qui expriment Fos après stimulation électrique du SL et des neurones à LHRH

Trois rats sont traités comme indiqué dans le paragraphe IIIA2b.

Les coupes flottantes de 40 µm subissent le traitement suivant (sous agitation):

~ 12 heures d'incubation à 4°C dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,25 % de Triton X-100 + 1 % de sérum normal d'âne + l'anticorps primaire mouton anti-Fos (1/4000^{ème}) + l'anticorps primaire lapin anti-LHRH (1/1500^{ème}), rinçages

~ 90 minutes d'incubation dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,25 % de Triton X-100 + les anticorps secondaires âne anti-mouton biotinylé (1/150^{ème}) et âne anti-lapin marqué à la fluorescéine (1/150^{ème}), rinçages

~ 2 heures d'incubation dans le kit avidine-biotine-peroxydase, rinçages

~ Révélation à la DAB associée au Nickel, rinçages.

Les lames sont montées avec le mélange constitué de 90 ml de glycérine + 10 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,9 % NaCl + 100 mg de para-phénylène diamine.

Le microscope à fluorescence permet d'alterner l'observation des neurones exprimant la protéine Fos, en lumière blanche, et l'observation des neurones à LHRH en fluorescence, à l'aide des filtres pour la fluorescéine (tableau N°1).

RESULTATS

RESULTATS

I - Etude de la distribution des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le cobaye par transport axonal antérograde de Fluoro-Ruby

22 cobayes ont reçu dans le SL une injection unilatérale de Fluoro-Ruby (F-R), traceur axonal fluorescent pour la rhodamine. 12 cobayes ont reçu une injection unilatérale de F-R combiné à du Fluoro-Gold (F-G), qui est un traceur axonal fluorescent, visible en lumière ultra-violette.

Le F-R est utilisé ici pour ses propriétés de transport axonal antérograde, c'est-à-dire du corps cellulaire vers les terminaisons, dans le but d'établir la distribution des afférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus.

Le F-G, connu pour ses excellentes propriétés de transport axonal rétrograde, c'est-à-dire de la terminaison vers le corps cellulaire, après incorporation dans les terminaisons nerveuses intactes ou lésées (Schmued et Fallon, 1986), donne lieu à un marquage extensif des afférences septales.

L'addition de F-G au F-R a pour but de déterminer, en provoquant le marquage des neurones du noyau magnocellulaire dorsal, si l'injection est centrée dans la région du SLml, zone de projection exclusive de ce noyau.

A - Description du site d'injection

1 - Localisation du site d'injection

Dix des 34 cobayes injectés ont été sélectionnés en fonction de l'emplacement du site d'injection (répertoriés sur la Fig.1) et de la qualité du marquage observé.

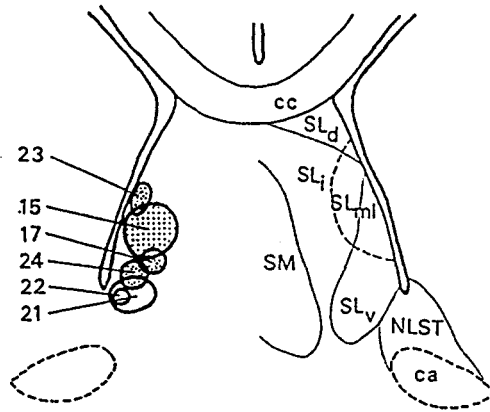
L'emplacement du site d'injection permet de répartir les animaux en deux groupes.

~ Dans un premier groupe, l'injection est centrée dans le SLml (sites hachurés sur la Fig.1; Fig. 2B₁, 3A).

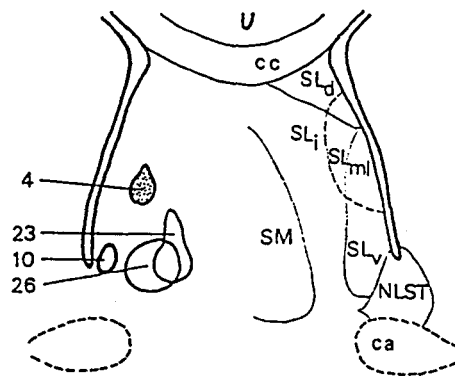
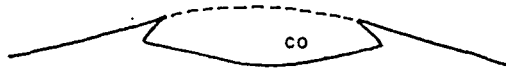
Figure 1 : Représentation schématique des sites d'injection de F-R, seul ou associé au F-G, sur 2 plans frontaux du septum du cobaye.

Les injections sont centrées dans le SLml (cercles grisés) ou sont plus ventrales, dans le SLml/v (cercles vides).

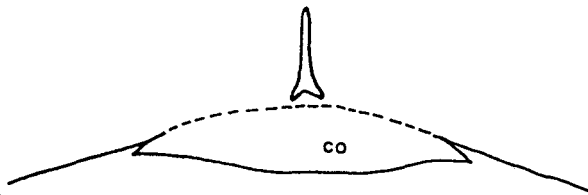
La coordonnée antéro-postérieure de l'atlas stéréotaxique de référence (Poulain, 1974) est indiquée en bas à gauche des schémas.



AP 13.4



AP13



~ Dans un second groupe, l'injection est située plus ventralement, à la base du ventricule latéral, et recouvre alors partiellement le SLml et le SLv (sites clairs sur la Fig. 1; Fig. 2A); dans ce cas, le terme SLml/v sera employé pour désigner cette région.

2 - Aspect du site d'injection

Les injections de F-R, ou de F-R combiné au F-G réalisées par pression (respectivement, sur 17 et 5 cobayes), produisent, au centre du site, une petite lésion autour de laquelle les corps cellulaires ayant incorporé le(les) traceur(s) sont visibles. La zone de diffusion du (des) traceur(s) est peu étendue (200 μm), et les neurones marqués sont plus nombreux au centre du site que dans sa périphérie. L'expulsion du(des) traceur(s) en solution provoque également le marquage, en nombre limité, de neurones situés le long du trajet de l'électrode.

La taille du site obtenu après injection par microiontophorèse est proportionnelle à l'intensité du courant appliqué. C'est pourquoi les spots observés après l'application iontophorétique de F-R seul (15 animaux), réalisée par le passage d'un courant iontophorétique de faible intensité, sont petits et présentent un diamètre moyen de 100 μm (Fig. 2A, 3A). Aucune lésion n'est observée au centre de l'injection, et les neurones dont le péricaryon et l'appareil dendritique ont incorporé le F-R apparaissent parfaitement bien délimités et forment un groupe restreint dénombrable, comprenant 50 à 200 neurones dans toute son étendue antéro-postérieure.

En revanche, les injections iontophorétiques réalisées avec des courants de plus forte intensité, en l'occurrence lors de l'application combinée de F-R et de F-G (4 cobayes), produisent un spot plus large (400 μm), au milieu duquel apparaît une importante aire de nécrose (Fig. 2B₁-B₂).

Au cours de ces doubles injections, le F-R diffuse plus largement dans le tissu que lors d'une injection simple (Fig. 2B₁), produisant une zone opaque intensément fluorescente dans laquelle on ne peut discerner de cellules individuelles, sauf en périphérie du site. Le F-G diffuse plus que le F-R (Fig. 2B₂).

B - Description du marquage obtenu avec le F-R

Après son application dans le SL, le F-R est transporté majoritairement par voie antérograde dans les axones des neurones dont les corps cellulaires l'ont incorporé. Il est également, en moindre part, incorporé par des terminaisons nerveuses au niveau du site et

Figure 2 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus du cobaye observées en fluorescence après injection de F-R et de F-G dans le SL.

A : L'injection iontophorétique de F-R conduit à l'incorporation du traceur par un ensemble restreint de neurones du SLml/v (flèches).

Noter la présence de nombreux péricytes marqués consécutivement à l'injection.

B1-B2 : L'injection iontophorétique d'un mélange F-R + F-G dans le SLml provoque une nécrose du tissu au centre du site.

Noter que l'aire de diffusion du F-G (B2) est plus étendue que celle du F-R (B1).

C : Après observation à fort grossissement, les fibres marquées par transport antérograde du F-R présentent de nombreux boutons " en passant " ainsi que des arborisations terminales.

D1-D2 : L'injection du mélange F-R + F-G centrée dans le SLml (B1-B2) permet d'observer dans le noyau magnocellulaire dorsal, dorsomédian par rapport au fornix (f), les corps cellulaires des neurones marqués par transport rétrograde, tant par le F-R (D1) que le F-G (D2) (flèches).

E : Dans l'aire préoptique, les fibres issues du SL se terminent dans la périphérie dorsomédiane du noyau supraoptique ipsilatéral (grandes flèches), mais sont rarement présentes au sein-même du noyau (petites flèches).

F : Dans l'hypothalamus médiobasal, les efférences septales se distribuent (grandes flèches) dans la zone pauvre en cellules séparant le noyau ventromédian (NVM) du noyau arqué (NA), évitant pour l'essentiel les noyaux eux-mêmes.

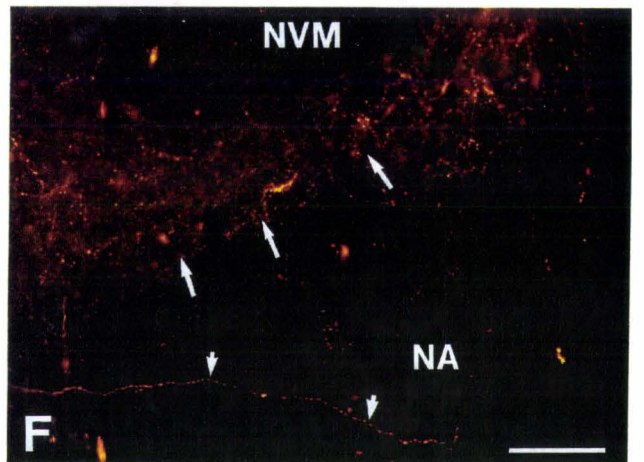
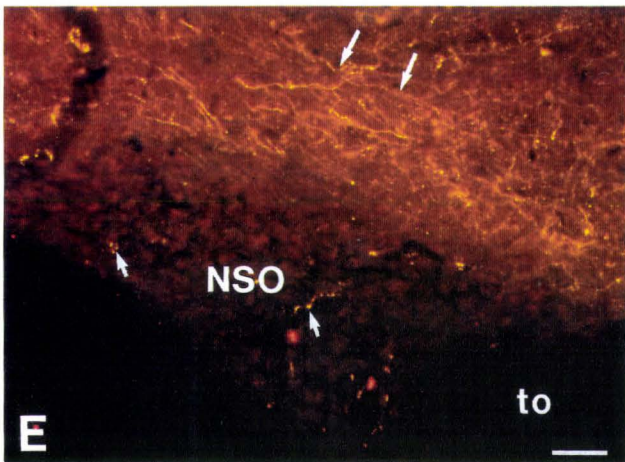
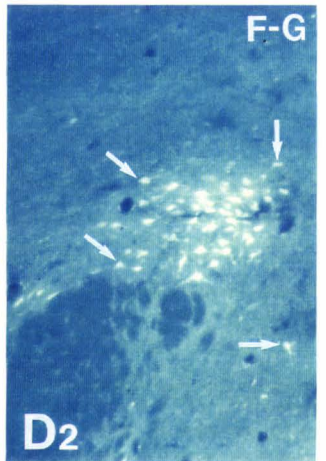
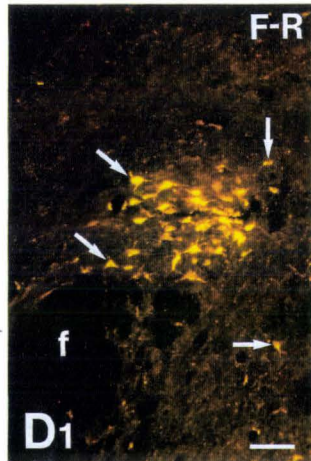
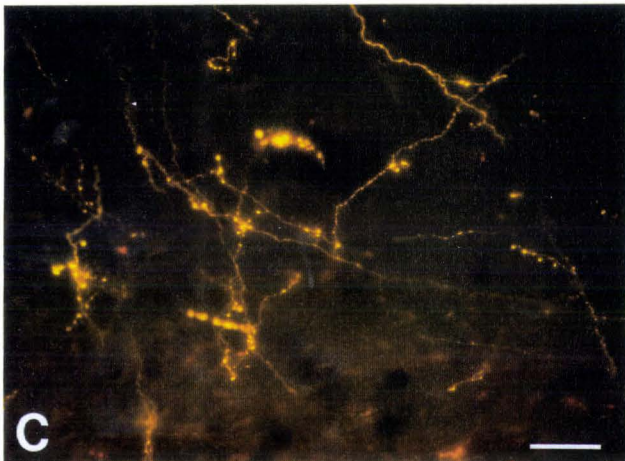
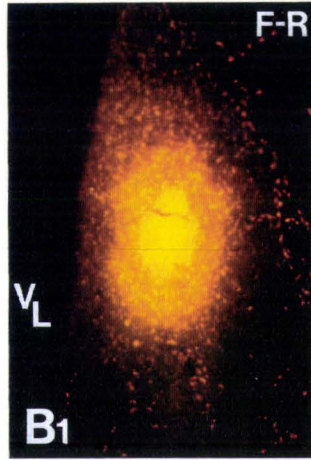
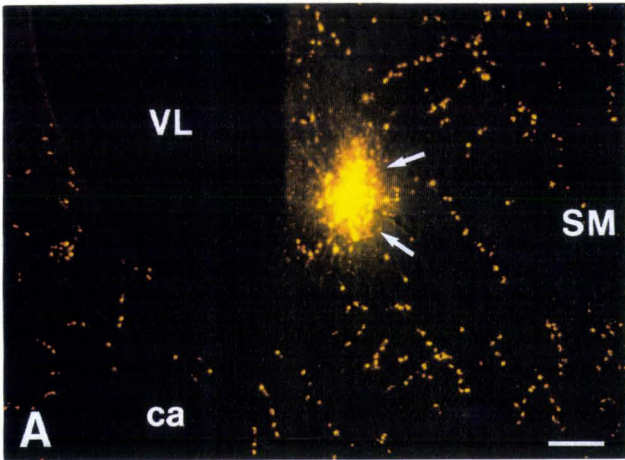
Noter cependant la présence d'une fibre septale variqueuse dans le noyau arqué (petites flèches), celle-ci semblant provenir de l'hypothalamus latéral.

Barres de calibration : 400 μm en A pour A, B1, B2

30 μm en C

150 μm en D1 pour D1, D2

50 μm en E et F.



acheminé par voie rétrograde jusqu'aux corps cellulaires des neurones se projetant dans le SLml.

1 - Composante antérograde

Le F-R, véhiculé par transport antérograde dans les neurones, visualise les axones marqués sous forme de fibres très lumineuses présentant la même intensité de marquage sur tout leur trajet (Fig 2C, 2E-F).

Les punctuations observées sur ces fibres correspondent à des boutons " en passant ", figurant probablement des contacts synaptiques avec d'autres éléments neuronaux. De plus, l'axone se ramifie pour former des plexus denses de fibres associées à de nombreux boutons terminaux.

2 - Composante rétrograde

Après injection de F-R, quelques corps cellulaires sont fluorescents dans l'aire préoptique et l'hypothalamus à la suite du transport rétrograde de F-R (Fig. 2D₁).

Ce marquage se caractérise par des granules brillants ressemblant à des lysosomes, qui sont observés dans le cytoplasme. Le nombre de corps cellulaires marqués est proportionnel à l'étendue de l'injection de F-R dans le SL, et en particulier à l'ampleur de la nécrose observée au niveau du site, lorsque des courants d'iontophorèse de forte intensité sont employés.

C - Description du marquage obtenu avec le F-R couplé au F-G

L'addition de F-G à la solution de F-R avait pour but de déterminer si la région du SL dont les efférences devaient être examinées dans le diencephale était celle qui recevait l'innervation enképhalinergique en provenance du noyau magnocellulaire dorsal hypothalamique.

Dans le cas d'injections de F-R et de F-G en mélange, les cellules marquées par transport rétrograde sont observées principalement dans l'aire hypothalamique latérale, et plus rarement, dispersées dans l'aire préoptique, l'aire comprise entre le fornix et le troisième ventricule, dans le noyau arqué et dans la région prémamillaire.

Le nombre de neurones marqués dans le noyau magnocellulaire dorsal est important quand l'injection est centrée dans le SLml (Fig. 2D₁-D₂). Lorsqu'elle est plus ventrale, et

concerne plutôt le SLml/v, l'ampleur de ce marquage rétrograde est moindre. Les neurones du noyau magnocellulaire dorsal sont marqués, non seulement par le F-G, mais aussi par le F-R. Il s'avère donc que la composante rétrograde du transport de F-R suffit, même lorsque les sites d'injection sont restreints, à caractériser la région concernée par l'injection.

Il apparaît donc que, quelle que soit la localisation du site d'injection dans le SL, (SLml ou SLml/v), une partie au moins des cellules dont on marque les efférences sont susceptibles d'être la cible du noyau magnocellulaire dorsal.

D- Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus

La distribution des fibres issues du site d'injection situé dans le SLml et marquées par transport antérograde de F-R dans l'hypothalamus est présentée, à partir d'un animal représentatif, dans la Fig.3A-H, sur des plans frontaux espacés régulièrement tirés de l'atlas de Poulain (1974).

La projection observée est très essentiellement homolatérale (Fig. 3A-H).

Les fibres issues du site se dirigent verticalement, vers le bas, contournent médialement la commissure blanche antérieure en empruntant les bandelettes diagonales de Broca verticales puis horizontales, pour gagner les régions postérieures (Fig. 3A-B).

Au cours de ce trajet, quelques fibres décussent en haut du troisième ventricule, si bien qu'une partie de la projection s'effectue de manière contralatérale. Toutefois, le marquage observé du côté opposé à l'injection se limite à quelques fibres et terminaisons éparses, essentiellement retrouvées dans les régions correspondant aux régions homolatérales densément marquées, comme l'aire préoptique, l'aire périfornicale, la région subparaventriculaire, la périphérie du noyau arqué et la région prémamillaire (Fig. 3A-H).

1 - Trajets empruntés par les fibres septales

Du côté homolatéral à l'injection, les fibres septales poursuivent leur route dans l'hypothalamus en suivant trois voies différentes :

~ Une partie d'entre elles se dirigent latéralement et rejoignent le faisceau médian du télencéphale, d'où elles émergent pour innerver l'aire préoptique ventrolatérale et, plus postérieurement, les aires latérales de l'hypothalamus.

Figure 3 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de F-R dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, après injection iontophorétique de F-R dans le SLml (animal 17 représenté dans la Fig. 1), sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

Les fibres issues du site d'injection (A) prennent une direction ventrale pour innover essentiellement les aires ipsilatérales à l'injection (B-H). Les efférences septales se projettent massivement dans l'aire préoptique (APO, B-C) et l'hypothalamus antérieur (AHA, D) latéral et médian, en particulier l'aire préoptique antérodorsale (B), puis dorsalement au noyau supraoptique (NSO, C), et, plus postérieurement, dans le noyau alaire (NAI, D). Elles évitent les noyaux supraoptique (C), ventromédian (NVM) et paraventriculaire (NPV, D).

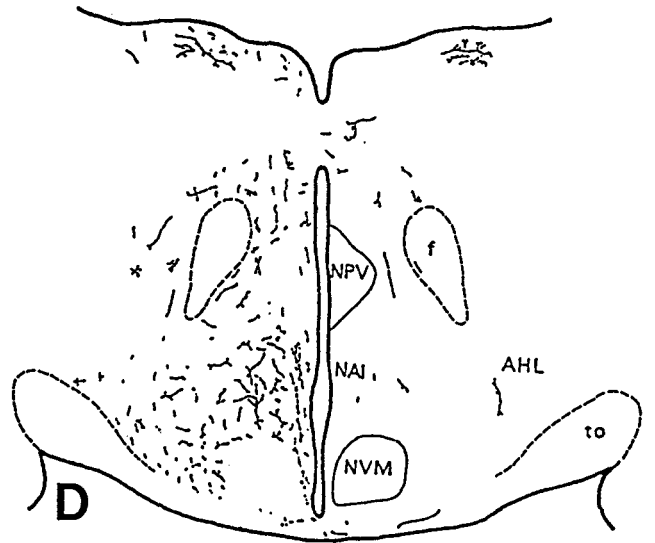
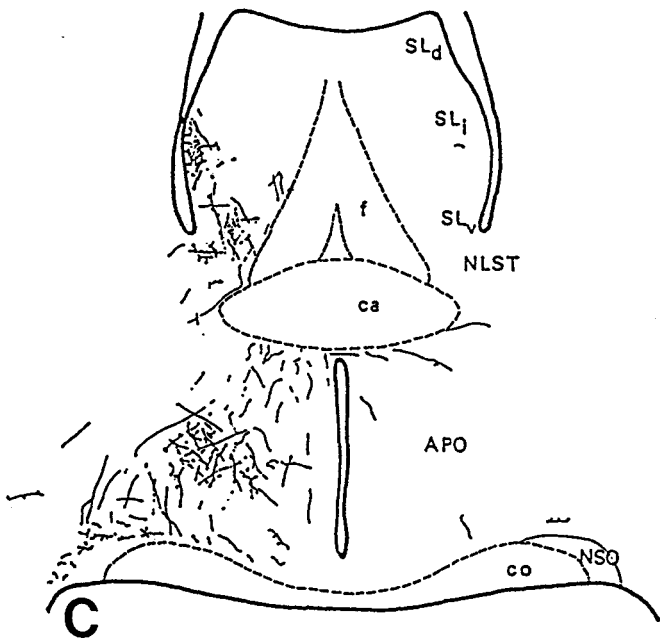
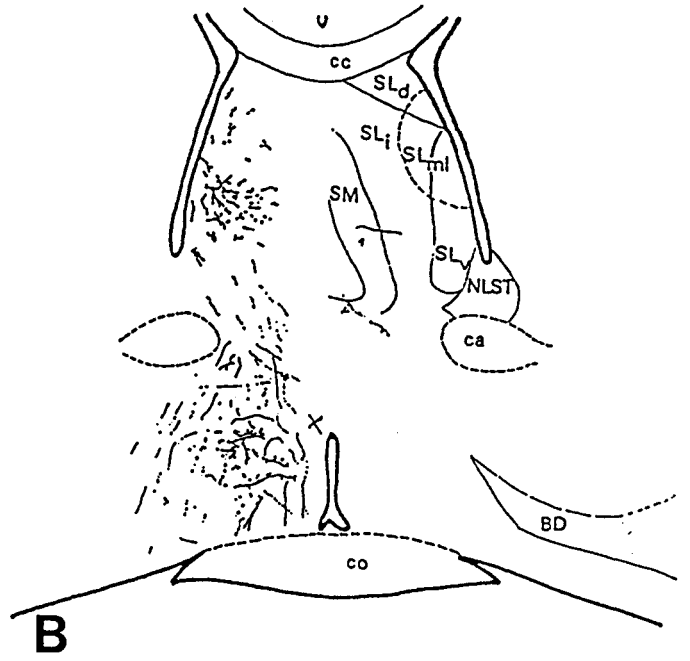
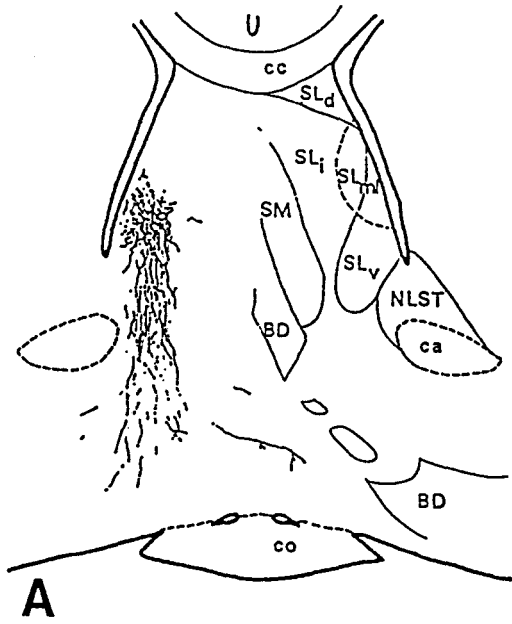
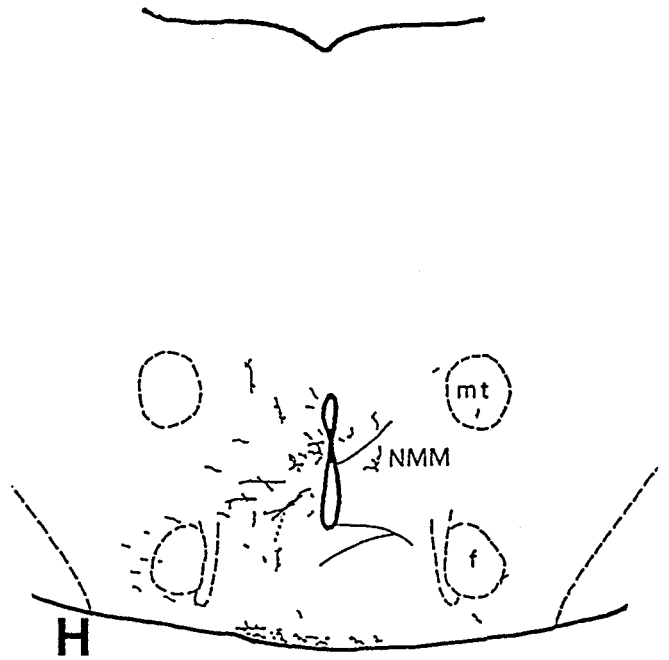
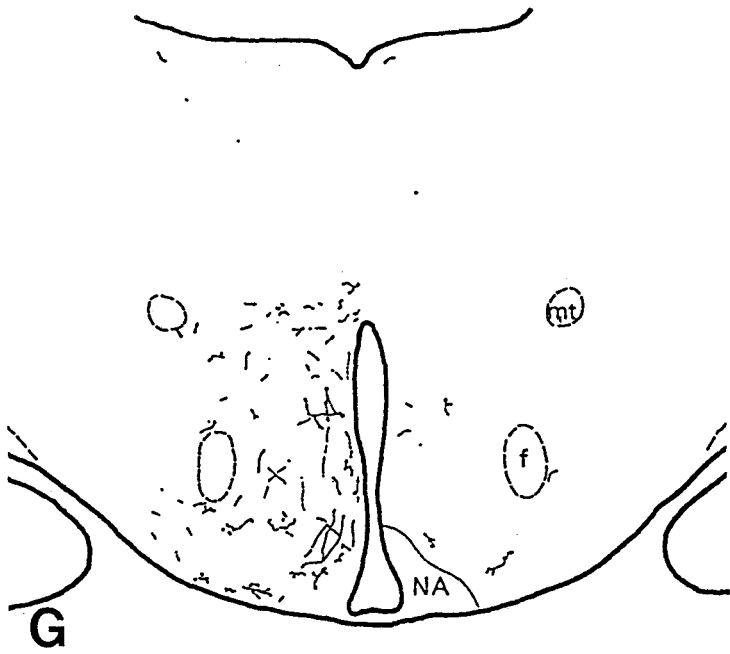
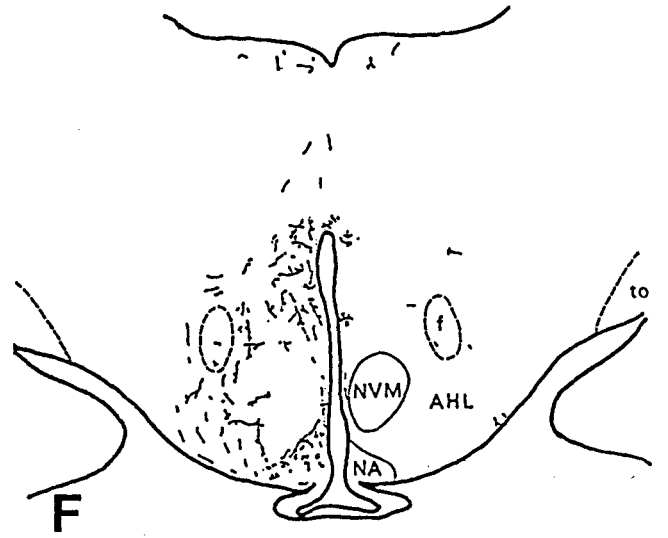
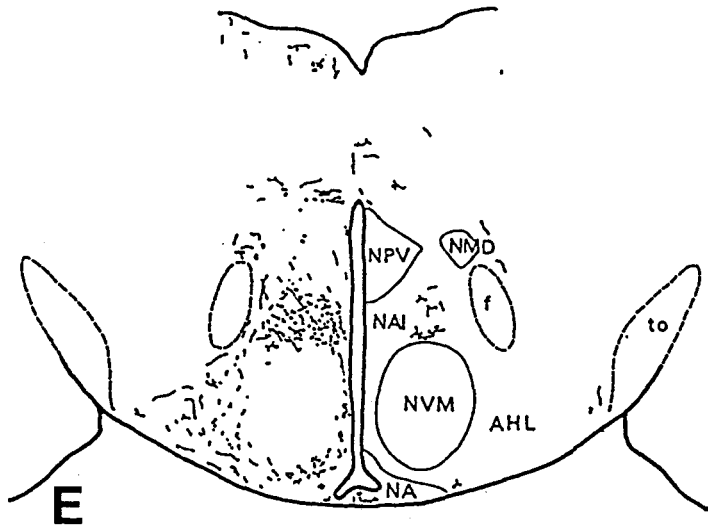


Figure 3 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de F-R dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, après injection iontophorétique de F-R dans le SLml (animal 17 représenté dans la Fig. 1), sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

Les efférences septales innervent les aires latérale et médiane de l'hypothalamus médian et postérieur (E-G). Les noyaux paraventriculaire (NPV), ventromédian (NVM) et arqué (NA) ne contiennent que de rares fibres et terminaisons septales, contrastant avec l'abondante innervation observée dans leur périphérie (E-G). En particulier, le noyau alaire (NAI), ventral au noyau paraventriculaire, est la région hypothalamique la plus densément innervée par les fibres septales (E). Caudalement, les fibres issues du SLml sont présentes dans le noyau dorsomédian (NDM, E), puis l'aire hypothalamique postérieure (AHP, G) et la région prémamillaire (PM, H).



~ D'autres fibres entourent le fornix de sa naissance au niveau postcommissural jusqu'à sa terminaison au niveau des corps mamillaires, et se dispersent dans les régions qui le jouxtent.

~ Un dernier groupe de fibres contourne le fornix postcommissural et emprunte une voie médiane descendante qui longe le troisième ventricule depuis l'aire préoptique jusqu'aux corps mamillaires. Ce tractus périventriculaire, tenu dans l'aire préoptique périventriculaire, s'étoffe au niveau de l'hypothalamus.

2 - Aires contenant les efférences septales

a - Distribution générale des efférences septales

Les fibres issues du site gagnent l'aire préoptique (Fig. 3B). Certaines se dirigent latéralement, d'autres se terminent massivement dans l'aire préoptique médiane antérieure. Plus postérieurement, elles innervent particulièrement les régions dorsale et ventrolatérale de l'aire préoptique médiane, ignorant sa partie périventriculaire (Fig. 3C). Elles forment un plexus dense de ramifications et de terminaisons en périphérie dorsomédiane du chiasma optique et, plus latéralement, du noyau supraoptique (Fig. 2E, 3C).

Le noyau supraoptique proprement dit ne renferme que de rares terminaisons (Fig. 2E). L'observation à fort grossissement ne permet pas d'établir clairement la présence de contacts entre les terminaisons provenant du SLml et les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique (Fig. 2E).

La région immédiatement dorsale au chiasma optique puis au tractus optique contient des fibres courtes et non ponctuées, obliques, qui traversent cette région sans y établir de contacts (Fig. 3C-D).

L'hypothalamus antérieur est préférentiellement innervé dans son aspect dorsal et ventral (Fig. 3D).

Dans les régions plus postérieures, les efférences septales issues du faisceau médian du télencéphale d'une part, de l'aire périfornicale d'autre part, se terminent massivement dans l'hypothalamus latéral et médian (Fig. 3E-F).

De nombreuses efférences septales sont présentes dans les aires hypothalamiques antérieure, médiane, et postérieure (Fig. 3E-G).

Elles se terminent massivement dans la périphérie immédiate du noyau paraventriculaire (Fig. 3E). En particulier, on relève la présence de grandes fibres dans une zone dorsale au noyau paraventriculaire, formant une fine bande horizontale du haut du troisième ventricule à la périphérie dorsolatérale du fornix. La périphérie latérale du noyau

paraventriculaire et la région périfornicale contenant le noyau magnocellulaire dorsal sont modérément innervées par les efférences septales. Ventralement et postérieurement au noyau paraventriculaire, se trouve la région de l'hypothalamus la plus riche en efférences septales, qui y forment un feuillage de terminaisons important. Nommée uniquement chez le cobaye, cette région correspond au noyau alaire (Bleier, 1983) (Fig. 3E).

Le noyau paraventriculaire proprement dit est très peu marqué; cependant, on relève la présence de rares terminaisons dans les groupes magnocellulaires. Des fibres sont présentes dans la région parvocellulaire -antérieure et médiane- du noyau paraventriculaire, sous forme d'éléments de moyen calibre, courts et non ponctués, qu'elles traversent sans s'y terminer en prenant une direction ventrale (Fig. 3E).

Sous le noyau paraventriculaire, les fibres empruntant la voie périventriculaire se regroupent pour former un faisceau périventriculaire net (Fig. 3E-F).

Ventralement, ce faisceau évite le noyau ventromédian, dénué de marquage, hormis dans son aspect ventrolatéral où quelques fibres du faisceau médian du télencéphale aboutissent. Il se prolonge dans la zone pauvre en cellules séparant le noyau ventromédian du noyau arqué, formant un important plexus de terminaisons (Fig. 2F, 3E-G).

La périphérie dorsale du noyau arqué, en particulier dans les cas où l'injection est ventrale dans le septum, contient aussi des fibres issues du SL (Fig. 2F, 3F-G) jusque dans sa partie postérieure, où les terminaisons septales forment une fine bandelette médiane à la base du cerveau (Fig. 3H).

Postérieurement, les fibres empruntant ce faisceau périventriculaire poursuivent leur trajet et convergent dans la région prémamillaire, au point de scission du troisième ventricule. A ce niveau, le marquage observé reste majoritairement homolatéral, mais augmente du côté controlatéral (Fig. 3H).

De rares fibres latérales du faisceau médian du télencéphale se poursuivent en direction du tronc cérébral, qui ne fait pas l'objet de notre étude.

*b - Variation de la distribution des efférences septales selon
l'emplacement du site d'injection*

L'arrangement des projections septales dans l'hypothalamus varie peu selon la localisation du site d'injection. Cependant, les injections centrées dans le SLml innervent de la même manière l'hypothalamus latéral et l'hypothalamus médian, alors que les injections plus ventrales, dans le SLml/v, intéressent essentiellement les régions médianes de l'hypothalamus.

II - Etude de la distribution des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par transport axonal antérograde de dextran biotinylé

L'injection iontophorétique de dextran-biotinylé dans le SL de 15 rats mâles a permis, après migration axonale antérograde et révélation appropriée, l'observation en microscopie optique du trajet et de la destination des fibres et terminaisons septales (10 animaux), et en microscopie électronique, de l'aspect des éléments marqués à l'échelle ultrastructurale (5 animaux).

A - Description du site d'injection

A la suite de l'application iontophorétique du traceur, un groupe dense de 1300 à 1500 neurones est marqué. Une petite zone nécrosée est visible en son centre. Le site est peu étendu, et bien circonscrit à une région du SL. En l'occurrence, quelques injections (2 rats) sont centrées dans le SLml, mais la plupart sont situées dans le SLml/v (8 rats : Fig. 6B).

B - Description du marquage obtenu avec le dextran biotinylé

L'intensité du marquage est identique dans toutes les régions observées.

Après révélation par la DAB et observation en lumière blanche, les corps cellulaires du SL qui ont incorporé le dextran apparaissent marqués *in extenso* : l'ensemble de l'arborisation dendritique et axonale du neurone est visible (Fig. 4A-B).

Les axones, au sein desquels le dextran a migré, sont observés sous deux aspects différents :

~ Ils se présentent sous forme de fibres non ramifiées, plus ou moins longues selon qu'elles suivent un trajet plus ou moins oblique dans l'axe antéropostérieur, et parsemées de varicosités " en passant " pouvant figurer des contacts avec des éléments neuronaux voisins (Fig. 4C-D).

~ Ils montrent un aspect ramifié, avec de nombreuses arborisations garnies de boutons terminaux, souvent significatifs de l'existence de synapses (Fig. 4E-F). Ils forment alors des plexus denses de projections (Fig. 4E), ou au contraire, sont observés isolément dans certains noyaux (Fig. 4F).

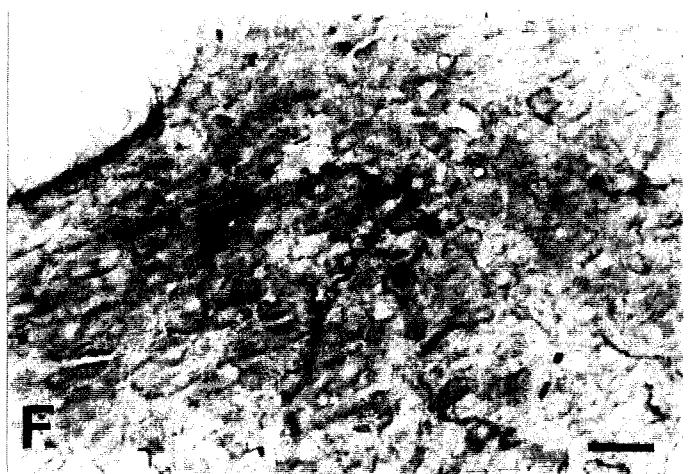
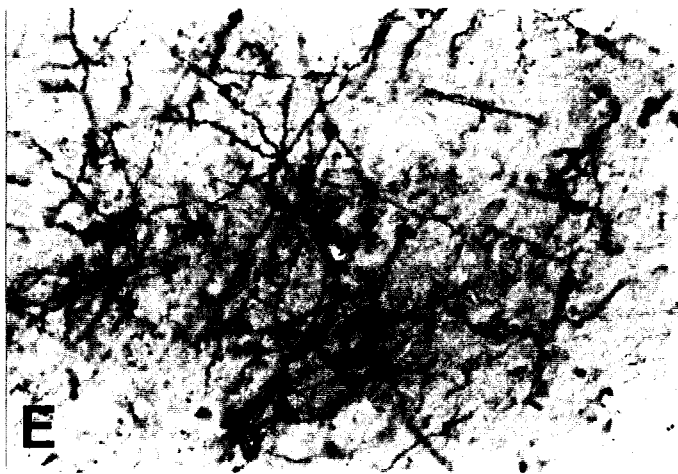
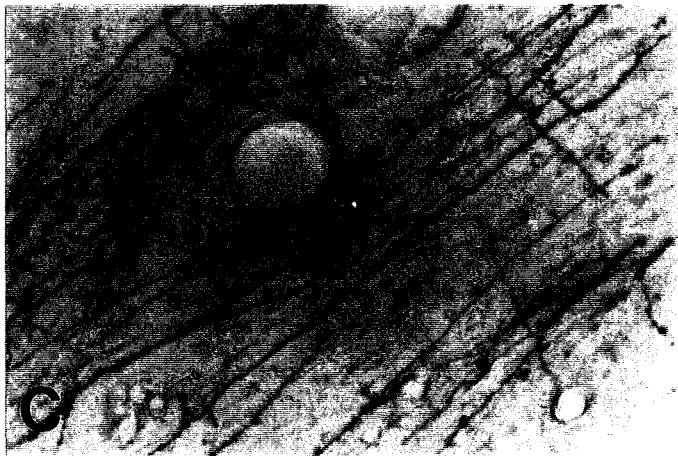
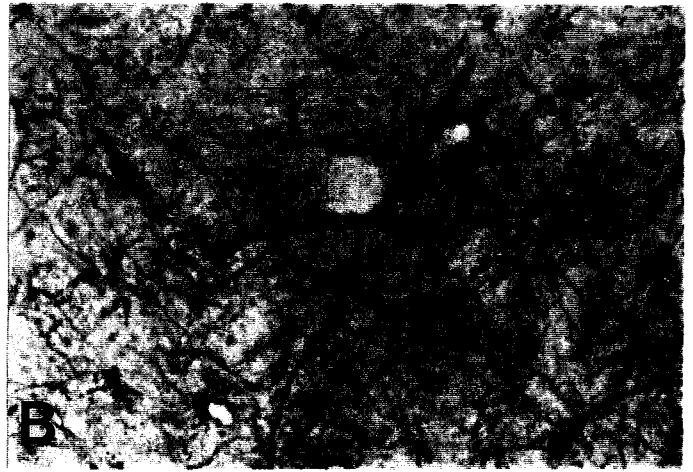
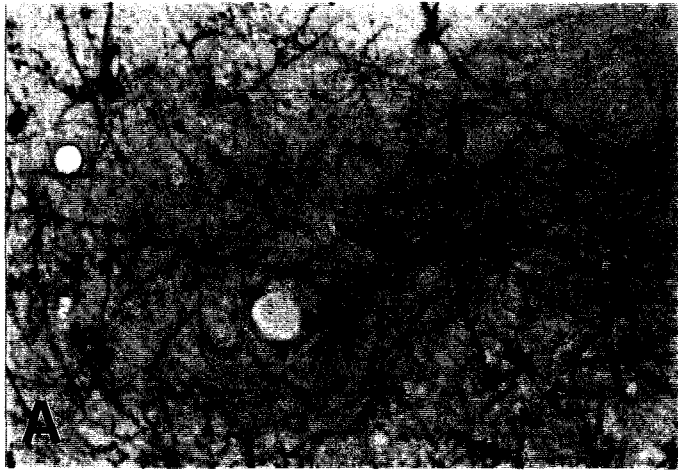
Figure 4 : Détail de la morphologie des neurones ayant incorporé le dextran biotinylé.

A-B : Le dextran biotinylé, injecté par iontophorèse, est incorporé par les neurones du SL, rendant visible leurs corps cellulaires et leurs arborisations dendritiques et axonales.

C-D : Les prolongements axonaux des neurones du SLml, observés ici dans l'aire préoptique latérale (**C**) ou la région dorsale au tractus optique (**D**) sont linéaires et présentent quelques boutons "en passant". Ils correspondraient à des fibres de passage, capables cependant d'établir des contacts synaptiques.

E-F : Les fibres septales forment de dense plexus de terminaisons, par exemple dans l'aire préoptique médiane antéroventrale (**E**). Très ramifiées, elles présentent de nombreux boutons terminaux. De telles arborisations terminales sont retrouvées isolément, notamment dans le noyau paraventriculaire magnocellulaire (**F**). Elles correspondraient aux aires de projections privilégiées du SL.

Barre de calibration: 50 μm en F pour A-F



C - Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus

1 - Distribution générale des efférences septales

Elle est presque exclusivement homolatérale (Fig. 5A-P).

Les fibres issues du site prennent une direction ventrale en contournant par l'intérieur la commissure blanche antérieure puis empruntent trois routes différentes pour gagner l'aire préoptique et l'hypothalamus.

Dans les plans les plus antérieurs, elles prennent une direction latérale pour rejoindre le faisceau médian du télencéphale, puis se redistribuer dans les aires préoptique et hypothalamique latérales.

De petits groupes de fibres courent le long du ventricule et donnent naissance dans l'hypothalamus postérieur à une innervation périventriculaire.

La majeure partie des fibres contournent le fornix et se distribuent dans les aires médianes et postérieures de l'hypothalamus.

La distribution des efférences septales est reportée sur une série de schémas de coupes frontales espacées régulièrement du septum à la région mamillaire, tirées de l'article de Risold et coll, 1994 (Fig. 5A-P). Des microphotographies en lumière blanche, réalisées chez ce même animal, illustrent les aspects les plus spectaculaires de cette projection (Fig. 6, 7, 8). Pour ne pas masquer le marquage, seules les principales annotations ont été reportées.

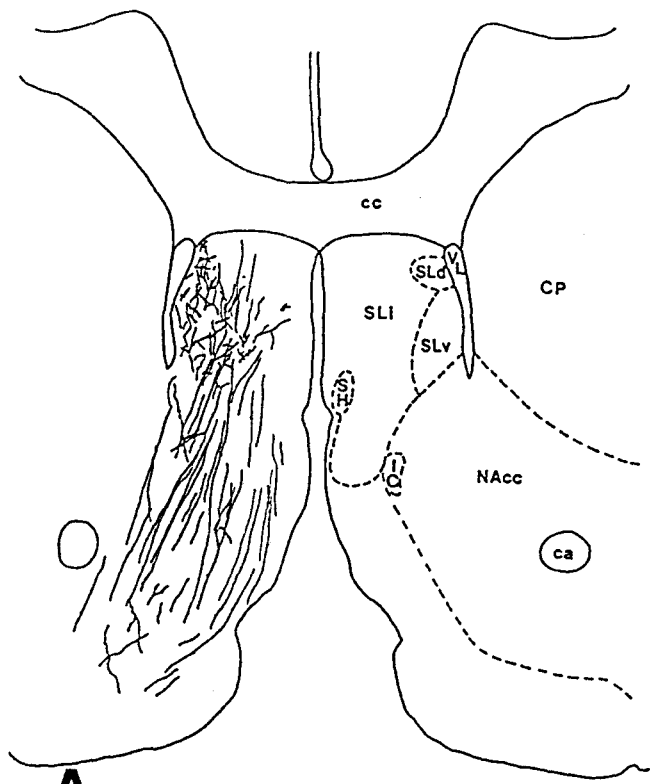
Quelques cellules sont marquées par transport rétrograde dans le SLd (Fig. 5A-D, 6A). L'appareil dendritique des corps cellulaires ayant incorporé le traceur s'étend de la partie la plus rostrale du SL à son extrémité caudale, dans le noyau septofimbrial.

Les axones issus du site empruntent les bandelettes diagonales de Broca Fig. 5A-D, 6A), prennent une direction ventrale sans intéresser le noyau du lit de la strie terminale et contournent la commissure blanche antérieure pour innerver l'aire préoptique (Fig. 5E-G, 6B). Une partie des fibres prennent une direction perpendiculaire à la coupe pour rejoindre les régions médianes de l'hypothalamus.

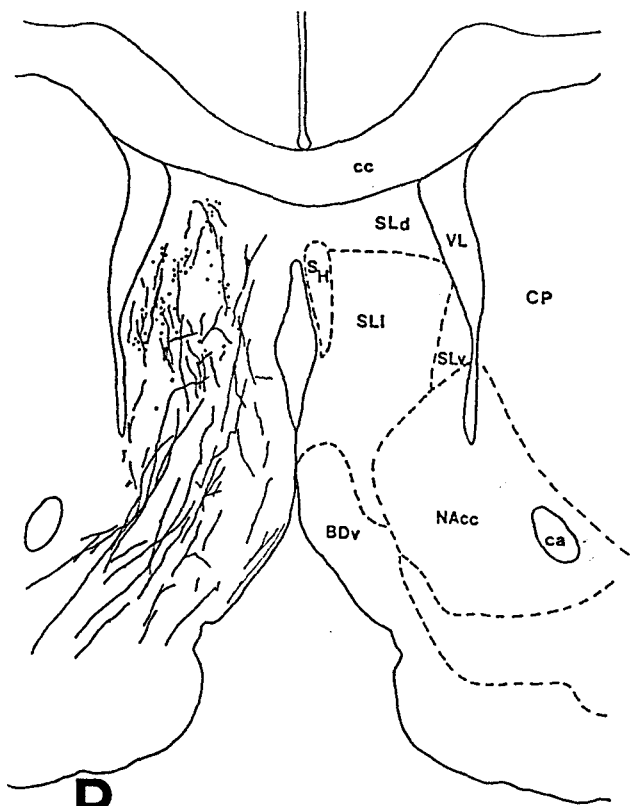
La répartition des projections dans l'aire préoptique est hétérogène (Fig. 5E-G, 6B, 7A). Les efférences septales forment un important plexus de terminaisons dans l'aire préoptique antérodorsale, puis partent obliquement vers l'aire préoptique latérale où elles apparaissent longues et peu ramifiées. Plus ventralement, l'aire préoptique antéroventrale est

Figure 5 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de dextran biotinylé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, après injection iontophorétique dans le SLml/v, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

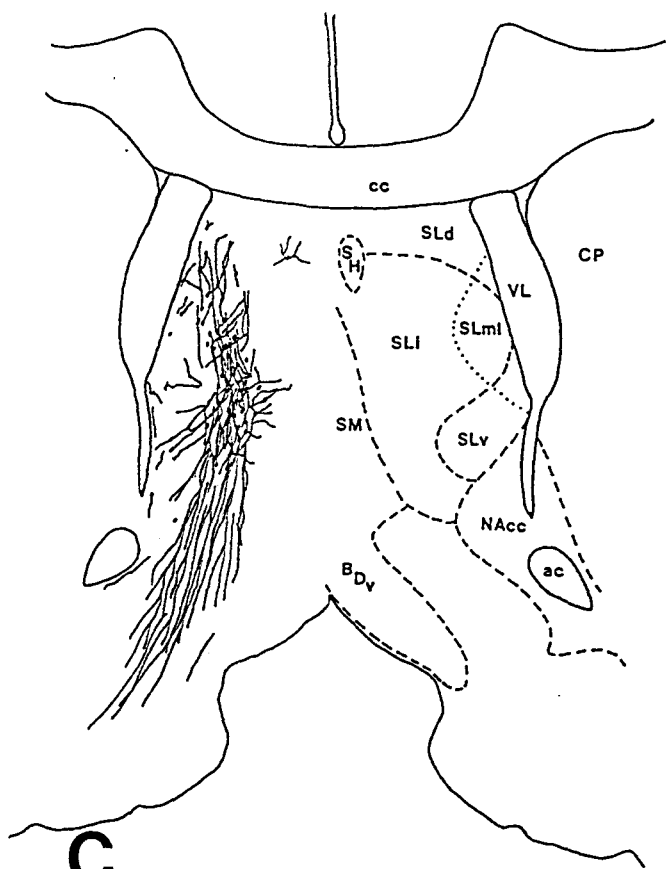
La projection septale est majoritairement ipsilatérale (A-P). Les extensions dendritiques des neurones ayant incorporé le traceur sont observées dans toute l'étendue rostro-caudale du SL (A-F). Les fibres issues du site d'injection (C-E) se dirigent ventralement pour gagner l'aire préoptique et l'hypothalamus (E-P).



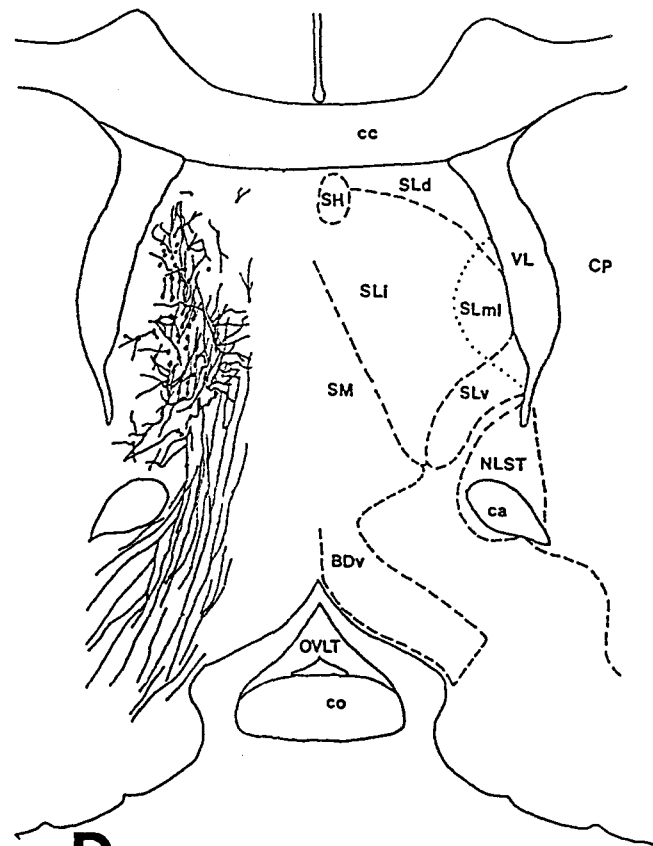
A



B



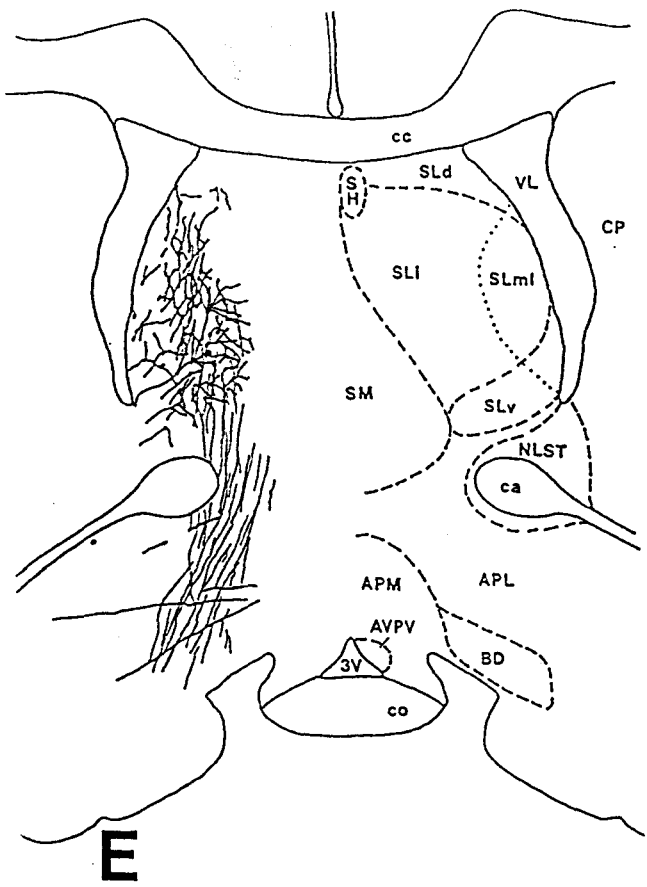
C



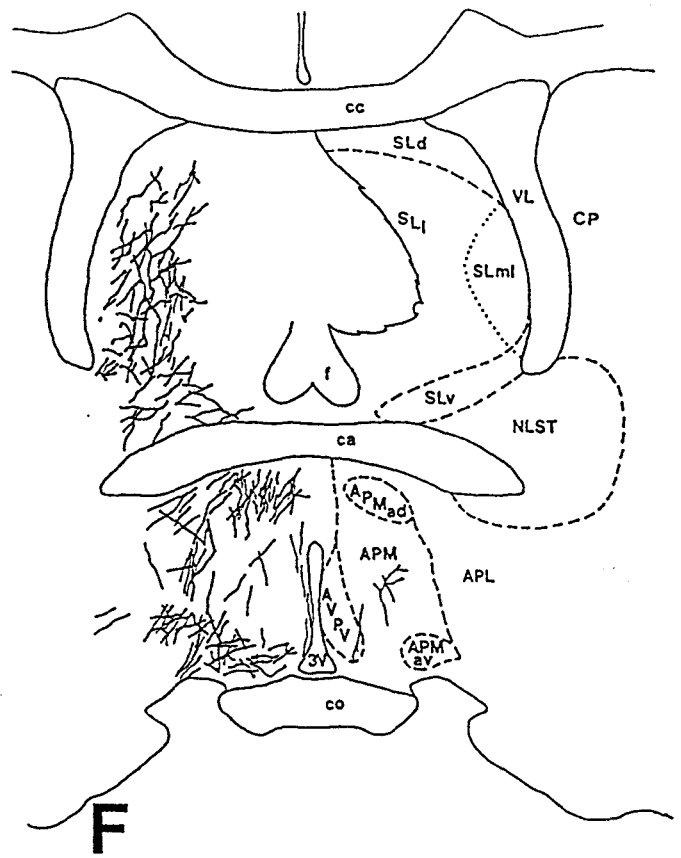
D

Figure 5 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de dextran biotinylé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, après injection iontophorétique dans le SLml/v, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

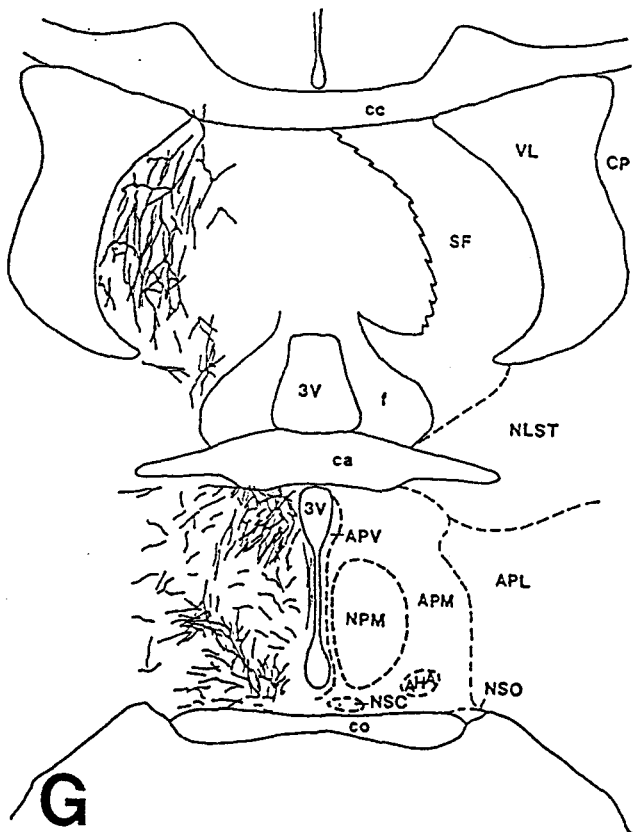
Les fibres issues du site d'injection (C-E) se dirigent ventralement pour gagner l'aire préoptique (E-G) puis l'hypothalamus antérieur (H-I). Elles innervent l'aire préoptique latérale antérieure (APL, E-G), puis les régions antérodorsale et antéroventrale de l'aire préoptique médiane (APM, F-G). L'aire antéroventrale périventriculaire (AVPV, E) et le noyau préoptique médian (NPM) sont assez peu innervés par les fibres septales, tandis que le noyau suprachiasmatique (NSC) ne semble pas touché (G-H). L'ensemble de l'hypothalamus antérieur est concerné par la projection septale (H-I).



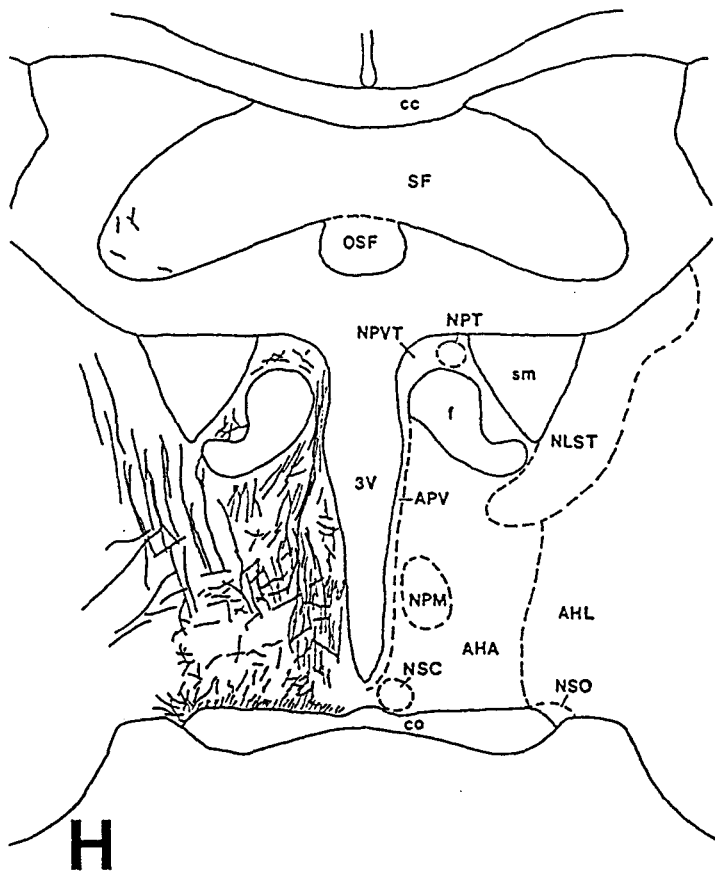
E



F



G



H

Figure 5 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de dextran biotinylé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, après injection iontophorétique dans le SLml/v, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

L'ensemble de l'hypothalamus antérieur, en particulier l'aire hypothalamique antérieure (AHA), est concerné par la projection septale (H-I). Quelques fibres verticales traversent les noyaux thalamiques paraventriculaire (NPVT, I-P) et reuniens (NRe, I-N). L'hypothalamus médian est la cible privilégiée des efférences septales, tant dans sa portion latérale que médiane (I-L). L'innervation septale de l'aire hypothalamique périventriculaire augmente dans les plans postérieurs (APV, G-N). Le noyau ventromédian (NVM) ne contient pas de fibres marquées (L-M). Les noyaux paraventriculaire (NPV, I-L) et arqué (NA, K-P) reçoivent une innervation septale ténue. Tous trois sont toutefois bordés par d'importants plexus de terminaisons septales (J-P). La région subparaventriculaire (SubPV) est la plus densément marquée (J-L).

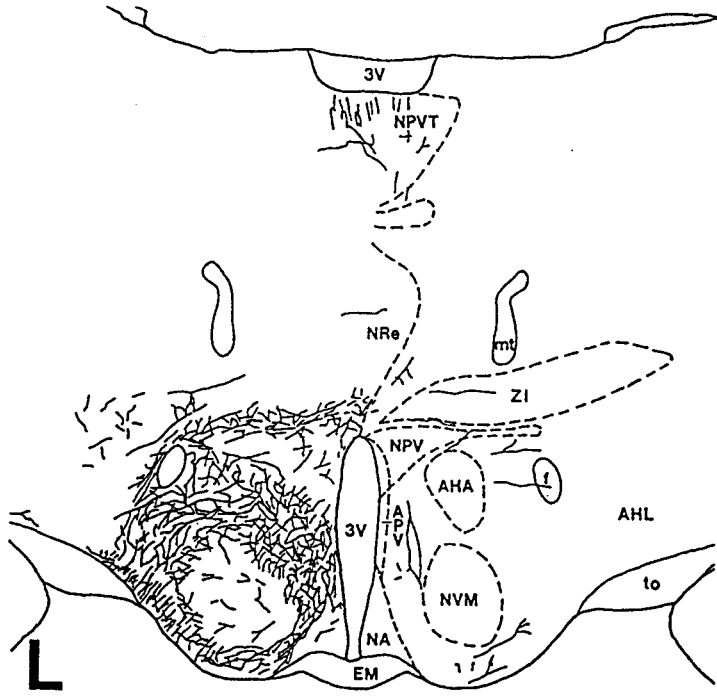
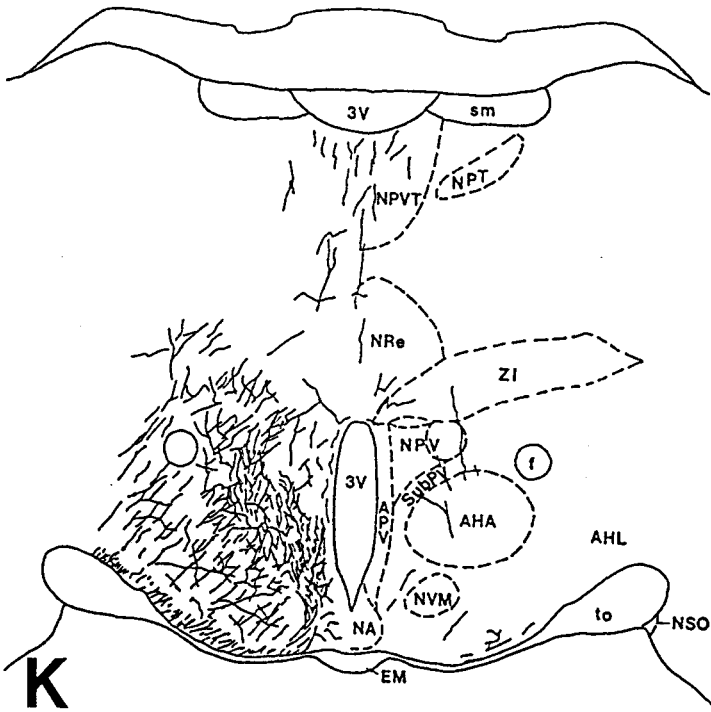
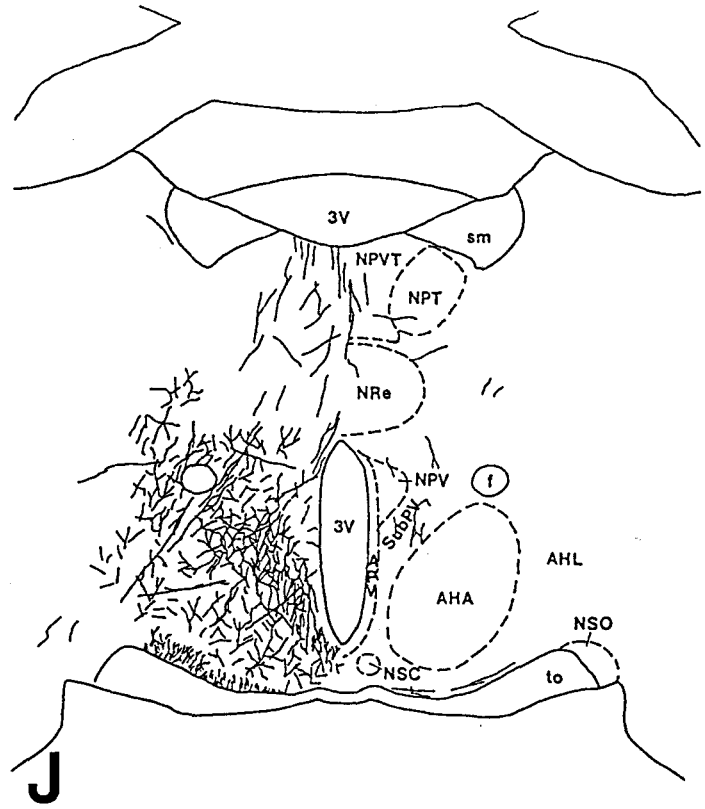
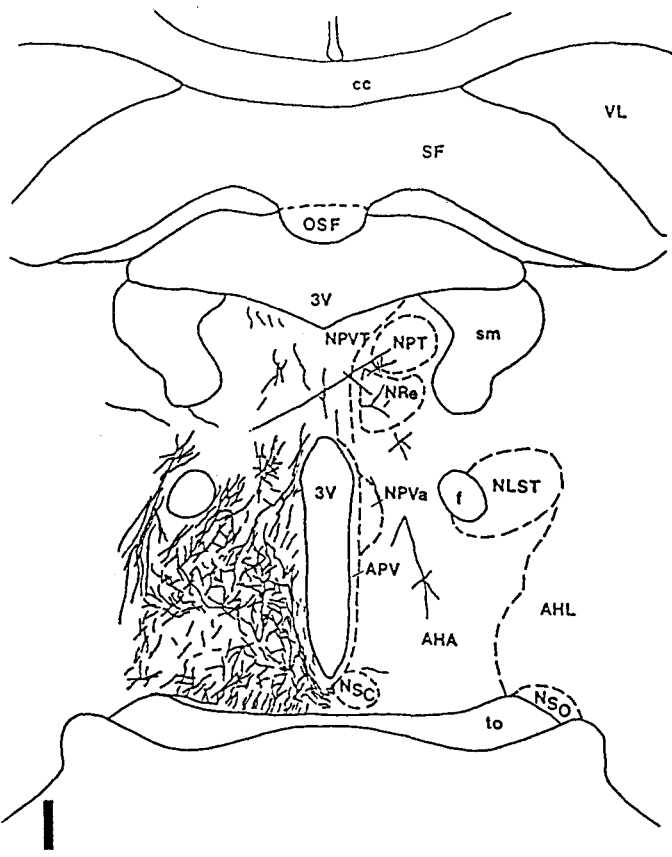
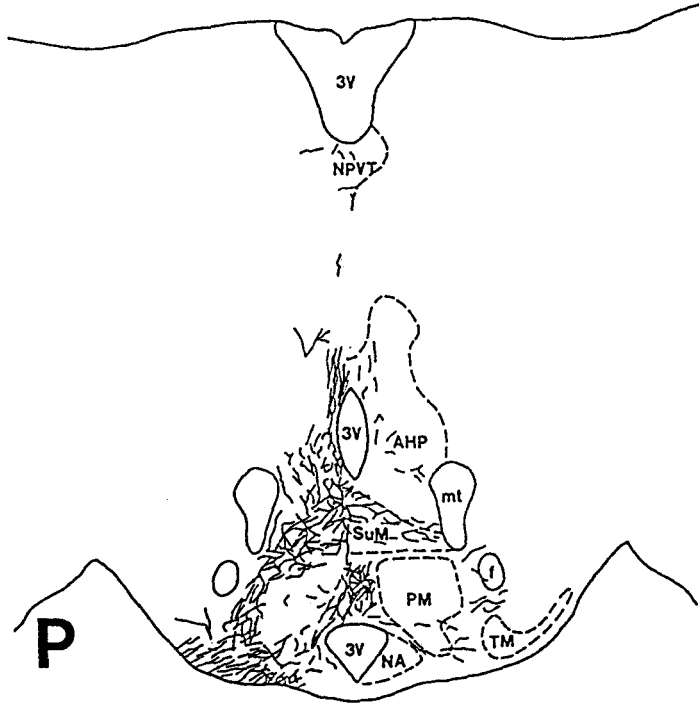
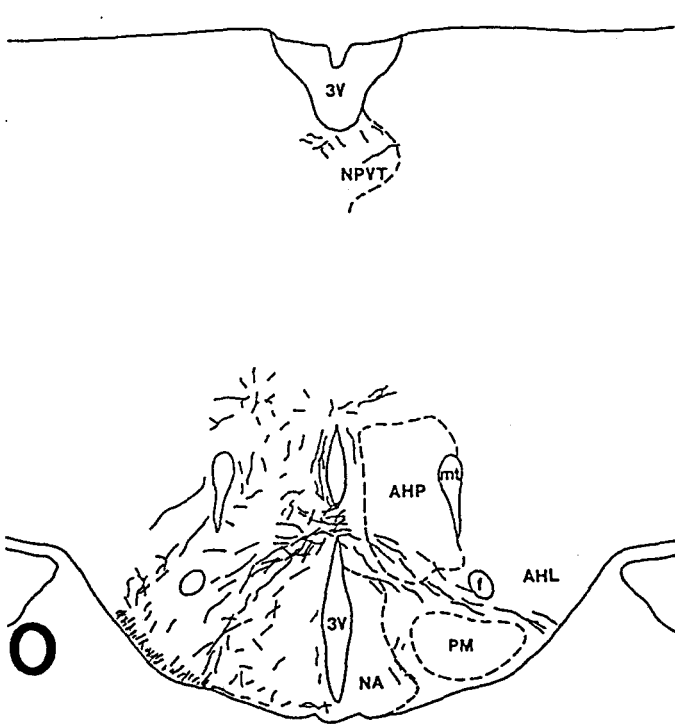
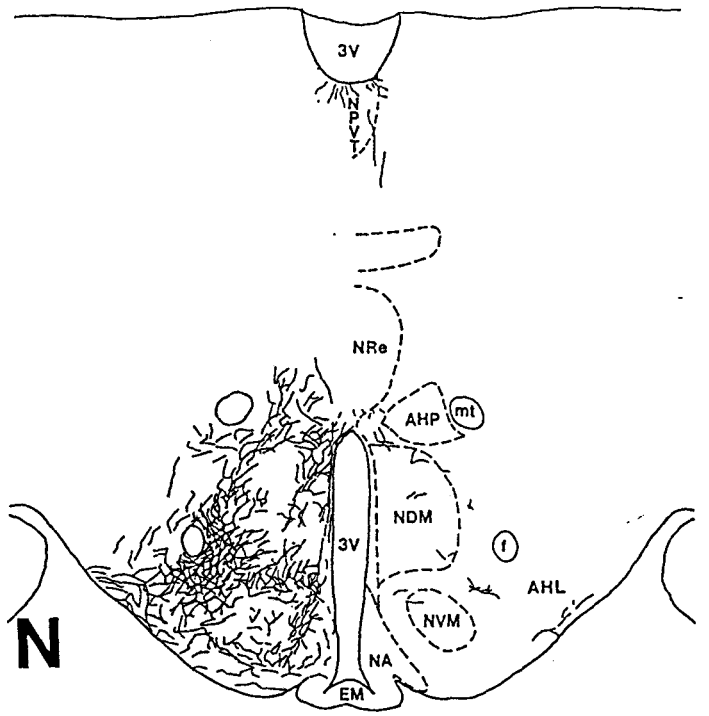
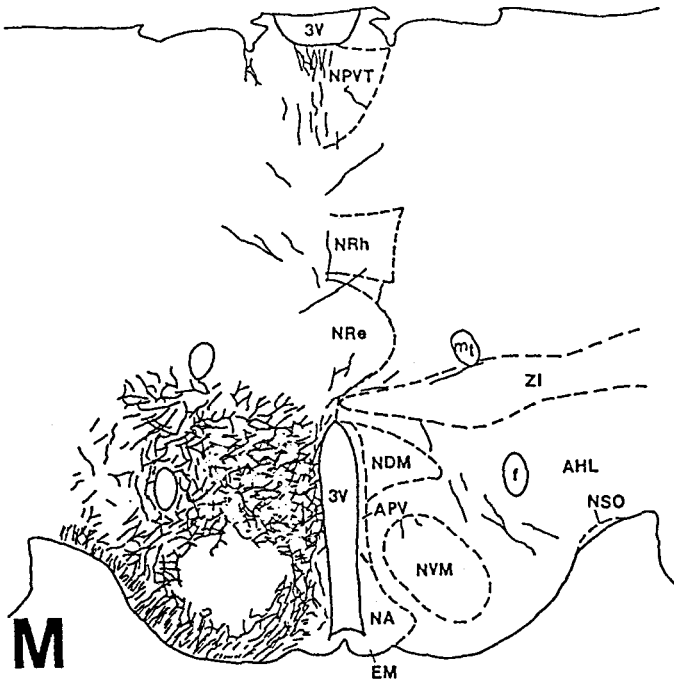


Figure 5 : Représentation schématique de la distribution des fibres marquées par transport antérograde de dextran biotinylé dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, après injection iontophorétique dans le SLml/v, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

Dans les plans postérieurs, le noyau dorsomédian (NDM, M-N) contient de nombreuses fibres septales. Le noyau ventromédian (NVM) contient de rares fibres dans son aspect caudal (N). L'aire hypothalamique postérieure (AHP, N-P) ne reçoit que quelques efférences septales. Dans la région prémamillaire (PM, O-P), l'innervation septale est bilatérale. Elle concerne les noyaux mamillaire médian et supramamillaires (SuM, O-P).



également une cible privilégiée des fibres du SL, contrairement à l'aire antéroventrale périventriculaire et à la partie médiane de l'aire préoptique médiane, qui contiennent peu de fibres (Fig. 5F, 6B).

Plus postérieurement, l'aire préoptique reste préférentiellement innervée dans ses parties dorsale et ventrale (Fig. 5G). Cette dernière en particulier s'étend latéralement dans la périphérie immédiate du noyau supraoptique et médialement en périphérie dorsomédiane du noyau suprachiasmatique. Ces noyaux ne reçoivent que de très rares fibres septales (Fig. 9D-F). Dans le noyau préoptique médian antérieur, l'innervation est peu dense (Fig. 5G). Quelques fibres parcourent la région périventriculaire, mais évitent ventralement le noyau suprachiasmatique (Fig. 5G-I, 7A).

Dans l'hypothalamus antérieur (Fig. 5H-I, 7B), de grandes fibres descendantes, latérales à la strie médullaire et au fornix, parcourent la partie postérieure du noyau du lit de la strie terminale puis l'aire hypothalamique latérale selon un axe dorsoventral. Elles participent à l'innervation massive de l'aire hypothalamique antérieure, que suppléent les fibres périventriculaires.

Il est à noter que dans sa partie caudale, le noyau préoptique médian reçoit une innervation septale plus dense que celle observée dans son aspect rostral (Fig. 5H).

De longues fibres périventriculaires ont contourné le fornix post-commissural en passant dans le noyau paraventriculaire thalamique, pour aboutir dans l'hypothalamus médian où elles se ramifient abondamment (Fig. 5H-I).

Le faisceau périventriculaire s'étoffe progressivement dans les plans postérieurs par l'arrivée de fibres verticales via les noyaux thalamiques centraux (Fig. 5H-P).

A la base de l'hypothalamus, de courtes fibres obliques arrivant de la région dorsale au chiasma optique sont observées au-dessus de la surface piaie, jusque dans les régions postérieures de l'hypothalamus (Fig. 5H-P). Elles semblent emprunter cette voie de passage pour innerver les régions postérieures du tronc cérébral, qui ne font pas l'objet de notre étude.

Dans l'hypothalamus médian (Fig. 5J-L, 7C), les fibres septales sont essentiellement présentes dans les aires hypothalamiques, arrangements diffus et mal délimités de neurones, mais en évitent les principaux noyaux, qui par opposition sont des groupements denses de neurones. Les noyaux ventromédian, paraventriculaire et arqué présentent globalement une innervation très ténue, qui contraste avec le volume des terminaisons septales retrouvées dans leur périphérie (Fig. 5J-P, 7C, 8A, 9A-G).

L'aire hypothalamique latérale est parcourue par les fibres du faisceau médian du télencéphale (Fig. 5A-O, 7B-C, 8A-B).

Figure 6 : Microphotographies de coupes frontales du septum et de l'aire préoptique du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

Un groupe dense de neurones du SLml/v ont incorporé le traceur (grosses pointes de flèches, **B**). Leurs prolongements axonaux longent la commissure blanche antérieure (ca) pour se diriger vers l'aire préoptique latérale (petites pointes de flèches) et se terminer dans les portions antérodorsale et antéroventrale de l'aire préoptique médiane (APM), évitant l'aire antéroventrale périventriculaire (**B**).

Barre de calibration : 200 μm en A pour A et B

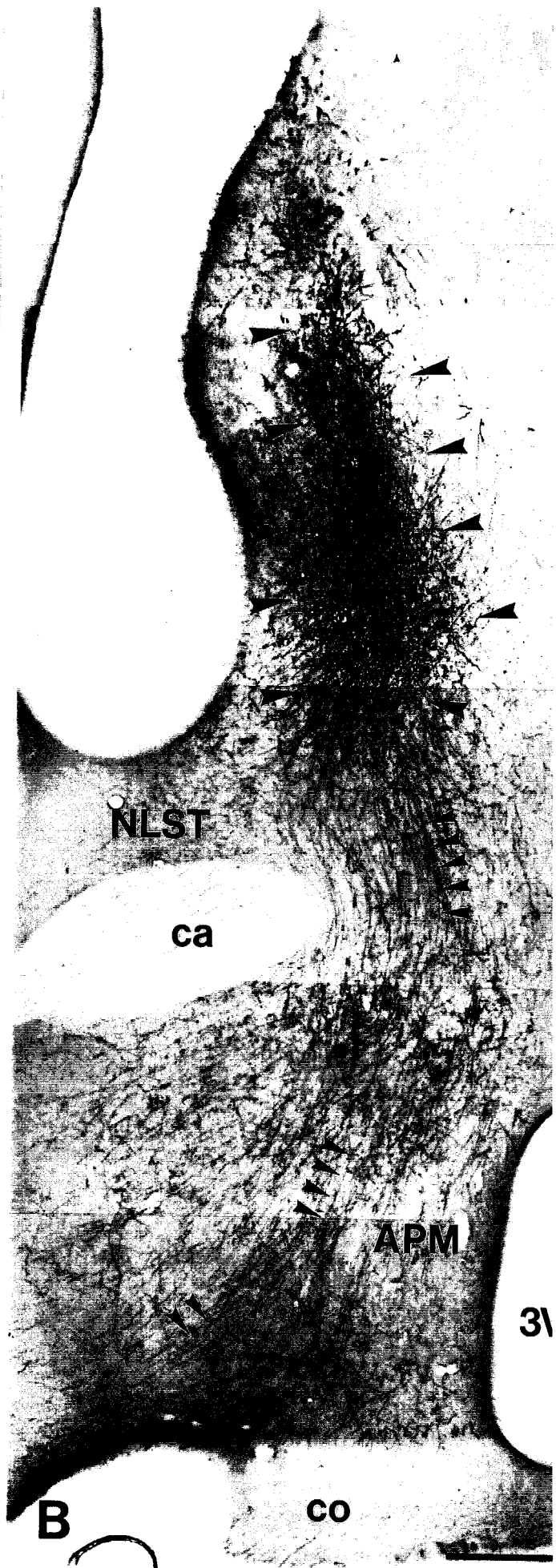
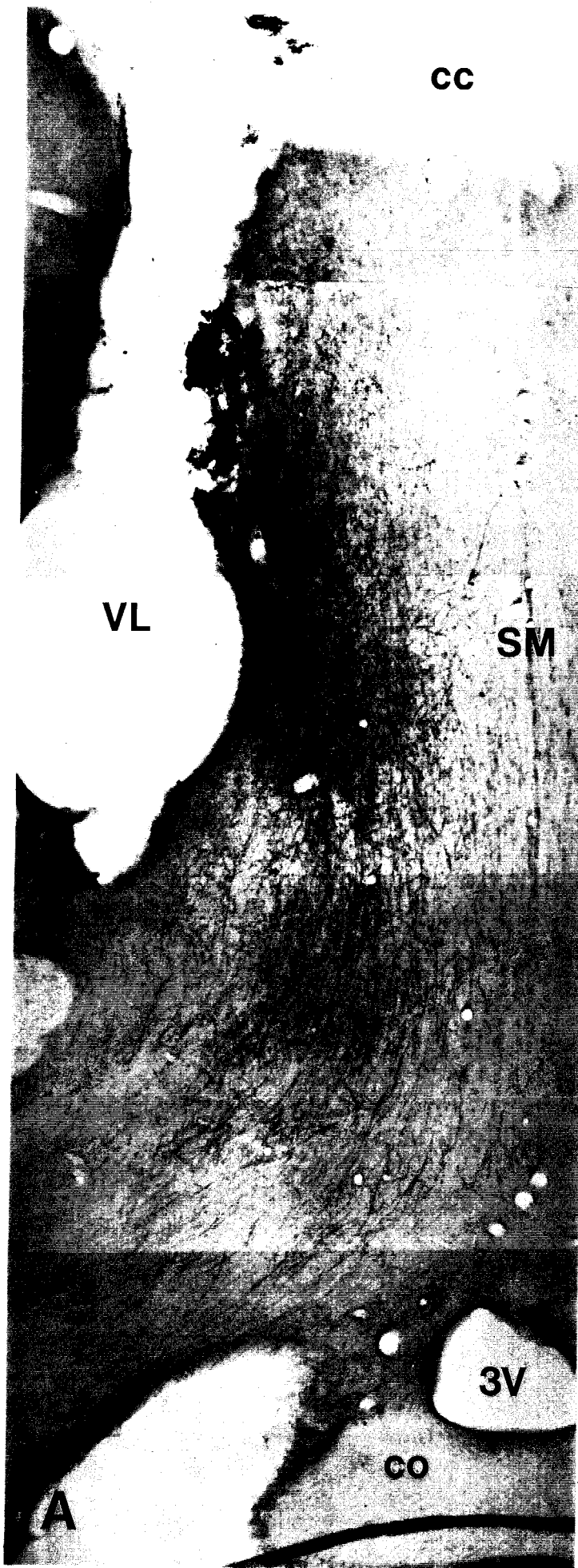


Figure 7 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus antérieur et médian du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

L'aire préoptique latérale (APL) est parcourue par des fibres de passage, alors que les portions dorsale et ventrolatérale (petites pointes de flèches) de l'aire préoptique médiane (APM) sont le site de terminaison de nombreuses efférences septales (A).

Noter la densité des fibres retrouvée dans la région dorsochiasmaticque (flèche).

L'aire hypothalamique antérieure (AHA) est abondamment innervée par les fibres septales (B), en particulier dans son aspect ventral (grosses pointes de flèches). La densité de fibres septales présentes dans l'aire hypothalamique périventriculaire (APV) augmente dans les plans postérieurs de l'hypothalamus (B-C).

Noter la présence de fibres " en passant " qui courent en direction des aires postérieures, au-dessus du tractus optique (petites pointes de flèches, B-C).

Les neurones du SL se terminent essentiellement dans les aires diffuses de l'hypothalamus médian, entourant, sans les innover eux-mêmes de façon massive, les noyaux paraventriculaire (NPV), ventromédian (NVM) et arqué (NA, C). En particulier, de longues fibres ramifiées sont observées dans la périphérie dorsale du noyau paraventriculaire (flèche, C); ainsi que latéralement à la portion magnocellulaire de ce noyau. La région subparaventriculaire est particulièrement riche en efférences septales (pointes de flèches, C).

Barres de calibration : 50 μ m en A
100 μ m en C pour B et C

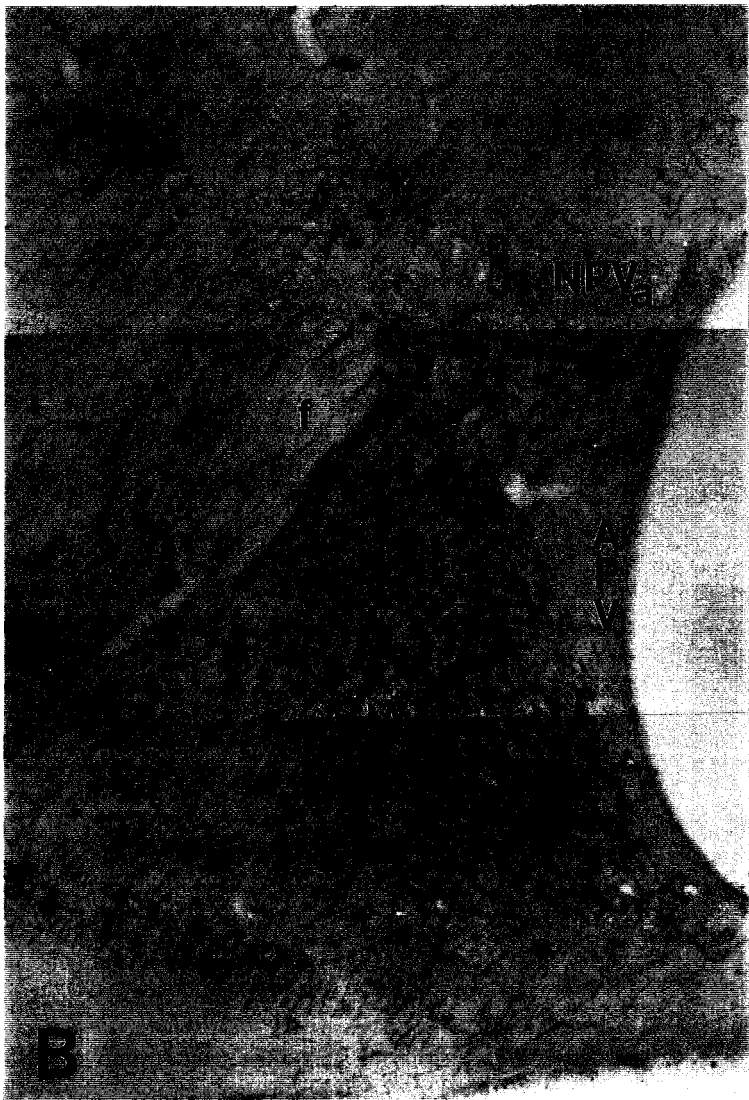
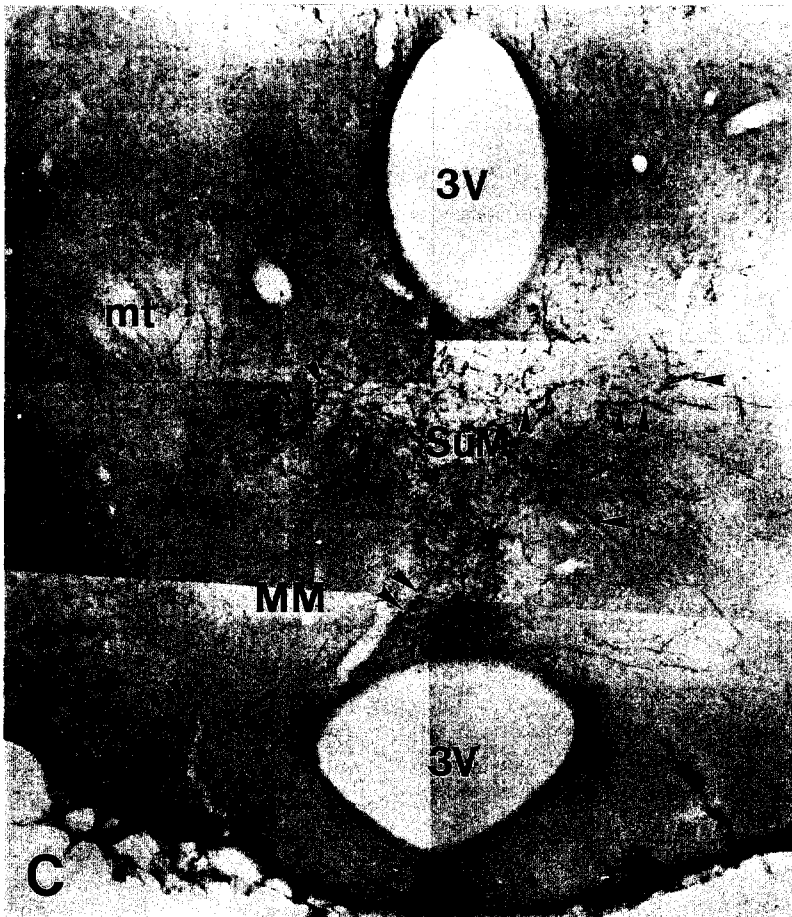
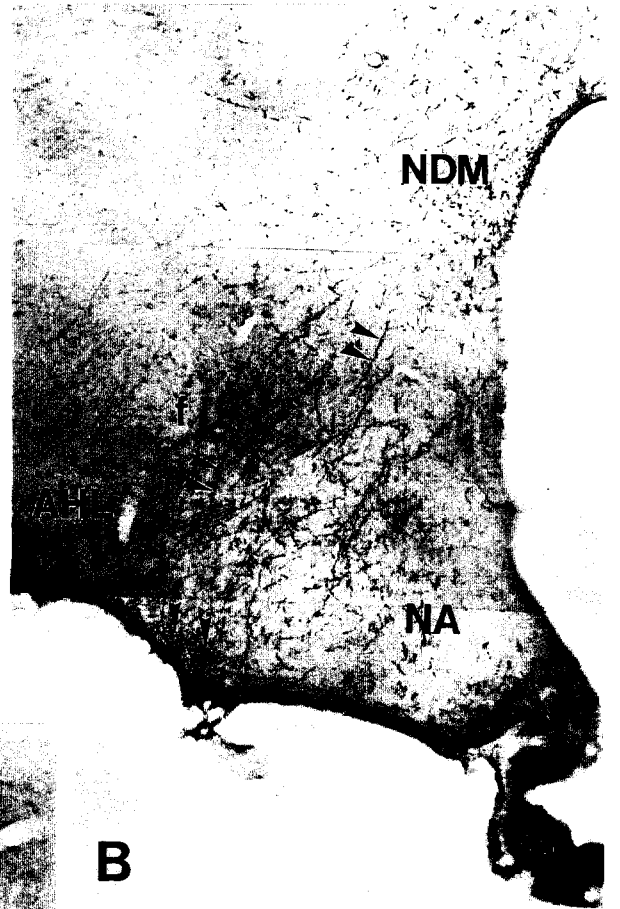
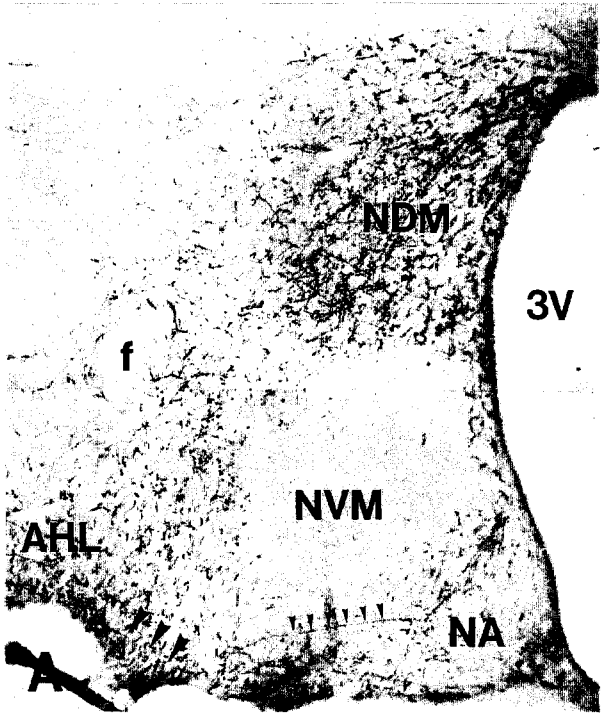


Figure 8 : Microphotographies de coupes frontales de l'hypothalamus postérieur et de la région mamillaire du rat observées après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

Dans l'hypothalamus postérieur, le noyau dorsomédian (NDM) contient de nombreuses fibres septales (A-B), au même titre que l'aire périfornicale, et à l'inverse du noyau ventromédian (NVM). Cependant, certains fibres, semblent provenir de l'hypothalamus latéral (AHL), traversent celui-ci en direction du noyau arqué (NA, petites pointes de flèches, A). Dans toute son étendue rostro-caudale, le noyau arqué est bordé par les terminaisons septales, dont certaines innervent sa partie dorsale puis ventrale. De courtes fibres empruntent, à la base de l'encéphale, une voie latérale pour se projeter dans les régions plus caudales (grosses pointes de flèches A-B), en se dirigeant médialement vers les régions mamillaires, au niveau desquelles la projection devient significativement bilatérale (grosses pointes de flèches, C-D).

Barre de calibration : 100 μm en D pour A-D



La densité de fibres présentes dans l'hypothalamus médian, tant dans la zona incerta que dans les aires périfornicale et ventrale au noyau ventromédian, est importante (Fig. 5K-N, 7C).

La région subparaventriculaire qui s'étend sous le noyau paraventriculaire, de son pôle latéral à son extrémité médiane, est la plus extraordinairement innervée par les efférences septales (Fig. 5J-L, 7C). Elle correspond au noyau alaire du cobaye.

Plus postérieurement encore, quand le noyau dorsomédian remplace le noyau paraventriculaire, l'innervation septale reste dense (Fig. 5M-N, 8A). Ainsi, le SL se projette dans le noyau dorsomédian et dans la partie dorsomédiane du noyau ventromédian caudal, mais évite le reste de ce dernier en le contournant médialement. Le faisceau de terminaisons de l'hypothalamus périventriculaire reste très dense et borde le noyau arqué (Fig. 5K-N, 8A).

Les fibres de l'hypothalamus latéral convergent ensuite médialement, s'ajoutant à la composante médiane de l'innervation, vers le point de scission du troisième ventricule, qu'elles semblent traverser. C'est à ce niveau que la projection contralatérale est la plus importante (Fig. 5O-P, 8B-C).

Certaines fibres remontent le long du troisième ventricule, probablement pour gagner des régions plus caudales, comme la matière grise périaqueducale.

Des efférences septales sont retrouvées dans l'aire hypothalamique postérieure et la région prémamillaire (Fig. 5O-P, 8C).

Dans la région mamillaire, la projection septale intéresse le noyau mamillaire médian antérieur, puis le contourne dorsalement pour rejoindre la région supramamillaire (Fig. 5G-H, 8C-D).

2 - Variation de la distribution des efférences septales selon l'emplacement du site d'injection

Les Figures 5, 6, 7, 8 illustrent l'innervation préférentielle de l'hypothalamus médian par le SLml/v. Nous avons pu observer en revanche que les injections centrées dans le SLml induisent une innervation proportionnellement plus importante des structures latérales de l'hypothalamus.

3 - Détail de la distribution des efférences septales dans les noyaux hypothalamiques

Malgré la faible innervation septale globalement notée dans les noyaux supraoptiques, suprachiasmatiques, paraventriculaires, ventromédians et arqué, l'implication majeure de ces régions dans les processus neuroendocrines nous incite à recenser précisément, pour chacun d'eux, la distribution des fibres à leur contact.

a - Noyau supraoptique

Dans les plans antérieurs, le noyau supraoptique est bordé dorsomédialement par le plexus de terminaisons septales qui s'étend ensuite pour entourer la partie médiane du noyau. Quelques arborisations terminales sont visibles au centre du noyau (Fig. 7A, 9D-E).

b - Noyau suprachiasmatique

Quelques fibres courtes et non ponctuées sont observées dans le noyau suprachiasmatique et la région rétrochiasmatique; elles contrastent avec le marquage dense observé dans sa périphérie dorsolatérale (Fig. 5G-J, 7A, 9F).

c - Noyau paraventriculaire

Comme l'illustre la Fig. 9A-C, le noyau paraventriculaire reçoit une dense innervation septale périphérique dans tout son développement antéro-postérieur. Sa partie parvocellulaire, antérieure, médiane et postérieure, est parcourue par de courtes fibres verticales (Fig. 5J-K, 7B-C, 9A-C). Quelques fibres, plus ramifiées, sont visibles dans le groupe de neurones magnocellulaires du noyau paraventriculaire. Les fibres présentes dans la périphérie latérale du noyau contactent également quelques neurones magnocellulaires situés à la limite externe du noyau paraventriculaire magnocellulaire (Fig. 7C, 9B-C).

L'innervation dorsale au noyau paraventriculaire s'étend jusque dans la zona incerta, où les fibres observées sont longues et variqueuses (Fig. 5L, 7C).

Figure 9: Détails des principaux noyaux de l'aire préoptique et de l'hypothalamus du rat observés après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

A-C : Le noyau paraventriculaire est entouré de projections septales. Il est lui-même parcouru par de rares fibres. Sa partie parvocellulaire antérieure (NPVa, **A**), médiane (NPVp, **B**) et postérieure (**C**) est parcourue par de rares fibres peu ponctuées et peu ramifiées, qui partent en direction ventrale. Au contraire, sa partie magnocellulaire (NPVm) contient quelques arborisations septales (**B**).

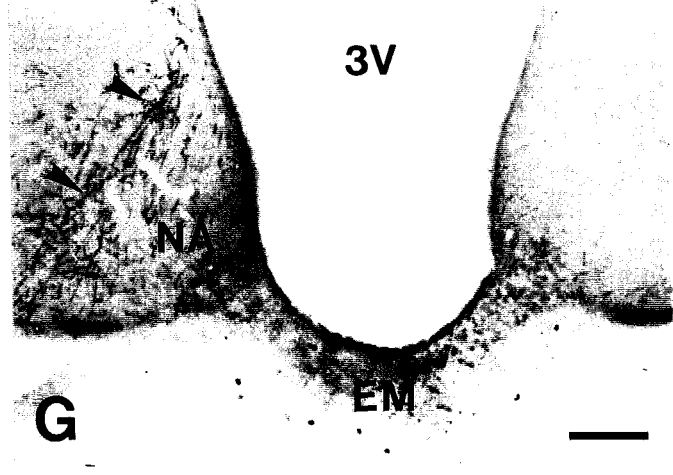
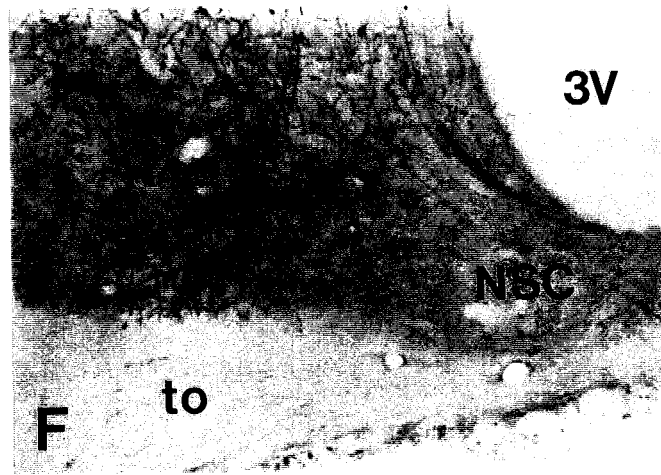
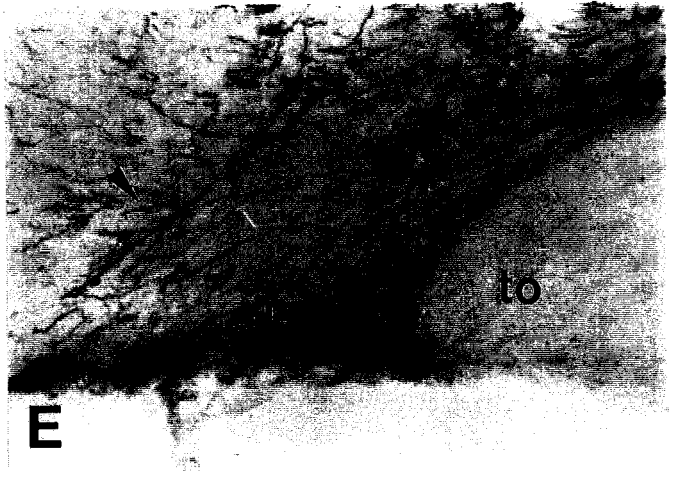
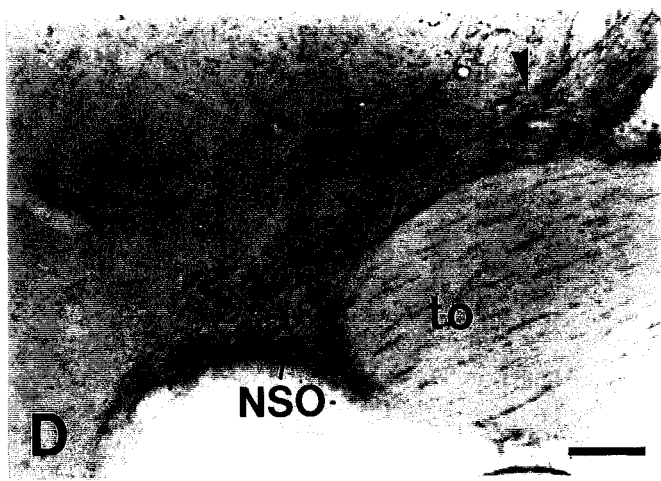
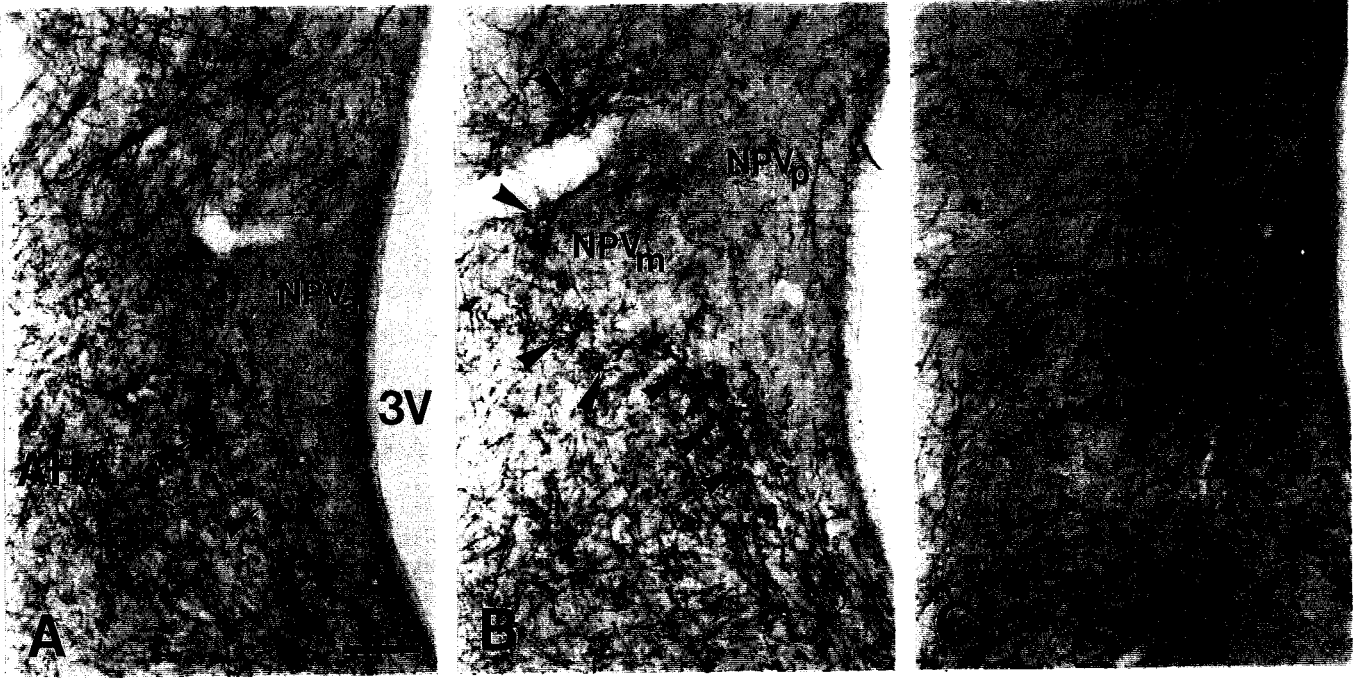
De nombreuses terminaisons sont observées dans sa périphérie dorsale, latérale et surtout ventrale, dans la région subparaventriculaire (pointes de flèches).

D-E : La périphérie du noyau supraoptique contient de nombreuses efférences septales, présentes sous forme de fibres longues, ponctuées et modérément ramifiées (pointes de flèches). De rares éléments marqués sont présents dans le noyau proprement dit.

F : L'absence d'innervation septale dans le noyau suprachiasmatique (NSC) contraste avec les plexus de terminaisons présents dans la région dorsochiasmatique voisine (pointes de flèches).

G : Le noyau arqué (NA) est bordé par une dense innervation septale (pointes de flèches), et quelques fibres sont également présentes dans le noyau.

Barres de calibration : 100 μm en A pour A-C
40 μm en D pour D-F
100 μm en G pour F-G



d - Noyau ventromédian

Le noyau ventromédian est parcouru par de rares fibres, courtes et obliques, dans son aspect antérieur le plus ventral. Postérieurement, quelques fibres variqueuses pénètrent dans le noyau ventromédian latérodorsal (Fig. 5L-N, 7C, 8A).

e - Noyau arqué

Le noyau arqué est longé par une importante innervation septale issue du faisceau périventriculaire d'une part, et ventrolatéralement, par des fibres de passage venues des aires antérieures, d'autre part. Ce faisceau entre dans la partie dorsale du noyau arqué, et quelques fibres longues et ponctuées, qui semblent provenir de l'hypothalamus latéral, traversent horizontalement le noyau arqué (Fig. 5L-N, 8A-C, 9G).

D - Etude à l'échelle ultrastructurale

Après révélation par la DAB, les coupes épaisses présentant les meilleurs marquages ont été sélectionnées. Des coupes ultrafines sont effectuées au niveau de l'aire préoptique ventrale et dans la région subparaventriculaire, qui présentent une grosse concentration de structures contenant les précipités de DAB, et qui correspondent donc à des projections du SL.

Les efférences septales sont parfois observées au contact de péricaryons (Fig. 10A), mais le plus souvent, elles sont relevées au contact de prolongements dendritiques (Fig. 10 B-E). Les structures positives sont essentiellement des terminaisons nerveuses contenant de nombreuses vésicules synaptiques et quelques mitochondries. Dans de nombreux cas, un épaississement des membranes et une polarisation des vésicules synaptiques suggèrent l'existence de synapses (Fig. 10B-E). Ces synapses sont essentiellement de type symétrique.

III - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par l'utilisation de traceurs axonaux viraux

Nous avons recherché une souche virale susceptible de migrer de façon antérograde au sein des neurones, dans la perspective de tracer les connexions polysynaptiques établies par le SL.

Figure 10 : Observations à l'échelle ultrastructurale de coupes effectuées dans l'aire subparaventriculaire, chez un rat ayant reçu une injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

Des éléments marqués par transport antérograde de dextran biotinylé sont repérés grâce aux précipités de DAB. Les structures sont essentiellement des terminaisons nerveuses contenant des vésicules de type synaptique et des mitochondries.

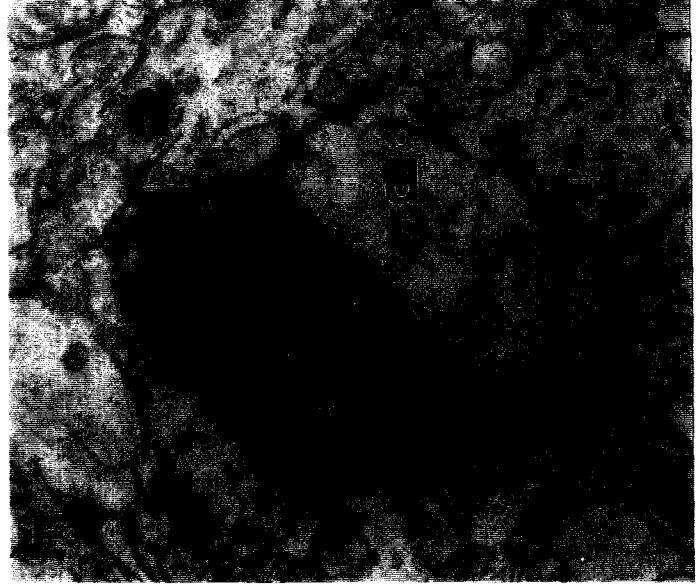
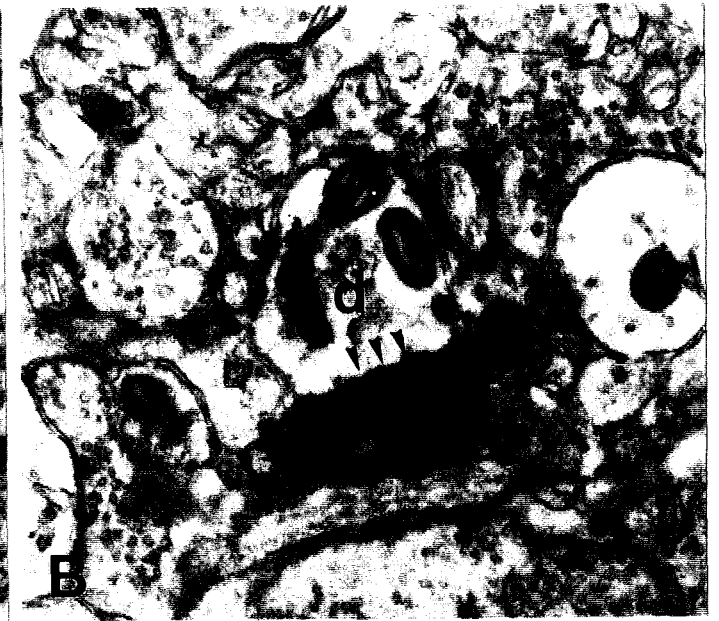
Elles sont parfois au contact de péricaryons (A) et dans la plupart des cas elles sont observées juxtant des prolongements dendritiques (B-E).

La polarisation des vésicules synaptiques mais aussi la présence d'un épaissement des membranes (pointes de flèches) indiquent l'existence de synapses qui semblent essentiellement de type symétrique (B-E).

p = péricaryon

d = prolongement dendritique

Barre de calibration : 1 μ m en C pour A-E



15 rats ont reçu une injection unilatérale ou bilatérale de deux souches HSV-1 différentes, F et 17.

14 des 15 rats ayant reçu une injection de solution virale ont survécu.

~ 1 µl de la souche F de HSV-1, souche virulente, a été inoculée à 7 rats.

~ 1 µl de la souche 17 de HSV-1, souche virulente, a été inoculée à 6 rats.

Pour suivre l'évolution de l'infection virale, la survie des animaux a été fixée de 1 à 3 jours.

~ 2 autres rats ont reçu respectivement une injection bilatérale, de la souche F dans le SL gauche et de la souche 17(Δ42) - souche défective pour la réplication et le transport - dans le SL droit pour l'un, contre 1 µl de la souche 17 dans le SL gauche et de 17(Δ42) dans le SL droit, pour l'autre. Leur survie a été fixée arbitrairement à 2 jours.

A - Aspect du marquage

Deux anticorps différents ont été employés pour réaliser la détection immunocytochimique des souches virales.

L'un est un anticorps polyclonal fabriqué chez le lapin et qui reconnaît les principales glycoprotéines de l'enveloppe virale et au moins une protéine du noyau.

L'autre est un anticorps monoclonal fabriqué chez la souris et dirigé contre une protéine cytoplasmique.

Dans tous les cas, le marquage n'est visible qu'après amplification du signal par le kit avidine-biotine-peroxydase.

L'aspect du marquage diffère de façon importante selon l'anticorps primaire utilisé. Cependant, ils permettent tous les deux d'observer les cellules infectées sous deux formes :

~ Certains neurones ressemblent à des neurones colorés par la méthode d'imprégnation de Golgi; leurs corps cellulaires et tous leurs prolongements sont bien marqués (Fig. 11A).

~ D'autres éléments semblent être des neurones lysés, ayant laissé le virus se répandre dans l'espace périneuronal et être incorporé par des cellules gliales voisines. La fréquence d'observation de ce type d'image augmente avec le temps de survie de l'animal (Fig. 11B).

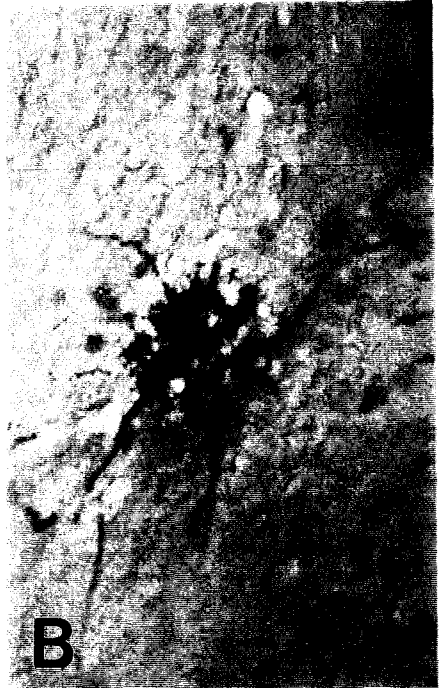
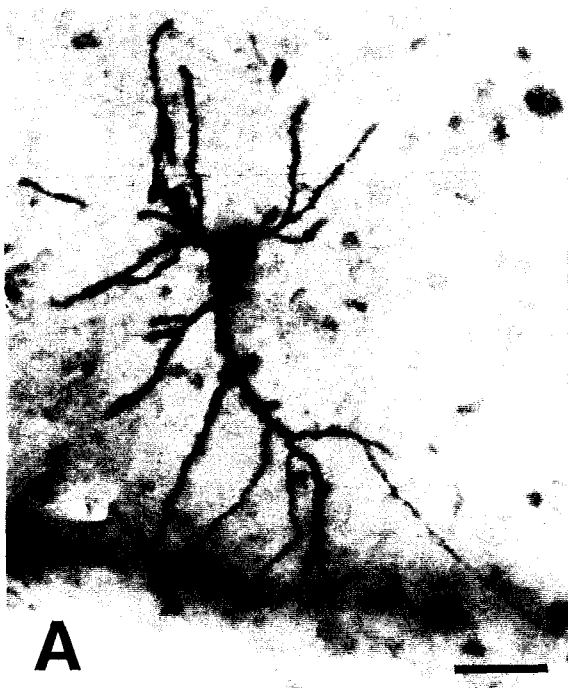
Figure 11 : Détail de la morphologie des neurones ayant incorporé les souches virales herpétiques chez le rat.

A : Le plus souvent, les neurones ayant incorporé le virus présentent, après révélation à la DAB, une morphologie comparable à celle offerte par la méthode d'imprégnation argentique de Golgi. Leur corps cellulaire et leurs arborisations dendritiques sont bien marqués.

B : Les neurones présentent parfois une morphologie irrégulière, dont la fréquence d'observation augmente avec le temps de survie de l'animal. Ces neurones semblent avoir été lysés par les particules virales, qui sont alors incorporées par les cellules gliales voisines.

C : Les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques -mais aussi paraventriculaires- sont de forme ronde. Seul le corps cellulaire, mais pas les ramifications du neurone sont visibles (pointes de flèches).

Barres de calibration : 50 μ m en A pour A-B
50 μ m en C



~ Enfin, lorsque la survie est la plus longue (2 et 3 jours), des neurones infectés sont observés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Ils présentent une morphologie particulière, puisque seul le corps cellulaire, mais pas ses prolongements, est marqué. Ils ont une forme ronde (Fig. 11C, 12E-F).

L'utilisation de l'anticorps polyclonal met en évidence les mêmes éléments formant des " taches ", qui correspondent à des neurones lysés ou à des cellules gliales infectées. Cependant, ils sont beaucoup plus nombreux que lors de l'utilisation de l'anticorps monoclonal (Fig. 12A-F). De surcroît, il induit un marquage des parois des ventricules et des cellules épendymaires qui les tapissent (Fig. 12G-I).

B - Aspect du site d'injection

Le plus souvent, le site d'injection présente une zone centrale nécrosée, de diamètre variable, entourée d'une aire envahie par les particules virales, et ce quelle que soit la durée de survie de l'animal (Fig. 12 : 2 jours en A-C, 3 jours en D-F, 1 jour en G-I).

Il est à noter que cette zone d'infection, très étendue, gagne le plus souvent le ventricule latéral (Fig. 12A-D). Il semble difficile de restreindre à une subdivision particulière du SL l'injection et l'infection virale qui en résulte.

C - Distribution du marquage

Les animaux ayant reçu une injection unilatérale de solution virale présentent, pour la plupart, une répartition semblable des neurones marqués. De plus, cette topographie est identique quelle que soit la souche inoculée, F ou 17.

Deux composantes semblent apparaître si l'on considère la topographie du marquage.

~ Certaines régions sont infectées de façon symétrique, du côté homolatéral et du côté controlatéral à l'injection (Fig. 12B-C, E-F).

Ces régions sont préférentiellement regroupées en périphérie du troisième ventricule. Ainsi, dans l'axe antéropostérieur, des neurones marqués sont abondants dans les bandelettes diagonales de Broca, l'organe vasculaire de la lame terminale, le noyau du lit de la strie terminale, l'aire préoptique dorsale et périventriculaire, très abondants dans le noyau suprachiasmatique (Fig. 11C, 12E) et nombreux dans le noyau paraventriculaire thalamique, la région périventriculaire de l'hypothalamus et la région dorsale au troisième ventricule (Fig. 12F), le noyau arqué et les régions prémamillaire et mamillaire.

Figure 12 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian du rat observées après injection de souches virales herpétiques dans le SL.

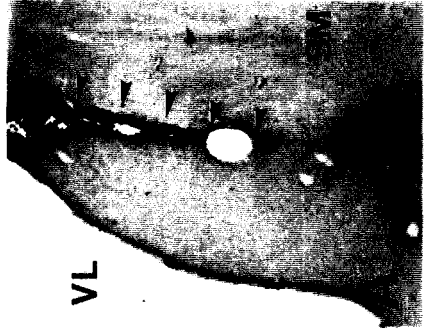
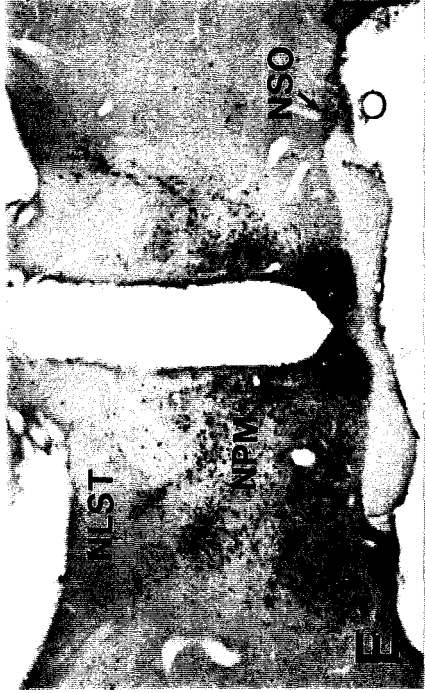
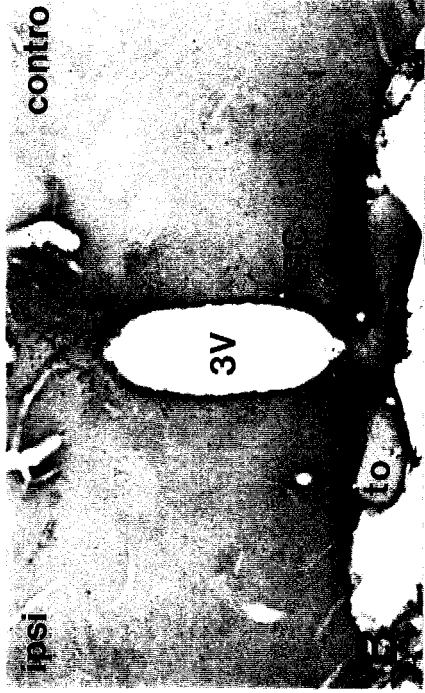
Les souches virales HSV-1 F ou 17 inoculées dans le SL de rats donnent généralement lieu à une propagation comparable dans l'encéphale (D-F), quel que soit le temps de survie. Deux rats présentent cependant une répartition différente du marquage viral (A-C, G-I).

A-C : L'un des rats sacrifiés 2 jours après une injection d'HSV-1 F, chez lequel les particules virales semblent être remontées le long du trajet de l'électrode (pointes de flèches, A) pour gagner le ventricule latéral plutôt que d'envahir le tissu lui-même, présente un marquage symétrique des structures médianes de l'aire préoptique (B) et de l'hypothalamus (C). Seuls la région périventriculaire (B-C), le noyau suprachiasmatique (NSC, B), le noyau paraventriculaire du thalamus (B), et le noyau paraventriculaire (NPV, C) contiennent des neurones marqués.

D-F : Après 3 jours de survie, l'infection virale provoque une nécrose au niveau du site d'injection dans le SL (pointes de flèches, D). Les particules virales ont envahi l'ensemble du tissu nerveux, jusqu'au ventricule latéral (D). Dans les plans postérieurs, elles donnent lieu au marquage de structures médianes symétriques, telles que l'aire périventriculaire, le noyau du lit de la strie terminale (NLST) et le noyau suprachiasmatique (NSC, E), l'aire hypothalamique périventriculaire et le noyau paraventriculaire (F). A ce marquage symétrique et médian s'ajoute un marquage ipsilatéral de structures latérales, telles que le noyau préoptique médian (NPM), l'aire préoptique latérale, l'aire dorsochiasmatique (E), puis l'aire hypothalamique latérale (AHL) et périfornicale (F). Les noyaux supraoptiques (NSO, E) et paraventriculaires (F) offrent un marquage bilatéral important des neurones magnocellulaires.

G-I : L'un des rats sacrifiés le lendemain de l'inoculation virale dans le SL, qui a déjà provoqué une importante nécrose du tissu (pointes de flèches, G), présente un marquage latéral exclusivement ipsilatéral et situé dans la région dorsochiasmatique et latérale de l'aire préoptique (H), ainsi que dans l'hypothalamus latéral et la région périfornicale (I).

Barre de calibration : 400 μ m en I pour A-I



Il est à noter que l'aire préoptique dorsale et le noyau du lit de la strie terminale sont plus marqués du côté homolatéral que controlatéral (Fig. 12E).

~ D'autres aires ne sont marquées que du côté de l'inoculation du virus (Fig. 12E-F, H-I).

Elles comprennent le noyau préoptique médian, l'aire préoptique latérale (Fig. 12E-F), l'aire hypothalamique latérale, la région périforniculaire (Fig. 12 H-I) et l'hippocampe.

De façon remarquable, il nous a été possible d'observer, chez des rats sacrifiés 1 jour après avoir reçu l'injection virale, ces deux aspects du marquage de manière dissociée :

~ L'un d'eux, photographié Fig.12A-C, montre, après une injection située à proximité du ventricule latéral, qui n'a donné lieu qu'au marquage de quelques neurones dans le SL, une distribution symétrique des neurones marqués dans le noyau du lit de la strie terminale, l'aire préoptique dorsale et périventriculaire, le noyau suprachiasmatique, l'aire ventromédiane au fornix, la zona incerta, l'aire hypothalamique périventriculaire, et de façon plus ténue dans le noyau paraventriculaire, le noyau arqué et la région prémamillaire.

~ L'autre, illustré par les Fig. 12G-I, montre au contraire un marquage dissymétrique, exclusivement homolatéral à l'injection, centrée dans le SL mais qui ne s'étend pas jusqu'au ventricule latéral (Fig. 12G). Les particules virales sont retrouvées dans les bandelettes diagonales de Broca, l'aire préoptique dorsale, la partie latérale du noyau préoptique médian et surtout l'aire préoptique latérale (Fig. 12H), l'aire ventromédiane au fornix, la zona incerta, l'aire hypothalamique latérale (Fig 12I), l'hippocampe et la région prémamillaire (rares neurones). Il faut souligner que le noyau suprachiasmatique est absolument dénué de marquage (Fig. 12H).

Lorsque le temps de survie est suffisamment long (2 et 3 jours), de nombreux corps cellulaires sont observés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires (Fig. 11C, 12E-F).

Enfin, les 2 rats ayant reçu une double injection de virus présentent un envahissement complet de toutes les structures préoptiques, hypothalamiques et hippocampiques par les virus, et il est impossible de discerner une différence de propagation des deux souches si l'on considère l'hypothèse selon laquelle elles auraient été transportées de façon spécifique et unilatérale.

IV - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le cobaye et le rat par l'utilisation de la détection immunocytochimique et/ou du transport axonal rétrograde

Dans le but de préciser l'existence d'une influence septale directe sur les populations neuroendocrines, nous avons associé le traçage des efférences septales par le F-R ou le dextran biotinylé à la détection des populations de neurones possédant les récepteurs nucléaires de la progestérone puis des neurones hypophysiotropes en général (chez le cobaye) et en particulier des neurones à LHRH (chez le rat). L'investigation des relations entre les efférences septales et les neurones magnocellulaires a également été menée (chez le cobaye).

A - Neurones possédant les récepteurs nucléaires de la progestérone (étude chez le cobaye)

Cinq cobayes ont d'une part, subi une ovariectomie suivie d'un traitement à l'oestradiol pour induire l'expression des récepteurs de la progestérone et, d'autre part, reçu une injection de F-R dans le SL pour marquer les efférences septales.

Pour 3 d'entre eux, cette injection est centrée dans le SLml et concerne un groupe restreint de neurones (100 à 200 corps cellulaires marqués sont dénombrés).

En raison de la finesse des coupes requise pour leur traitement immunocytochimique (12 μ m), le nombre de fibres septales marquées sur chacune d'elles est assez faible.

C'est pourquoi la révélation immunocytochimique des cellules contenant les récepteurs de la progestérone n'est faite que sur des coupes dont on sait qu'elles contiennent des régions innervées par le SL, d'une part, et fortement immunoréactives pour les récepteurs de la progestérone, d'autre part.

L'aire préoptique périvertriculaire et médiane et le noyau arqué sont riches en cellules immunoréactives.

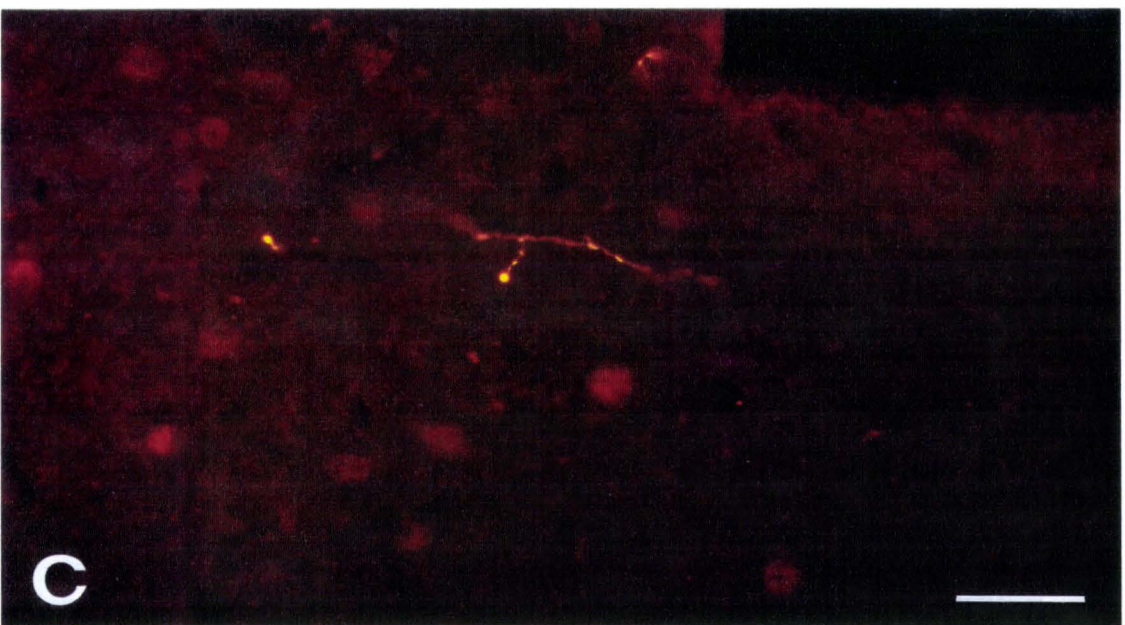
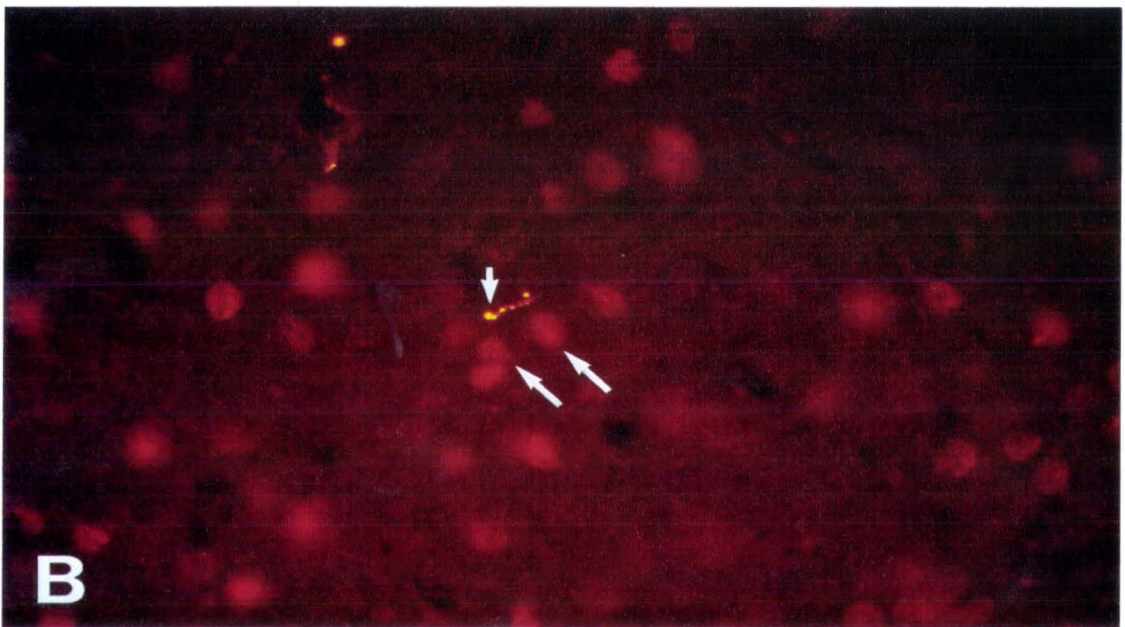
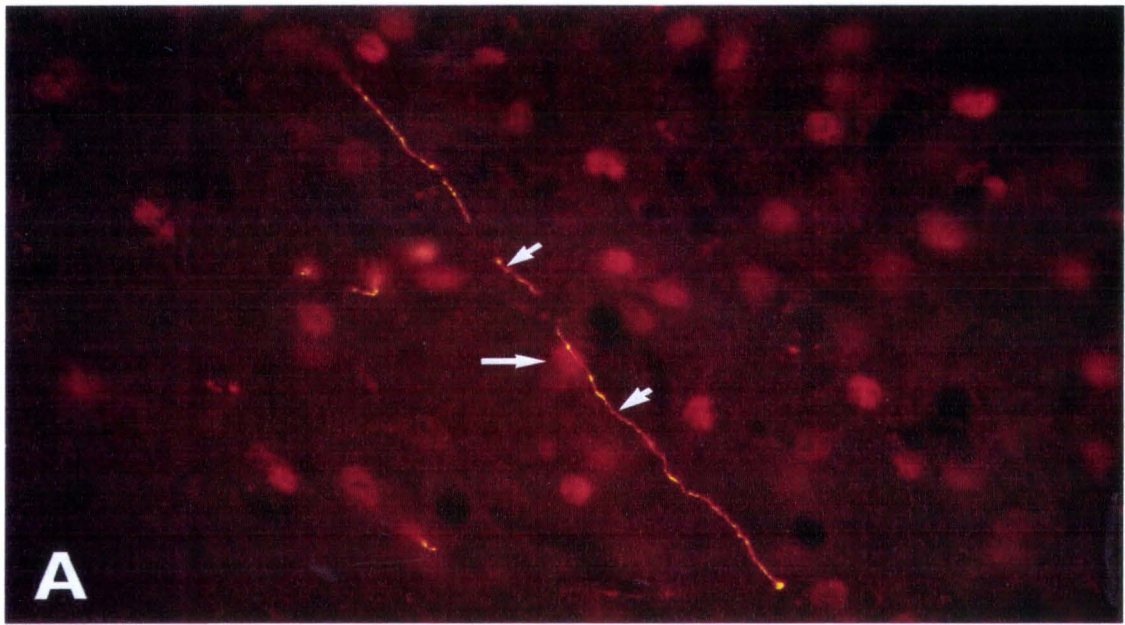
Après traitement immunocytochimique, l'observation des coupes en microscopie de fluorescence avec le filtre pour la rhodamine fait apparaître simultanément les fibres issues du SL en rouge-orangé et le marquage nucléaire des neurones contenant les récepteurs à la progestérone en rouge foncé (Fig. 13A-C).

L'observation de ces régions en microscopie de fluorescence à fort grossissement montre que les efférences septales sont rarement présentes dans les groupes de neurones

Figure 13 : Microphotographies en fluorescence réalisées à la suite d'une injection de F-R dans le SLml du cobaye, combinée à la détection immunocytochimique des neurones possédant les récepteurs de la progestérone.

Les groupes de neurones possédant les récepteurs nucléaires de la progestérone (grosses flèches) dans l'aire préoptique médiane (A) et le noyau arqué (B-C) sont rarement traversés par des efférences septales (petites flèches) dont l'aspect ponctué mais peu ramifié ne laisse augurer de la présence que de rares contacts.

Barre de calibration : 10 μ m en C pour A-C



immunoréactifs pour les récepteurs de la progestérone. Les microphotographies sont le résultat d'une simple exposition en fluorescence.

Les groupes de neurones possédant les récepteurs de la progestérone dans l'aire préoptique sont parcourus par de rares fibres, non ramifiées, issues du SLml (Fig. 13A).

Dans le noyau arqué, des efférences septales sont observées plus fréquemment parmi les neurones contenant les récepteurs de la progestérone, sans qu'elles semblent destinées à établir des contacts avec ces neurones (Fig. 13B-C).

B - Neurones hypophysiotropes (étude chez le cobaye)

Les neurones hypophysiotropes libèrent dans les capillaires du plexus-porte de l'éminence médiane leurs produits de sécrétions peptidergiques, qui contrôlent la libération des hormones antéhypophysaires.

1 - Mise en évidence des neurones hypophysiotropes

Vingt cobayes ont reçu une injection intracardiaque de G-B ou de F-G. Le traceur est véhiculé dans la totalité de l'appareil circulatoire. Au niveau cérébral, il gagne les capillaires du plexus-porte de l'éminence médiane, qui sont dénués de barrière hémato-encéphalique.

Pour cette raison, les terminaisons nerveuses des neurones hypophysiotropes qui se trouvent à leur contact, incorporent le traceur et le transportent par voie rétrograde le long de leur axone pour l'accumuler finalement au niveau de leur corps cellulaire.

2 - Mise en évidence des efférences septales

Dix des 20 cobayes ayant reçu une injection intracardiaque de G-B ou de F-G présentent une injection de F-R centrée dans le SLml.

3 - Distribution des neurones marqués par transport rétrograde de G-B ou de F-R

Après injection intracardiaque de G-B ou de F-G, les neurones hypophysiotropes rendus fluorescents après transport rétrograde sont recensés dans différentes régions de l'aire préoptique et de l'hypothalamus.

Les neurones marqués par le G-B contiennent des granules bleus brillants dans leur cytoplasme (Fig. 15A-D, F).

Les neurones marqués par le F-G montrent un marquage homogène du noyau et des dendrites proximaux (Fig. 15E).

Quel que soit le traceur utilisé, l'intensité du marquage est identique et optimale après une survie de cinq jours de l'animal. Ce marquage est bilatéral (Fig. 14A-H).

Le plus grand nombre de neurones fluorescents parvocellulaires est observé dans l'aire périventriculaire qui s'étend de l'aire préoptique à l'hypothalamus postérieur, incluant la partie parvocellulaire -la plus médiane- du noyau paraventriculaire. Des corps cellulaires marqués sont également observés dans le noyau préoptique médian, autour de l'organe vasculaire de la lame terminale et dans la région ventrale du troisième ventricule qui sépare les noyaux suprachiasmatiques. D'autres neurones sont présents dans la région latérodorsale aux noyaux suprachiasmatiques et dans l'aire latérale qui s'étend du sommet du tractus optique aux colonnes du fornix. Postérieurement, les neurones du noyau arqué sont marqués de façon extensive.

Si l'on compare la qualité du marquage obtenu dans ce noyau, le G-B est préférable au F-G car il ne marque que les neurones hypophysiotropes alors que le F-G marque également les tanocytes, rendant difficile les observations dans le noyau arqué.

Le noyau ventromédian et la région mamillaire, bien que proches de la zone d'incorporation du traceur, ne contiennent aucun neurone marqué.

4 - Distribution des efférences septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus

Elle est strictement identique à celle observée dans nos travaux antérieurs (Fig. 14A-H).

5 - Distribution des fibres marquées par le F-R contactant des corps cellulaires marqués par le G-B (ou le F-G)

La confrontation de la topographie des deux populations neuronales est effectuée en microscopie de fluorescence, en alternant les filtres pour mettre en évidence successivement, et dans le même plan focal, les fibres septales et les neurones hypophysiotropes marqués. Les microphotographies illustrant ces juxtapositions sont réalisées par une double exposition en fluorescence utilisant les filtres appropriés.

Figure 14 : Représentation schématique de la distribution des efférences septales et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, marqués respectivement après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de F-G ou de G-B, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

La distribution des efférences septales est comparable à celle décrite Fig. 3.

Les neurones parvocellulaires hypophysiotropes sont recensés dans l'aire antéroventrale périventriculaire (APMav), l'aire préoptique antérieure et médiane (APM), l'aire hypothalamique périventriculaire, l'aire périfornicale, le noyau paraventriculaire (NPV) parvocellulaire et le noyau arqué (NA).

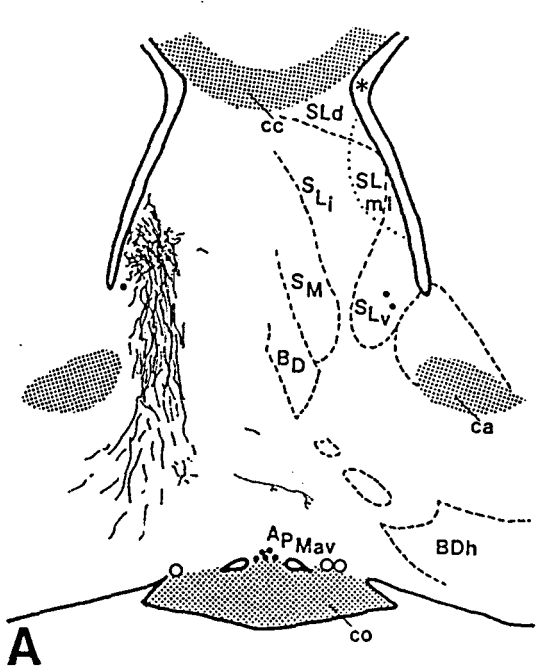
Les neurones magnocellulaires sont présents dans les noyaux supraoptiques (NSO) et paraventriculaires, et les noyaux magnocellulaires accessoires, notamment le long du tractus optique (to), à la base de l'encéphale.

Seules l'aire préoptique médiane et l'aire hypothalamique périventriculaire contiennent à la fois les efférences septales et les neurones hypophysiotropes.

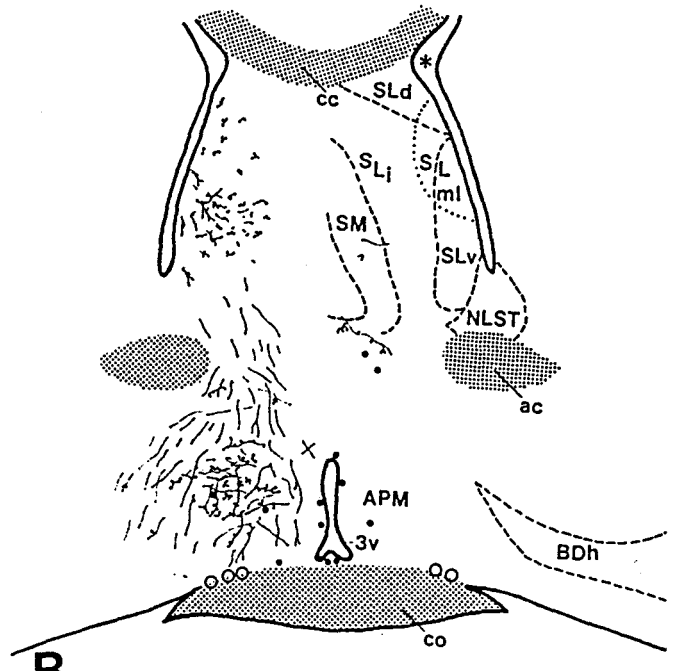
Les autres régions présentant des neurones marqués par le F-G ou le G-B sont bordées plutôt qu'envahies par les fibres septales.

Cercles pleins : neurones hypophysiotropes

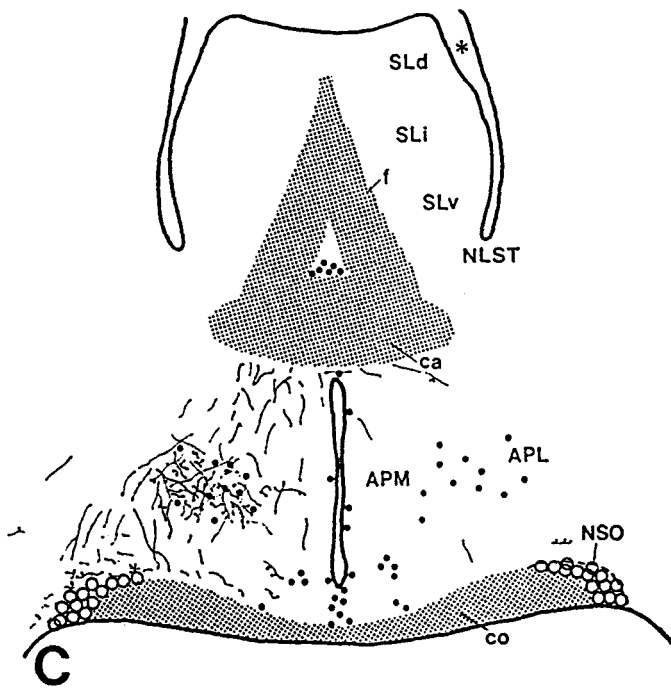
Cercles : neurones magnocellulaires



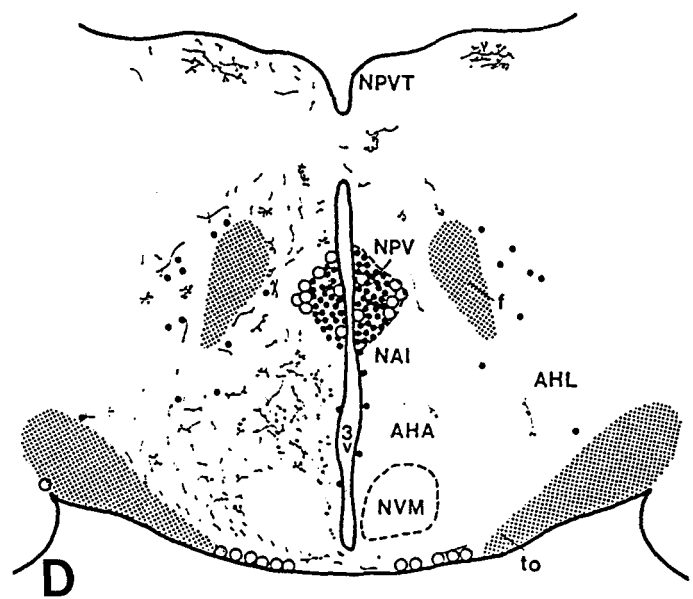
A



B



C



D

Figure 14 : Représentation schématique de la distribution des efférences septales et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, marqués respectivement après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de F-G ou de G-B, sur des plans frontaux présentés d'avant en arrière.

La distribution des efférences septales est comparable à celle décrite Fig. 3.

Les neurones parvocellulaires hypophysiotropes sont recensés dans l'aire antéroventrale périventriculaire (APMav), l'aire préoptique antérieure et médiane (APM), l'aire hypothalamique périventriculaire, l'aire périfornicale, le noyau paraventriculaire (NPV) parvocellulaire et le noyau arqué (NA).

Les neurones magnocellulaires sont présents dans les noyaux supraoptiques (NSO) et paraventriculaires, et les noyaux magnocellulaires accessoires, notamment le long du tractus optique (to), à la base de l'encéphale.

Seules l'aire préoptique médiane et l'aire hypothalamique périventriculaire contiennent à la fois les efférences septales et les neurones hypophysiotropes.

Les autres régions présentant des neurones marqués par le F-G ou le G-B sont bordées plutôt qu'envahies par les fibres septales.

Cercles pleins : neurones hypophysiotropes

Cercles : neurones magnocellulaires

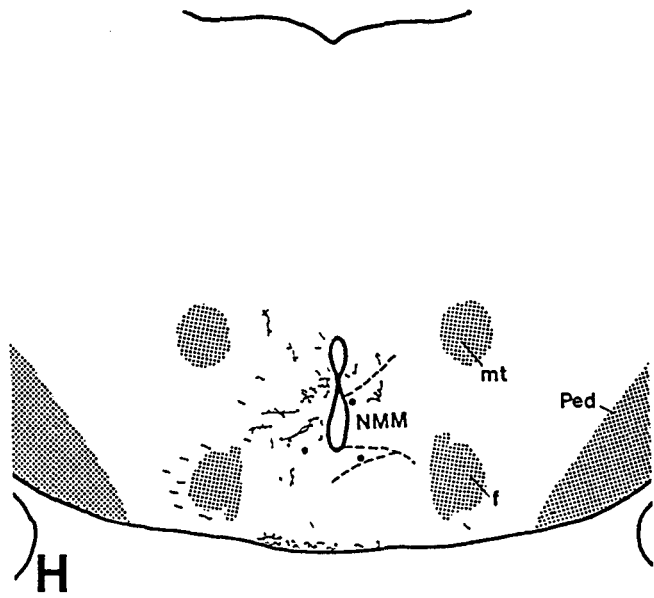
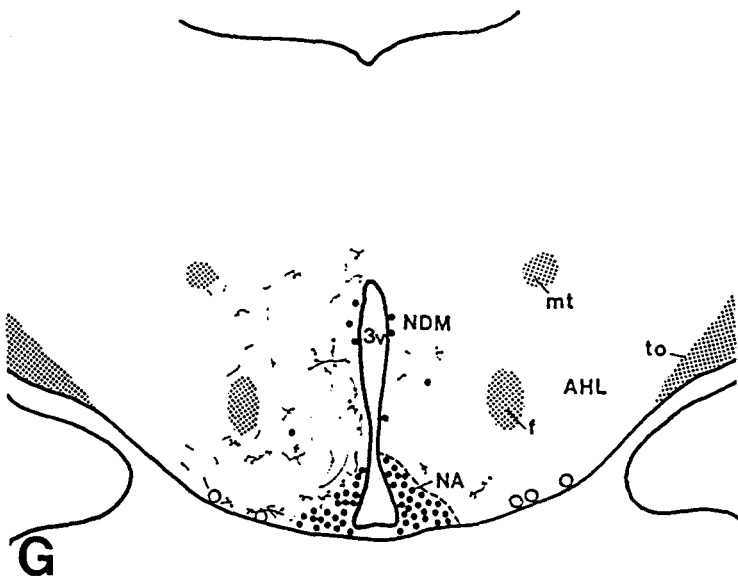
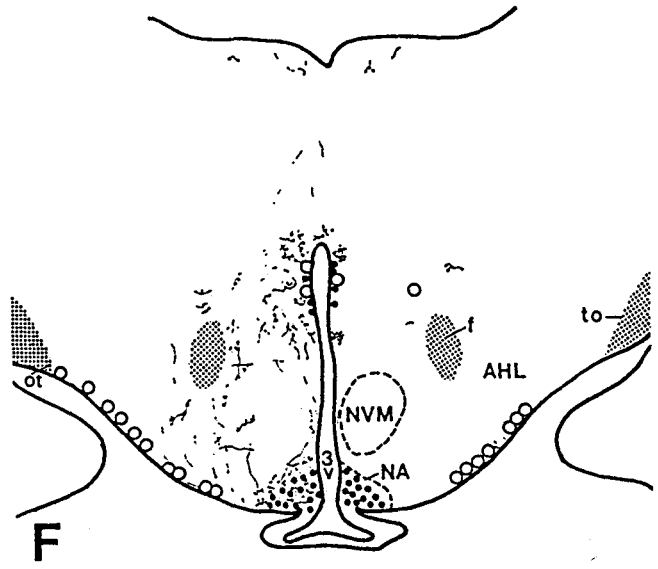
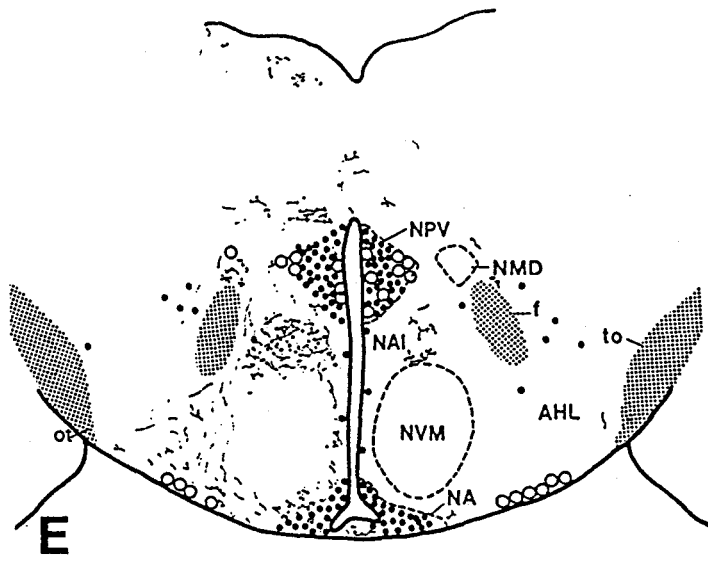


Figure 15 : Microphotographies en fluorescence des efférences septales et des neurones hypophysiotropes et magnocellulaires dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du cobaye, marqués respectivement après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de F-G ou de G-B, sur des coupes frontales.

A : L'aire préoptique est richement innervée par le SL et contient les corps cellulaires de nombreux neurones hypophysiotropes. Certaines fibres septales variqueuses semblent en relation étroite avec les corps cellulaires de neurones marqués par transport rétrograde de G-B (flèche).

B : Un contact est observé à plus fort grossissement, dans l'aire préoptique.

C : Des contacts sont observés entre les efférences septales et les corps cellulaires de neurones magnocellulaires (flèche), en périphérie du noyau supraoptique.

D : De la même façon, les neurones magnocellulaires de la partie latérale du noyau paraventriculaire, marqués par le G-B, reçoivent une innervation septale (flèche).

E : Les longues fibres ponctuées issues du SLml semblent établir des contacts " en passant " avec les neurones de l'aire hypothalamique périventriculaire.

F : De l'abondante innervation septale observée en périphérie du noyau arqué, sont issues quelques fibres qui semblent établir des contacts avec les neurones hypophysiotropes au sein-même du noyau arqué.

Double-exposition du film photographique après illumination révélant le F-R ou le G-B (ou le F-G).

Astérisque : troisième ventricule

Barres de calibration : 25 μ m

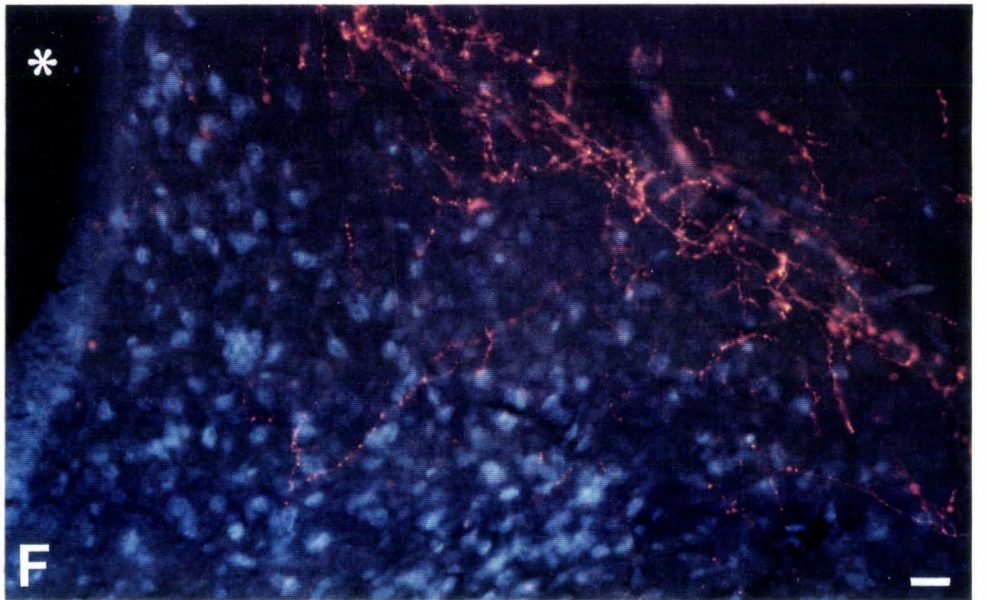
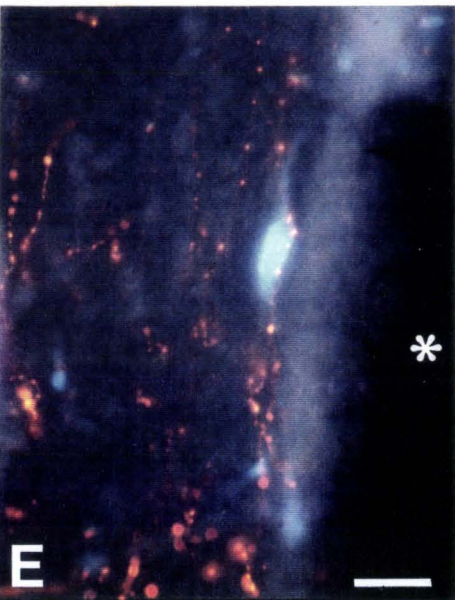
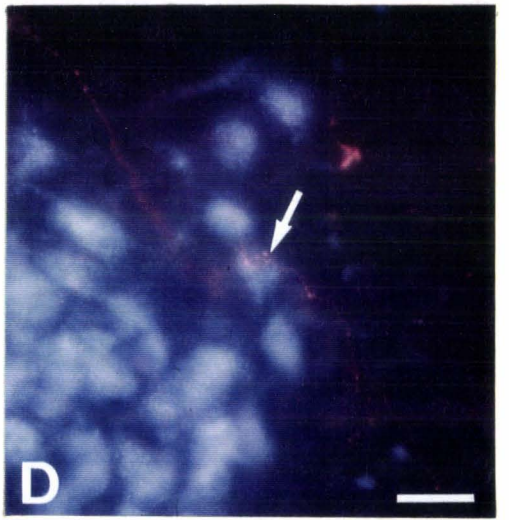
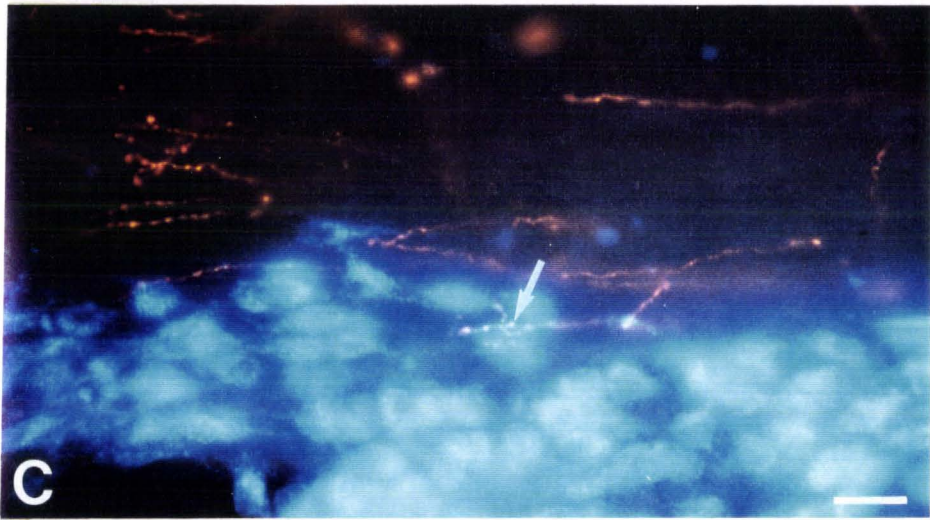
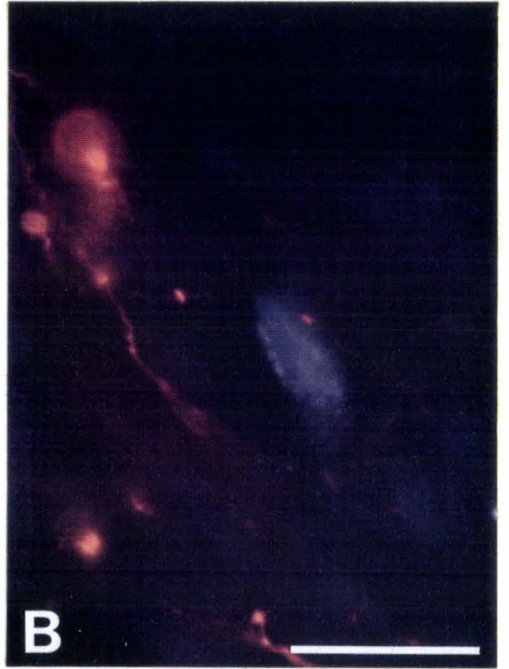
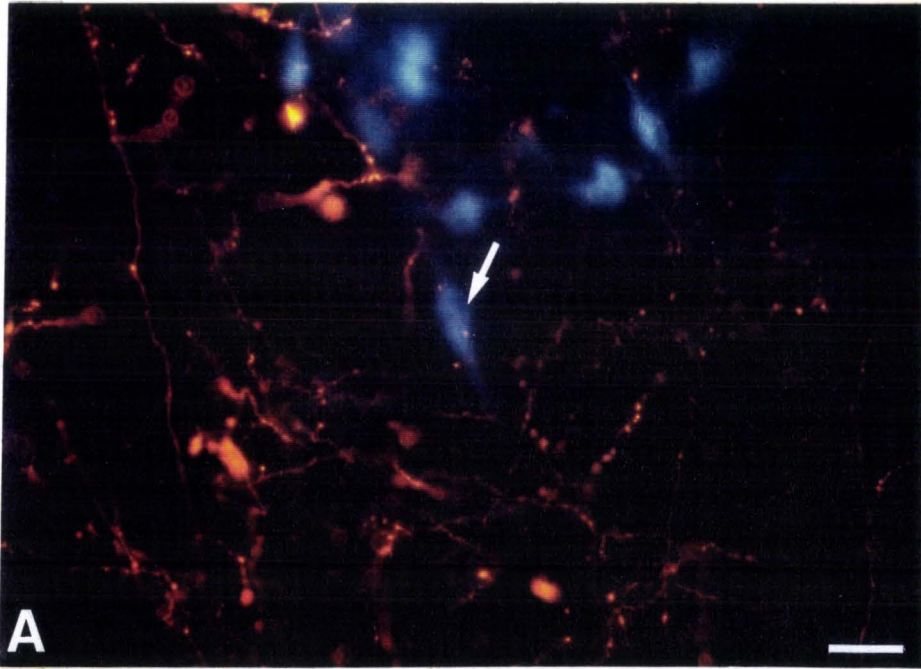
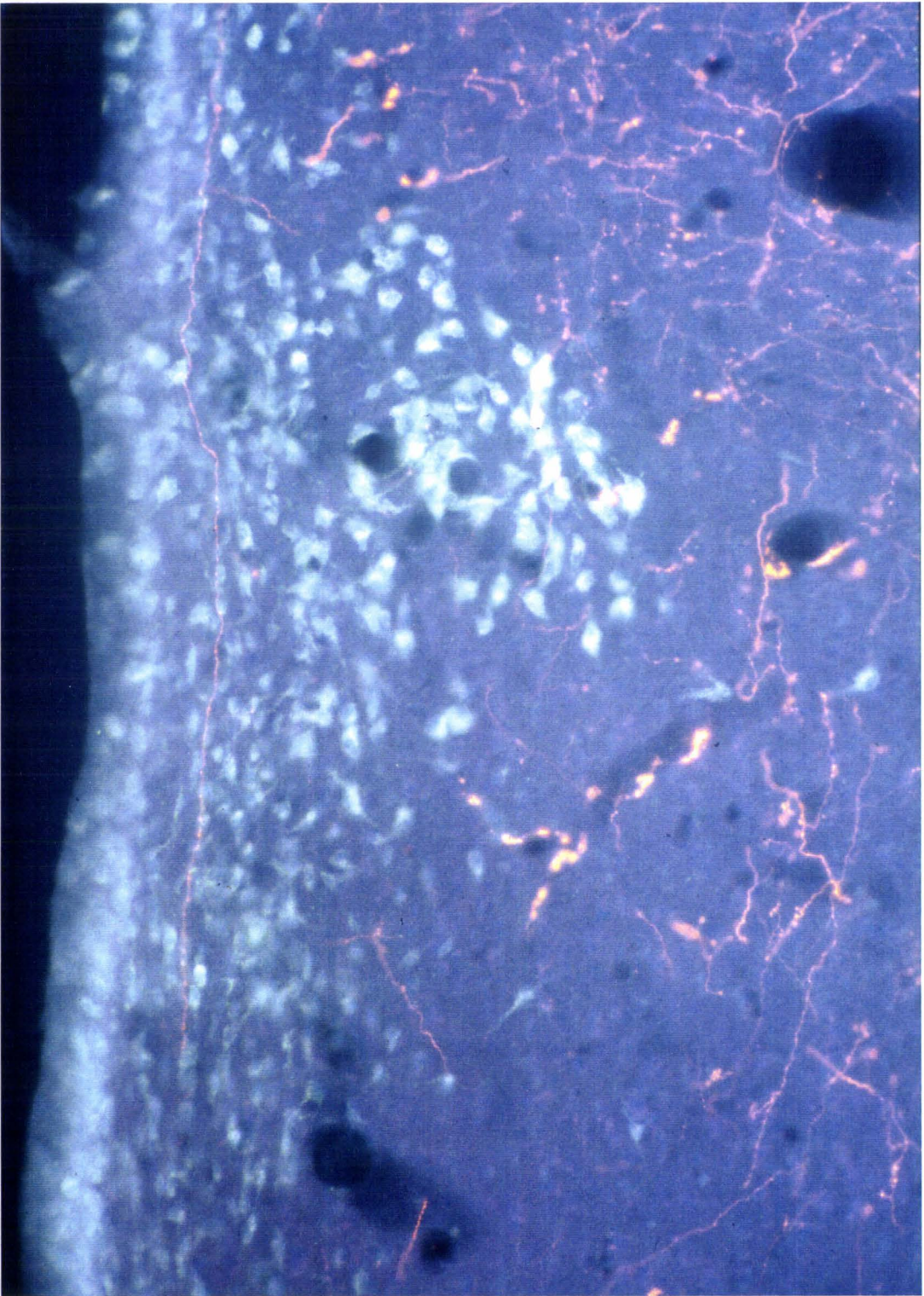


Figure 16 : Microphotographies en fluorescence d'une coupe frontale du noyau paraventriculaire de cobaye observée après injection iontophorétique de F-R dans le SLml et injection intracardiaque de G-B.

Les fibres septales qui parcourent le noyau paraventriculaire parvocellulaire selon un axe dorsoventral pourraient établir des contacts " en passant " avec les neurones hypophysiotropes de cette région.

Double-exposition du film photographique après illumination révélant le F-R ou le G-B.

Barre de calibration : 50 μ m



Seules l'aire préoptique et l'aire hypothalamique périventriculaire contiennent à la fois de nombreuses efférences septales et les corps cellulaires de neurones hypophysiotropes (Fig. 14B-E, 15A-B,E).

Au contraire, le noyau arqué, qui contient un grand nombre de neurones hypophysiotropes, n'est intéressé par l'innervation septale que dans sa périphérie (Fig. 14E-G, 15F).

Cependant, d'étroites associations entre des efférences septales et les neurones hypophysiotropes sont observées dans toutes ces régions (Fig. 15A-F).

Le plus grand nombre des contacts est relevé dans l'aire préoptique, où des fibres, présentant des boutons en passant ou des boutons terminaux, établissent une communication avec les corps cellulaires marqués (Fig. 15A-B).

La région parvocellulaire du noyau paraventriculaire, plus médiane, n'est traversée que par de rares fibres, qui semblent établir des contacts " en passant " (Fig. 16).

Dans l'aire hypothalamique périventriculaire, les fibres septales qui longent le troisième ventricule présentent de nombreuses varicosités reflétant des contacts possibles avec des corps cellulaires marqués (Fig. 15E).

Certaines efférences septales observées en périphérie du noyau arqué, ainsi que quelques fibres qui entrent dans le noyau, sont observées en étroite relation avec des neurones hypophysiotropes (Fig. 15F).

C - Neurones à LHRH (étude chez le rat)

Les neurones à LHRH ont été visualisés par immunofluorescence sur 6 rats mâles.

1 - Distribution des neurones à LHRH

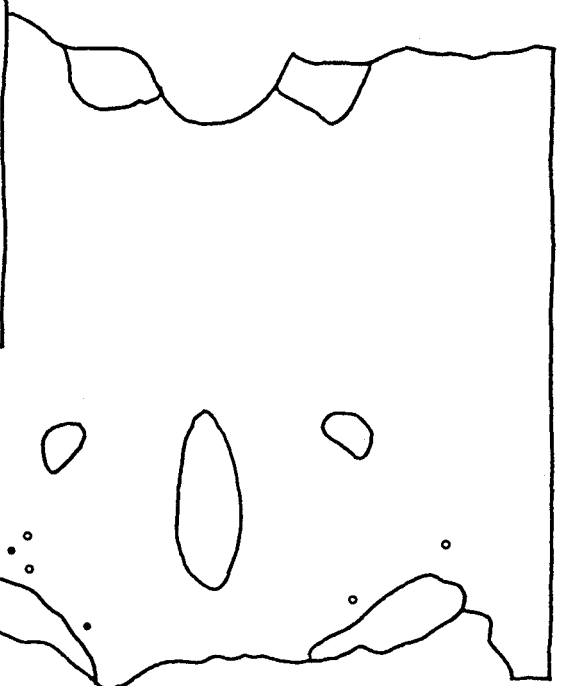
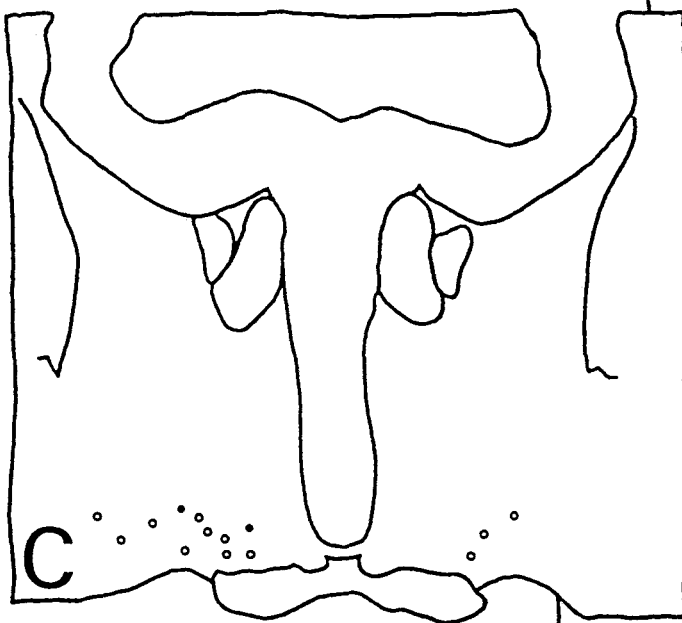
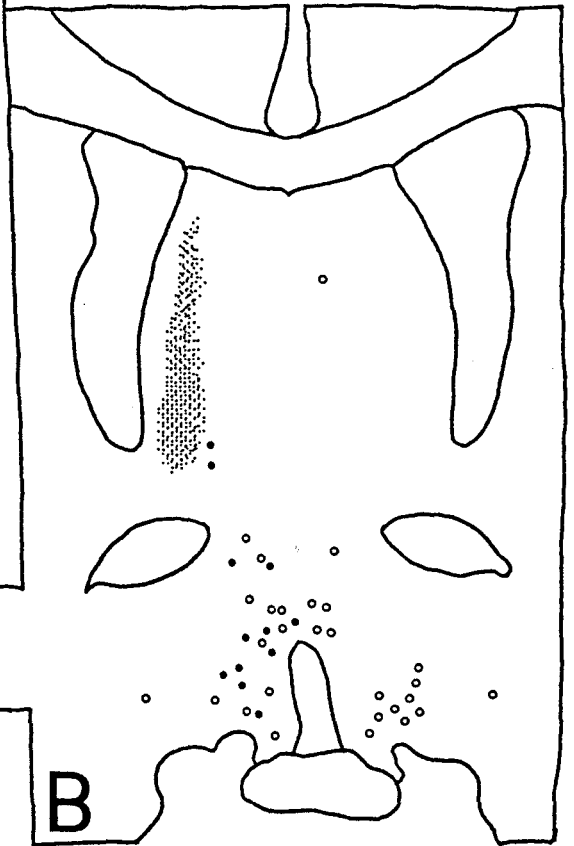
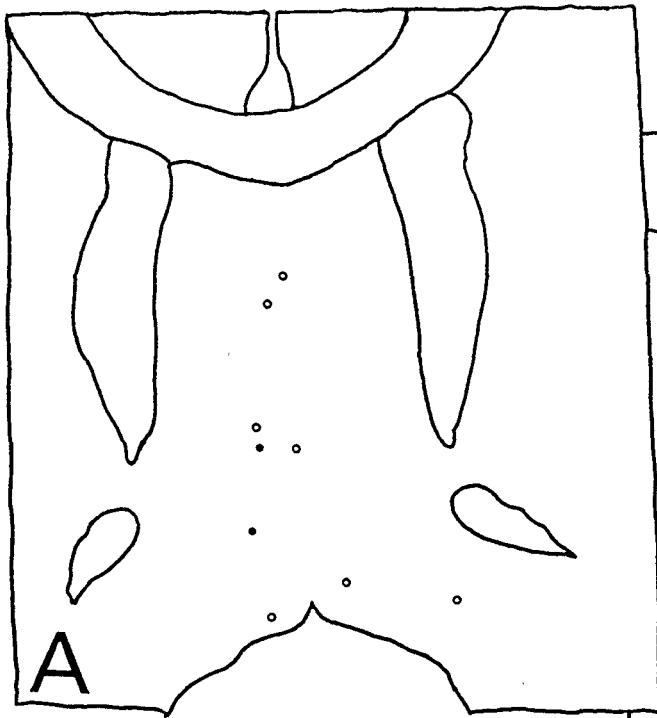
La répartition des neurones immunoréactifs pour la LHRH telle que nous l'avons observée est strictement conforme à celle reportée dans les nombreux travaux qui lui ont été consacrés (Fig. 17A-D). Brièvement, ces neurones sont présents dans le septum médian, les bandelettes diagonales de Broca puis densément regroupés autour de l'organe vasculaire de la lame terminale. Dans l'aire préoptique antérieure, ils forment un continuum de cellules qui s'étend de sa portion dorsomédiale à sa portion ventrolatérale. Leur nombre diminue dans les plans postérieurs, où ils sont présents au sommet du tractus optique dans toute son étendue rostrocaudale.

Le comptage des neurones immunoréactifs pour la LHRH permet d'évaluer à 1300 le nombre moyen de péricaryons par animal.

Figure 17 : Distribution des neurones immunoréactifs pour la LHRH et recevant une innervation d'origine septale visualisée après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v du rat.

Dessin à la chambre claire de coupes frontales de 40 μm chez un animal non traité par la colchicine. Coupes présentées d'avant en arrière.

Les neurones à LHRH contactés par des fibres septales sont recensés du côté ipsilatéral à l'injection. Leur présence n'est pas limitée à une région donnée; au contraire, ils sont disséminés dans l'ensemble de la population neuronale, à savoir dans le septum médian (A), l'aire préoptique antérieure dorsale et latérale (B), et au-dessus du tractus optique (C).



- Neurone à GnRH innervé
- Neurone à GnRH non innervé
- ⊗ Site d'injection

Les neurones à LHRH présentent deux morphologies différentes. Certains ont un aspect lisse et fusiforme (Fig. 18B), d'autres arborent de nombreuses épines somatiques et dendritiques qui leur confèrent un contour plus irrégulier (Fig. 18C). D'autres encore sont plus difficiles à classer et sont dits de forme " intermédiaire ". Ces deux types de neurones sont rencontrés indifféremment dans les encéphales observés.

2 - Mise en évidence des efférences septales

Les 6 rats ont reçu une injection iontophorétique de dextran biotinylé dans le SLml/v (Fig. 17B).

3 - Observation des juxtapositions entre les efférences septales et les neurones à LHRH

L'observation combinée en lumière blanche et en fluorescence permet de visualiser respectivement, les efférences septales, révélées par la DAB, et le système à LHRH, marqué par la fluorescéine (Fig. 18).

Les microphotographies illustrant cette étude comprennent toujours une simple exposition en lumière blanche, une simple exposition en fluorescence et une double exposition (Fig. 18).

L'examen des coupes (40 μm) à fort grossissement a permis de recenser un grand nombre de juxtapositions entre les efférences septales et les corps cellulaires des neurones à LHRH.

La Fig. 17 présente, sur des coupes dessinées à la chambre claire, la répartition des neurones à LHRH que l'on y a observé, et parmi eux, ceux qui sont innervés par les fibres septales.

Le nombre de juxtapositions relevées est récapitulé dans le tableau N°2.

Figure 18 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique du rat observées après injection de dextran biotinyté dans le SLml/v et détection immunocytochimique des neurones à LHRH en fluorescence.

A : Sur une seule coupe épaisse de 40 µm réalisée au niveau de l'aire préoptique antérieure, plusieurs neurones à LHRH, visualisés par la fluorescéine (A1), sont observés au contact d'efférences septales, révélées par la DAB (A2). Chacun de ces neurones (B, C, E) sont photographiés après observation à plus fort grossissement.

Les clichés présentés sont réalisés successivement par une simple exposition en fluorescence (B1, C1, D1, D'1, E1, F1), puis une simple exposition en lumière blanche (B2, C2, D2, D'2, E2, F2), puis par une double exposition (B3, C3, D3, D'3, E3, F3).

B1-B3 : Des terminaisons septales sont observées jouxtant les corps cellulaires de neurones à LHRH (flèches). Par comparaison, d'autres boutons terminaux ne sont pas observés au contact de neurones marqués (petites flèches).

C1-C3 : De façon remarquable, certaines fibres septales longent le tronc dendritique d'un neurone à LHRH. Elles présentent de nombreuses ponctuations, et pourraient ainsi établir de multiples contacts " en passant " (flèches). D'autres boutons terminaux sont observés à proximité de neurones marqués, sans être en relation avec eux (petites flèches).

D1-D3, D'1-D'3 : Le même neurone à LHRH, observé dans deux plans focaux différents (D1-D3, D'1-D'3), est enveloppé de façon spectaculaire par des terminaisons septales. De nombreuses appositions sont relevées au niveau du soma (flèches, D1-D3), comme des dendrites (flèches, D1-D3, D'1-D'3). Des terminaisons isolées sont observées au voisinage du neurone (petites flèches).

E1-E3 : Une fibre septale se faufile entre deux neurones à LHRH (flèche).

F1-F3 : Cet autre neurone à LHRH est innervé par une terminaison septale au niveau de son corps cellulaire (flèche).

Il est à noter que cet animal a également subi une stimulation électrique du SLml, suivie d'une détection de la protéine Fos par la DAB; en raison de sa médiocre visualisation, elle n'est cependant pas évoquée dans notre étude.

Barres de calibration : 40 µm en A1 pour A1-A2

20 µm en B1 pour B1-B3 et C1-C3

20 µm en F1 pour D1-D3, D'1-D'3, E1-E3 et F1-F3

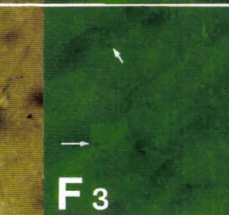
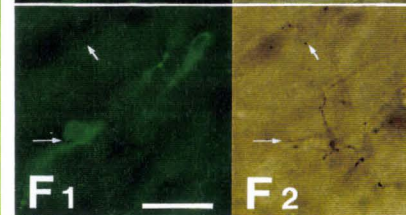
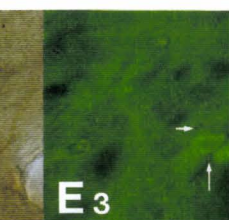
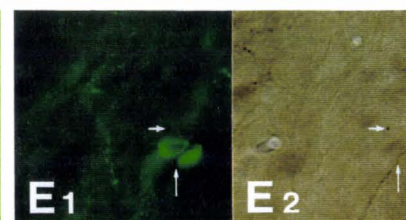
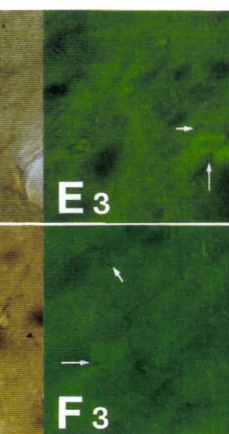
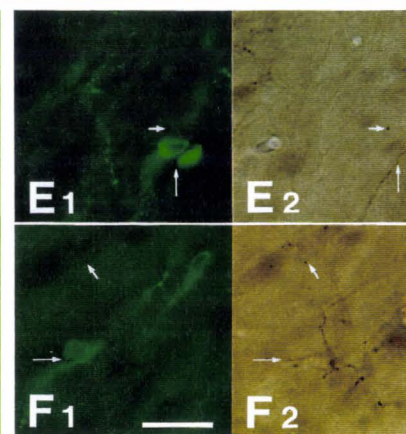
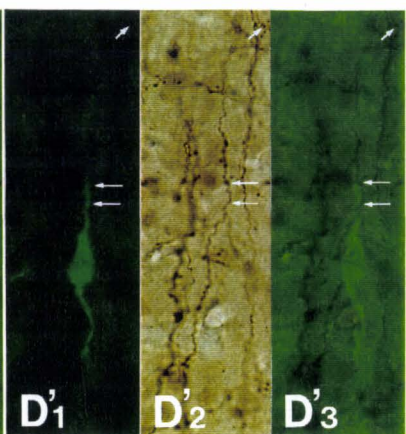
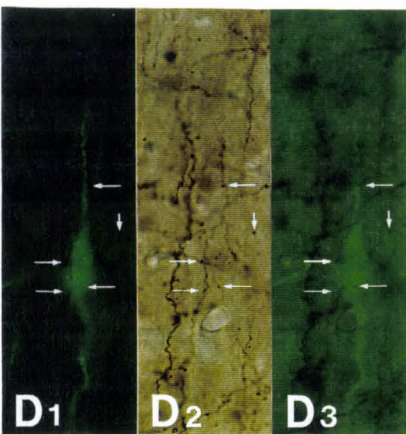
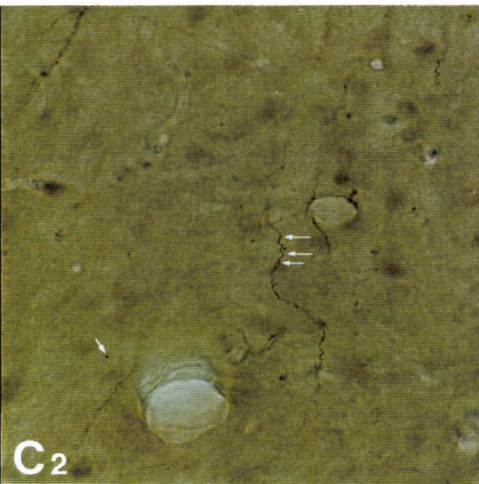
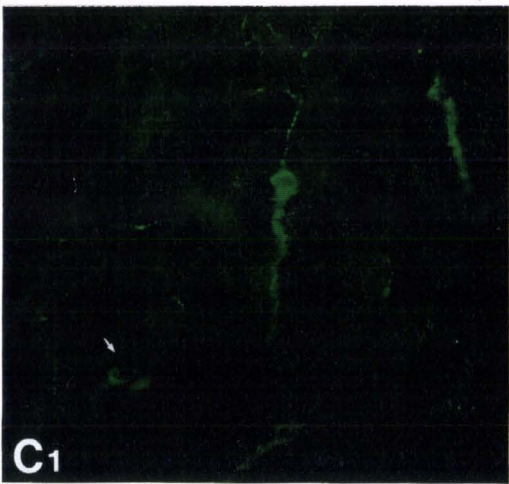
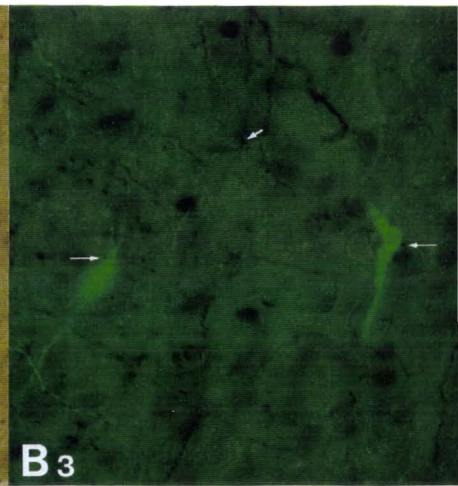
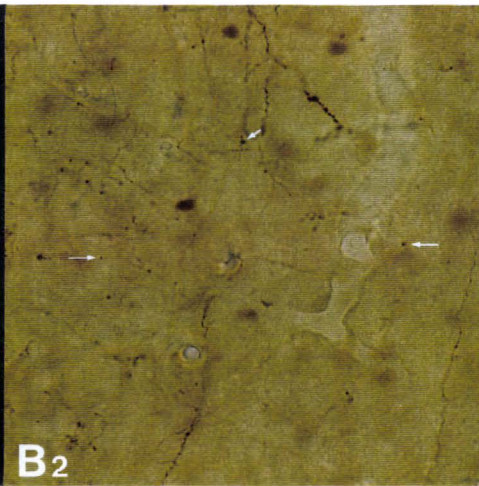
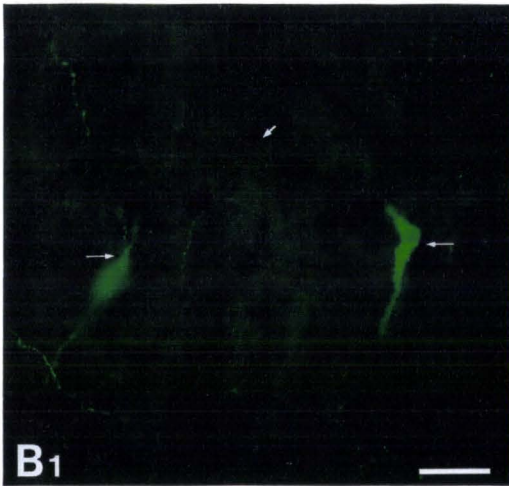
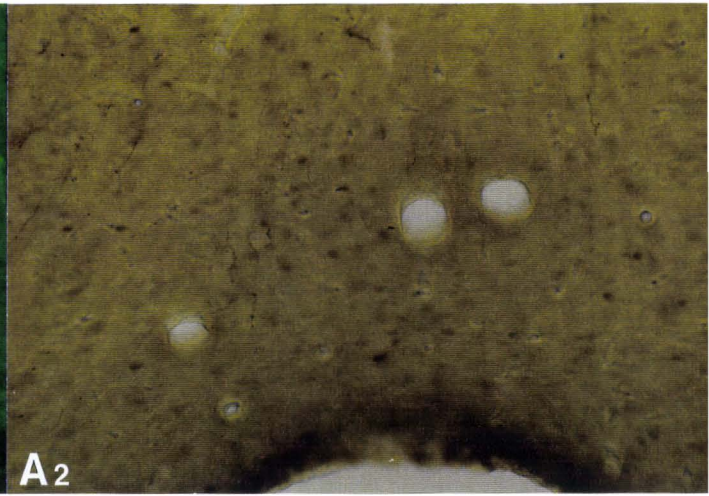
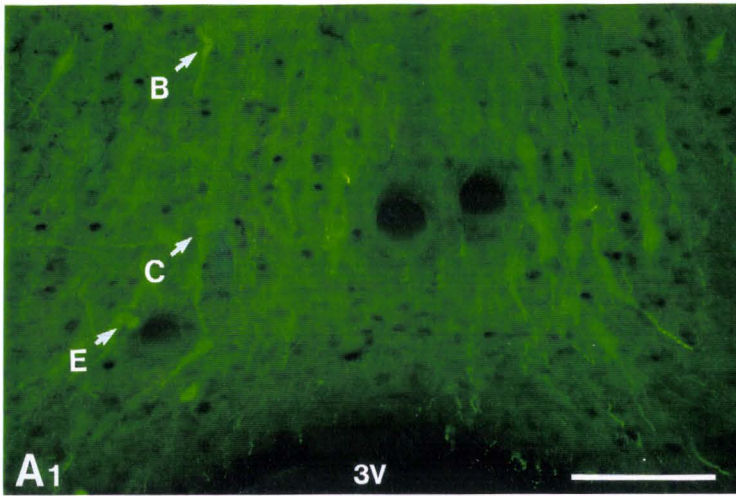


Tableau N°2 : Nombre de neurones à LHRH relevés au contact d'efférences septales, après injection de dextran biotinylé dans le SLml/v.

| Rat étudié | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|--------------------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| Nb coupes observées | 1/2 | | 1/2 | | 1/2 | | 1/1 | | 1/1 | | 1/1 | |
| Côté observé* | IL | CL | IL | CL | IL | CL | IL | CL | IL | CL | IL | CL |
| Nb total de neurones | 263 | 235 | 263 | 260 | 232 | 182 | 606 | 490 | 584 | 474 | 467 | 474 |
| Nb de neurones contactés | 109 | 10 | 73 | 13 | 85 | 4 | 166 | 8 | 179 | 4 | 119 | 7 |
| % neurones contactés | 41,4 | 4,3 | 27,8 | 5 | 36,6 | 2,2 | 27,4 | 1,6 | 30,7 | 0,8 | 25,5 | 1,5 |

* IL/CL : côté homolatéral/controlatéral à l'injection

Il apparaît que 20 à 40 % des neurones à LHRH homolatéraux à l'injection reçoivent des terminaisons ou des varicosités septales.

Les contacts sont observés indifféremment sur l'appareil dendritique proximal (Fig. 18C-D) et/ou sur le péricaryon du neurone (Fig. 18B-E), parfois sur des épines somatiques.

Cette projection est uniforme et ne concerne pas préférentiellement un sous-groupe particulier de neurones à LHRH, que l'on considère leur morphologie (lisse, irrégulière ou intermédiaire) ou leur répartition topographique (Fig. 17).

D - Neurones magnocellulaires (étude chez le cobaye)

Les neurones magnocellulaires libèrent leurs produits de sécrétion peptidergiques, les neurohormones ocytocine et vasopressine, dans les capillaires de la post-hypophyse.

1 - Mise en évidence des neurones magnocellulaires

L'injection intracardiaque de F-G ou de G-B réalisée sur les 20 cobayes conduit, après 5 jours de survie, en plus du marquage des neurones hypophysiotropes, au marquage par voie rétrograde des neurones magnocellulaires dont les terminaisons ont incorporé le traceur au niveau des capillaires de la post-hypophyse.

2 - Mise en évidence des efférences septales

Vingt cobayes ont reçu une injection de F-R dans le SL, associée à l'injection intracardiaque de F-G ou de G-B. Dix d'entre eux présentent une injection centrée dans le SLml qui donne lieu au marquage observé au cours de nos expériences antérieures (Fig. 14A-H).

3 - Distribution des neurones magnocellulaires marqués par transport rétrograde de G-B ou de F-G

Les neurones magnocellulaires, de grande taille, sont observés essentiellement dans les noyaux supraoptiques, et les parties périventriculaire et latérale des noyaux paraventriculaires. Certains sont présents également dans les groupes magnocellulaires accessoires, latéralement aux noyaux paraventriculaires, et sous la surface piaie à la base de l'hypothalamus (Fig. 14A-G).

4 - Distribution des fibres marquées par le F-R contactant les corps cellulaires des neurones magnocellulaires

Les noyaux supraoptiques et paraventriculaires, qui contiennent la plupart des neurones magnocellulaires, ne sont intéressés par l'innervation septale que dans leur périphérie (Fig. 14C-E, 15C-D,16).

Cependant, des arborisations terminales marquées par le F-R et situées en périphérie des noyaux supraoptiques sont au contact des neurones magnocellulaires les plus externes dans le noyau (Fig. 15C).

De la même façon, quelques contacts sont observés entre les terminaisons septales et les neurones magnocellulaires situés dans la partie la plus externe de la portion latérale du noyau paraventriculaire (Fig. 15D).

V - Identification des cellules cibles des projections du SL dans l'aire préoptique et l'hypothalamus chez le rat par l'utilisation du marqueur d'activité neuronale Fos

La protéine Fos est utilisée en tant que marqueur d'activité neuronale pour évaluer, dans l'aire préoptique et l'hypothalamus, l'impact fonctionnel de lésions ou de stimulations du SL.

A - Etude chez le cobaye

Cette étude préliminaire a nécessité 10 cobayes.

L'expérience a été menée avec deux anticorps polyclonaux de source différente. Ces deux anticorps sont dirigés contre la séquence N-terminale 4-17 de la protéine Fos et sont produits chez le lapin (Oncogene Science) ou le mouton (Cambridge Research Biochemical). Ils ne semblent pas adéquats pour détecter un changement d'activité neuronale chez le cobaye. En effet, la détection immunocytochimique de la protéine Fos donne lieu à un marquage très intense mais présent partout, même chez les animaux témoins.

Les autres anticorps commercialisés, spécifiques de Fos plutôt que des protéines qui lui sont associées, sont également dirigés contre la même séquence, et par conséquent nous n'avons pas jugé utile de les tester.

B - Etude chez le rat

80 rats ont été utilisés au cours de cette étude.

La révélation immunocytochimique de la protéine Fos est plus facile à réaliser sur des coupes flottantes de 40 μm que sur des coupes au cryostat de 25 μm récupérées sur lames. Les premières séries expérimentales ont été traitées pour moitié avec l'anticorps de mouton anti-Fos, et pour moitié avec l'anticorps de lapin anti-Fos. L'aspect et la distribution du marquage se sont avérés strictement identiques, bien que l'anticorps de lapin provoque un marquage de fond sensiblement plus important. En conséquence, seul l'anticorps fabriqué chez le mouton a été utilisé dans les études ultérieures.

1 - Aspect du marquage

L'amplification du signal porté par l'anticorps secondaire est indispensable pour faire apparaître un marquage suffisamment intense des neurones immunoréactifs pour la protéine Fos.

Après la révélation par la DAB, les neurones marqués présentent une coloration nucléaire; le nucléole n'est pas marqué (Fig. 27).

L'intensité du marquage varie de brun clair à noir selon le niveau d'expression de la protéine dans le neurone. A l'observation, seuls les corps cellulaires présentant un marquage soutenu brun-noir sont considérés comme positifs.

Divers protocoles expérimentaux ont été suivis :

- ~ Lésions du SL : ~ 5 rats anesthésiés ont subi une lésion chimique
 - ~ 15 rats anesthésiés ont subi une lésion électrolytique
- ~ Stimulations du SL : ~ 10 rats anesthésiés ont subi une stimulation chimique
 - ~ 50 rats ont subi une stimulation électrique,
 - ~ 10 d'entre eux alors qu'ils étaient éveillés
 - ~ 40 d'entre eux alors qu'ils étaient anesthésiés.

Dans chaque série expérimentale, des animaux témoins sont sacrifiés en même temps que les rats lésés ou stimulés.

Ces rats " contrôle " présentent une expression basale de Fos dont il est important de tenir compte lors de l'interprétation des résultats. On peut supposer que la simple manipulation des rats, leur anesthésie et leur trépanation puissent induire une expression de Fos dans diverses régions de l'encéphale. C'est pourquoi plusieurs groupes témoins sont examinés :

a - Rats anesthésiés et perfusés sans délai : expression basale de Fos

Le cerveau antérieur des animaux sacrifiés dès que le niveau d'anesthésie est atteint présentent une très rare immunoréactivité pour Fos.

b - Rats anesthésiés et perfusés après une survie de 2 heures : effet de l'anesthésique

L'anesthésie induit une expression de Fos dans le diencéphale. Elle varie selon la nature de l'anesthésique utilisé (Fig. 19A-H).

** Pentobarbital sodique*

Le pentobarbital est l'anesthésique qui induit l'expression de Fos la plus faible (Fig. 19A-D). Il provoque néanmoins l'apparition de quelques neurones immunoréactifs pour Fos dans l'aire préoptique médiane antérodorsale et antéroventrale (Fig. 19A,C), et dans l'hypothalamus (Fig. 19B,D). En particulier, de rares neurones sont dispersés dans l'hypothalamus médiobasal. Quelques neurones sont visibles dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires, magnocellulaires et parvocellulaires.

** Xylazine associée à la kétamine*

L'utilisation du mélange anesthésique xylazine/kétamine fait apparaître un marquage Fos plus intense et plus fréquent (Fig. 19E-F). Ainsi, l'ensemble de l'aire préoptique médiane contient des neurones immunoréactifs pour Fos, plus nombreux dans sa partie antérodorsale (Fig. 19E).

L'ensemble de l'hypothalamus, en particulier les aires médiobasale, ventrolatérale et périfornicale contiennent des neurones exprimant Fos (Fig. 19F).

Les noyaux supraoptiques et paraventriculaires présentent un marquage Fos intense mais qui concerne un nombre limité de neurones, magnocellulaires ou parvocellulaires.

Les neurones de certains noyaux thalamiques (paraventriculaire et reuniens) produisent également Fos à la suite de cette anesthésie.

** Uréthane*

De tous les anesthésiques testés, l'uréthane est celui qui induit la plus forte expression de Fos (Fig. 19 G-H). L'anesthésie à l'uréthane est associée à une augmentation du nombre de neurones marqués dans les îlots de Calleja, le SL, le noyau du lit de la strie terminale, l'aire préoptique (Fig. 19G), l'ensemble de l'hypothalamus -antérieur, médian, périventriculaire et postérieur- (Fig. 19H). Elle induit un marquage important dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires, parvocellulaires et magnocellulaires, le cortex, ainsi que les noyaux reuniens et paraventriculaire thalamiques.

Figure 19 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats témoins. Détection de la protéine Fos.

Dans chaque série expérimentale, des animaux témoins (non stimulés dans le SL) sont sacrifiés en même temps que les rats lésés ou stimulés, pour observer l'expression basale de Fos consécutive à la descente d'une électrode d'une part, et à l'anesthésie d'autre part, après deux heures de survie.

L'anesthésique induit une expression de Fos dans le diencephale, qui varie selon l'anesthésique utilisé.

La descente de l'électrode dans le SL n'induit pas de marquage Fos dans l'aire préoptique (C) ou l'hypothalamus (D). Les microphotographies A-B et C-D illustrent cette absence de modification de l'expression de Fos à la suite de la descente d'une électrode dans le SLml chez deux rats anesthésiés au pentobarbital sodique (PENTO), respectivement intact (n-i, A-B) et expérimenté (i, C-D). Ce résultat est identique quel que soit l'anesthésique utilisé.

Sous anesthésie au pentobarbital sodique (PENTO) seuls quelques neurones marqués sont observés dans l'aire préoptique médiane (APM) antéro dorsale (flèche) et ventrale (A, C) d'une part, et dans l'hypothalamus médian d'autre part (B, D). Le noyau paraventriculaire (NPV) parvocellulaire contient de rares neurones faiblement immunoréactifs pour Fos (flèche, B, D).

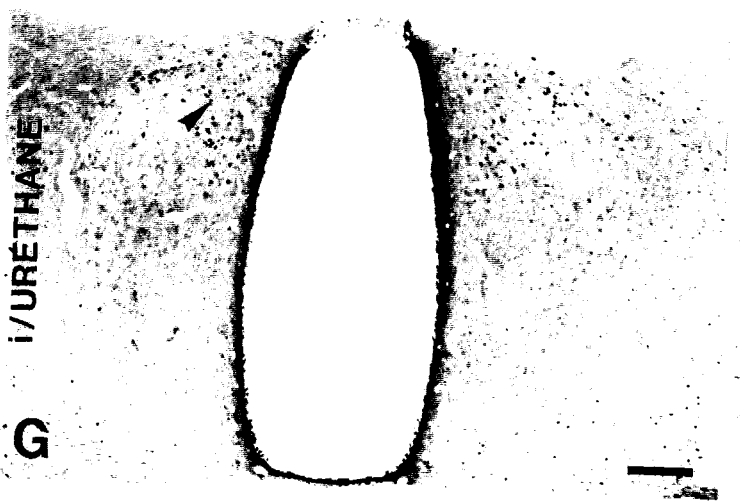
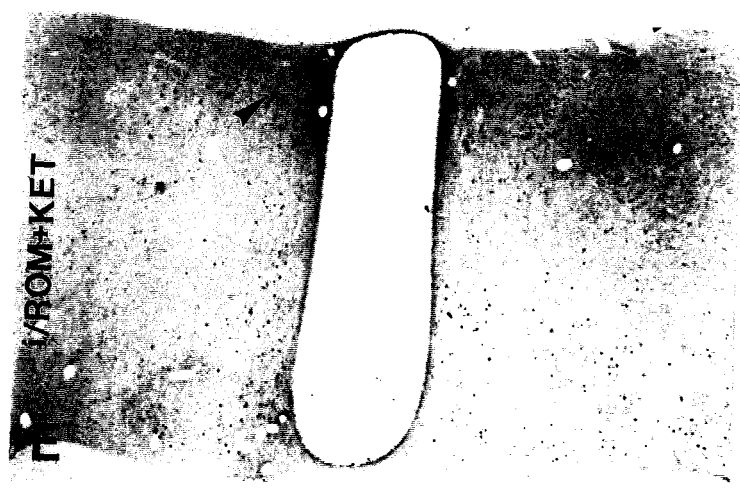
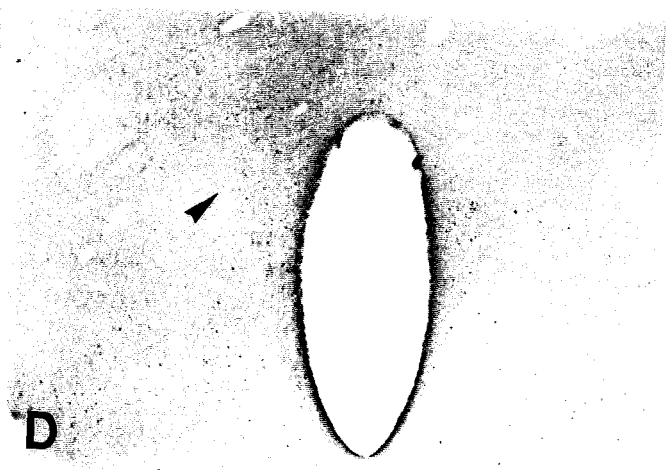
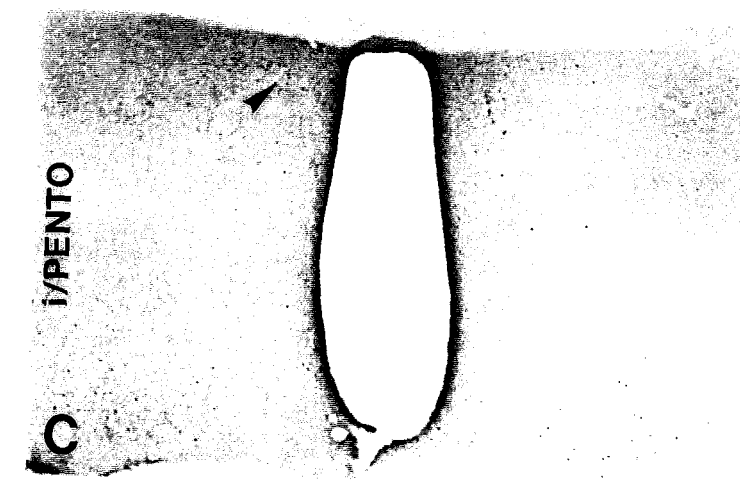
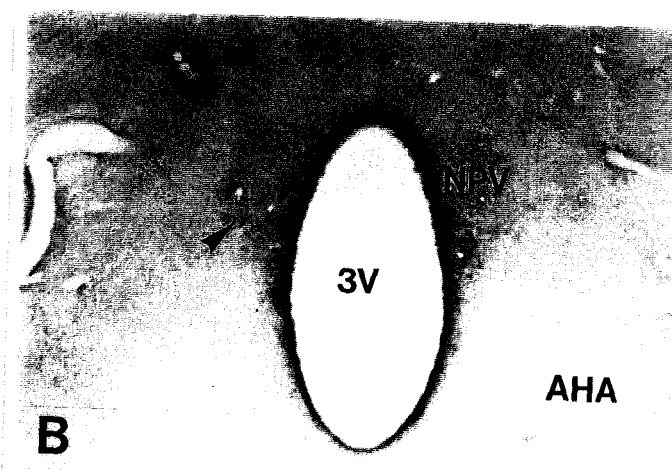
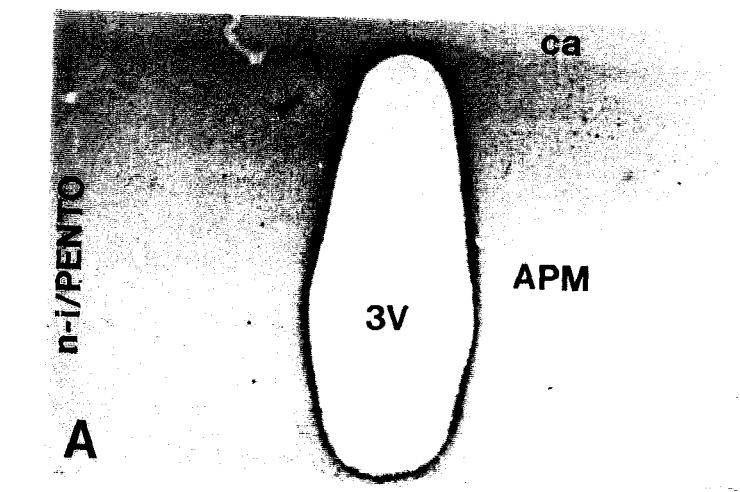
Le mélange anesthésique xylazine + kétamine (ROM+KET) induit une expression de Fos plus marquée (E-F), et dans un plus grand nombre de neurones; leur distribution est globalement comparable à celle induite par l'anesthésie au pentobarbital sodique (A-D).

L'uréthane (URETHANE) est l'anesthésique qui induit la plus forte expression de Fos. La protéine est exprimée notamment dans l'aire préoptique médiane antéro dorsale (flèche) et ventrale, ainsi que dans l'hypothalamus médian. Particulièrement importante dans le noyau paraventriculaire magnocellulaire (flèche, H), cette expression peut masquer un effet possible de l'expérimentation.

n-i : animal simplement anesthésié

i : animal anesthésié ayant subi la descente d'une électrode dans le SLml, sans être stimulé.

Barres de calibration : 100 μ m en G pour A, C, E, G
60 μ m en H pour B, D, F, H



Les expériences décrites ci-après chez le rat endormi ont fait appel le plus souvent au mélange xylazine/kétamine; lorsqu'il est différent, l'anesthésique est spécifié.

c - Rats anesthésiés, implantés et perfusés après une survie de 2 heures : effets combinés de l'anesthésique et de l'intervention stéréotaxique

La descente de la canule servant à l'application des produits pour la lésion ou la stimulation chimique, l'implantation d'une électrode pour la stimulation électrique chez l'animal éveillé ou la descente d'une électrode dans le SL (ces expériences étant menées par stéréotaxie) provoquent uniquement, quel que soit l'anesthésique choisi, une expression de Fos dans le cortex pariétal homolatéral.

Le marquage de base dépend strictement de l'anesthésique utilisé mais pas de l'expérimentation. A titre d'exemple, il est utile de comparer les Fig. 19A-B et 19C-D qui présentent l'effet du pentobarbital sodique, respectivement chez un animal anesthésié, et chez un animal qui a été anesthésié et a subi la descente d'une électrode, tous deux perfusés après 2 heures).

Il faut souligner que des animaux traités de façon strictement identique présentent une variation d'intensité du marquage Fos et une variation du nombre de neurones marqués, même si la distribution de ces derniers reste constante. Dans nos expériences, il a donc été choisi, plutôt que de comparer un animal témoin à un animal stimulé, et dans la mesure où la projection du SL est presque exclusivement homolatérale, de comparer le marquage homolatéral au marquage controlatéral chez un même animal.

2- Description du marquage Fos observé après lésion électrolytique du SL

La lésion électrolytique du SL, réalisée par stéréotaxie sur 15 rats anesthésiés provoque la destruction partielle du tissu. Le contrôle des paramètres utilisés (3 mA, 10 sec) permettent d'en restreindre la taille au SL proprement dit. Autour de la zone nécrosée, un abondant marquage Fos est observé. Les épendymocytes bordant le ventricule latéral sont également immunoréactifs (Fig. 20A).

Par contre, toutes les autres régions, de l'aire préoptique à la région prémamillaire, montrent une distribution de la protéine Fos identique du côté homolatéral et controlatéral à la lésion (Fig. 20B-C).

De surcroît, elle est peu dense et correspond au marquage inhérent à l'anesthésie (Fig. 19E-F).

Figure 20 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats ayant subi une lésion, ou une stimulation chimique du SL. Détection de la protéine Fos.

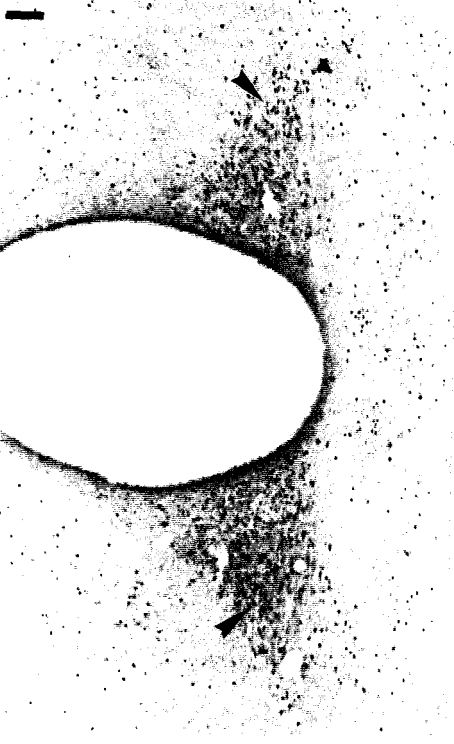
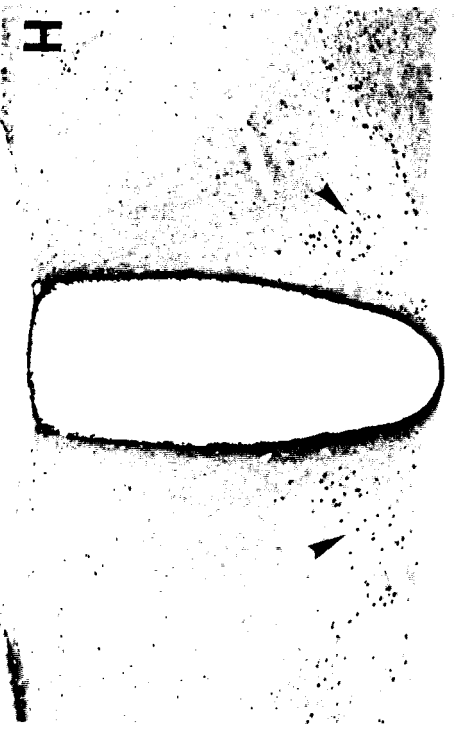
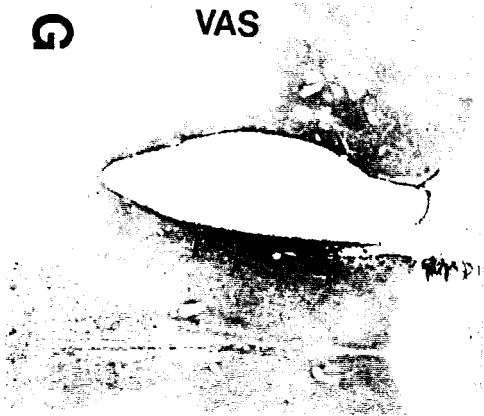
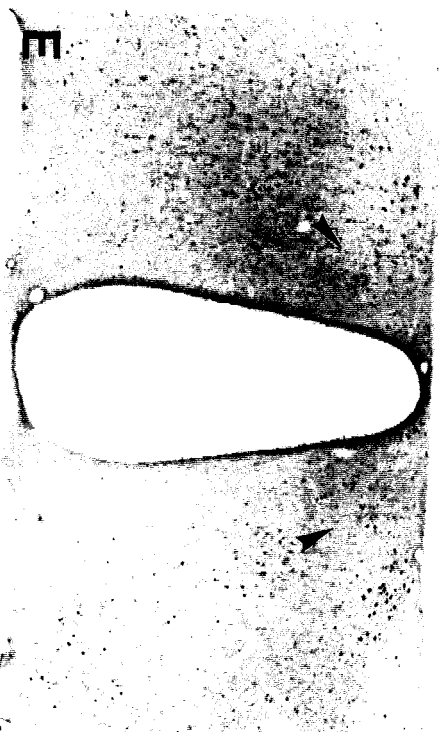
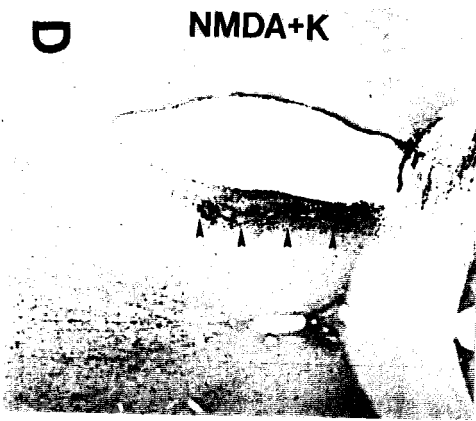
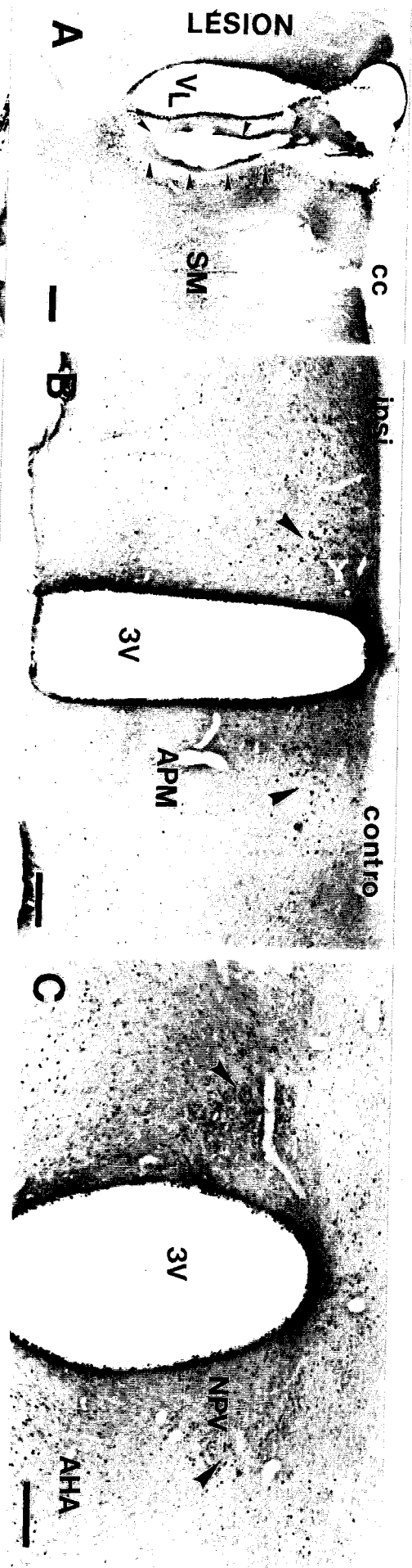
Les coupes de cerveau proviennent de rats anesthésiés avec le mélange xylazine + kétamine.

En raison de l'ipsilatéralité de la projection septale, le marquage observé du côté controlatéral à la stimulation fait office de marquage témoin. Ce dernier est retrouvé essentiellement dans l'aire préoptique médiane antérodorsale (pointes de flèches, B, E, H) et antéroventrale (B, E, H), le noyau paraventriculaire (NPV, pointes de flèches, C, F, I) et l'aire hypothalamique antérieure (AHA, C, F, I).

A-C : La lésion électrolytique du SL (LESION) provoque une nécrose importante du tissu (pointes de flèches). La région lésée est entourée d'une couronne de neurones exprimant Fos (A). Aucune modification de l'immunoréactivité pour Fos n'est visible dans l'aire préoptique médiane (APM) (B), ni dans l'hypothalamus médian (C), en particulier dans le noyau paraventriculaire (NPV) et l'aire hypothalamique antérieure (AHA), que l'on considère le côté ipsilatéral (ipsi) ou le côté controlatéral (contro) à la stimulation.

D-F, G-I : La stimulation chimique du SL par injection d'une solution de NMDA + Kainate 10^{-6} M (NMDA + K, D-F) ou de vasopressine (VAS, G-I) 10^{-6} M n'induit aucune variation de l'expression de Fos dans l'aire préoptique (E, H) ni dans l'hypothalamus médian (F, I). L'injection provoque uniquement une expression de Fos le long du trajet de l'électrode (petites pointes de flèches, D, G).

Barres de calibration : 100 μ m en A pour A, D, G
100 μ m en B pour B, E, H
250 μ m en C pour C, F, I



Il peut être conclu que la lésion électrolytique du SL ne provoque aucune variation de l'expression de la protéine Fos dans les régions préoptiques et hypothalamiques chez le rat.

3 - Description du marquage Fos observé après stimulation du SL

Deux types de stimulations ont été appliquées : d'une part, des stimulations chimiques, consistant en l'injection par pression ou par iontophorèse de substances neuroactives dans le SL (Fig. 20 D-I); d'autre part, des stimulations électriques qui ont été obtenues par passage d'un courant électrique dans le SL d'animaux anesthésiés ou éveillés (Fig. 21-26).

a - Description du marquage Fos observé après stimulation chimique du SL

Les substances neuroactives choisies pour stimuler les neurones du SL sont, soit un mélange NMDA + acide kainique (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} M : Fig. 20D-F), soit une solution de glutamate (1 M) ou de vasopressine (10^{-6} M : Fig. 20G-I). Cette dernière est également injectée par iontophorèse.

L'application des substances est réalisée par stéréotaxie sur l'animal anesthésié.

L'application de ces solutions induit le même marquage Fos (Fig. 20D-F, G-I). Précisément, des neurones immunoréactifs sont observés le long du trajet de l'électrode, dans le SL, sans qu'ils soient plus nombreux à son extrémité (Fig. 20D,G). L'aire préoptique et l'hypothalamus présentent un marquage Fos symétrique, identique à celui induit par l'anesthésie chez l'animal témoin (Fig. 20E-F,H-I, Fig. 19E-F). La partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire est peu marquée (Fig. 20F,I).

b - Description du marquage Fos observé après stimulation électrique du SL

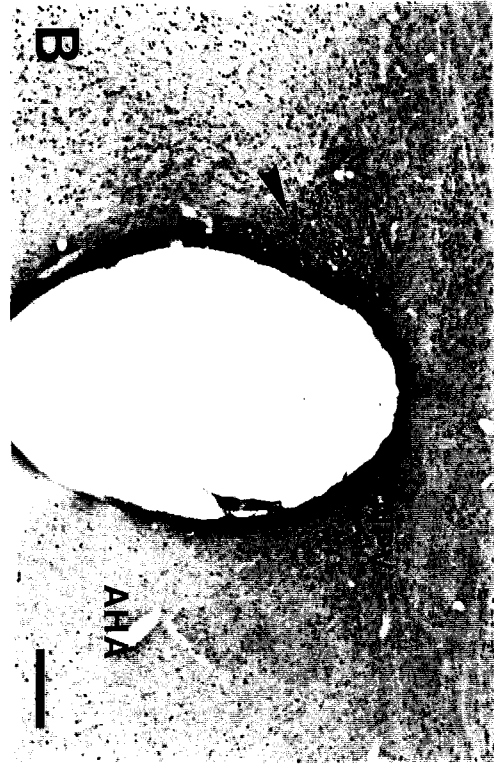
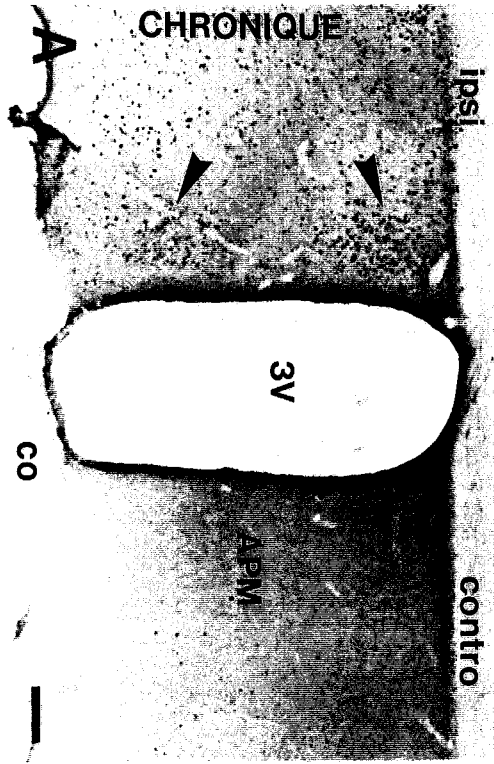
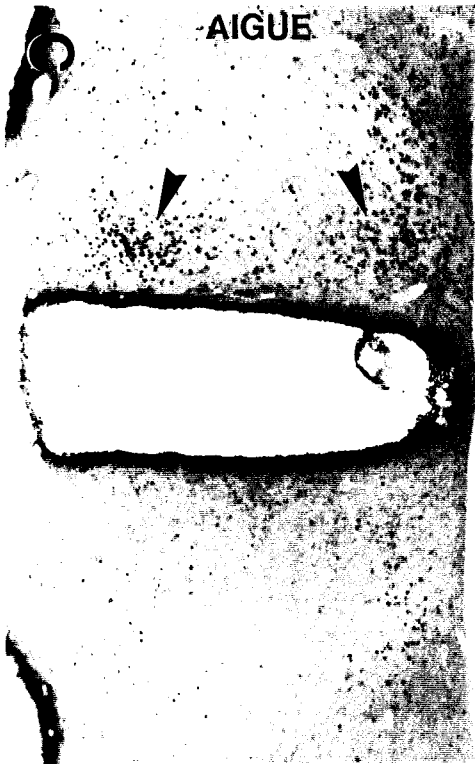
Les stimulations électriques ont été réalisées sur des rats anesthésiés (Fig. 21C-D, 22-26) ou sur des rats éveillés (Fig. 21A-B). Pour ces derniers, l'électrode de stimulation est implantée par stéréotaxie une semaine avant la stimulation. Ils sont quotidiennement manipulés pour réduire le stress le jour de la stimulation.

Figure 21 : Microphotographies de coupes frontales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rats ayant subi une stimulation électrique du SL. Détection de la protéine Fos.

En raison de l'ipsilatéralité de la projection septale, le marquage observé du côté controlatéral à la stimulation fait office de marquage témoin.

Les rats stimulés quand ils sont éveillés (CHRONIQUE, A-B) ou sous anesthésie (AIGUE, C-D) présentent un marquage Fos équivalent. Ainsi, dans les deux cas, l'aire préoptique médiane (APM) antérodorsale (pointes de flèches) et l'aire antéroventrale périventriculaire (pointes de flèches) présentent une augmentation significative du nombre de neurones exprimant Fos du côté ipsilatéral (A,C). Dans l'hypothalamus médian, l'aire hypothalamique antérieure (AHA) -plus particulièrement la région subparaventriculaire-, ainsi que le noyau paraventriculaire (NPV) parvocellulaire (pointes de flèches) et la périphérie dorsale du noyau paraventriculaire présentent une forte augmentation ipsilatérale de l'expression de Fos dans les neurones (B,D).

Barres de calibration : 100 μm en A pour A et C
250 μm en B pour B et D



Le nombre d'animaux utilisés dans les différents cas de figure est récapitulé ci-après :

~ 10 rats étaient éveillés

~ 40 rats étaient anesthésiés : ~ 20 d'entre eux à la xylazine/kétamine

~ 10 d'entre eux à l'uréthane

~ 10 d'entre eux au pentobarbital sodique.

α - Aspect du site

Le site de stimulation ressemble au site observé suite à une lésion du SL (Fig. 23B). En effet, une nécrose du tissu est visible au centre du site, quelle que soit l'intensité de stimulation appliquée. Cependant, son diamètre augmente avec l'intensité de stimulation. Autour de cette zone, une épaisse couronne de neurones fortement immunoréactifs pour Fos est visible.

En raison de la taille des électrodes utilisées, il est difficile de restreindre la stimulation à une sous-région du SL. Cependant, on peut regrouper d'une part les sites centrés dans le SLml/v et d'autre part les sites plus dorsaux, qui englobent également le SLd; ces derniers sont peu nombreux.

β - Distribution de la protéine Fos dans l'aire préoptique et l'hypothalamus

Il apparaît dans tous les cas qu'une stimulation électrique d'intensité inférieure à 150 μ A n'est pas efficace. Elle n'induit pas de modification visible de l'expression de Fos dans les régions étudiées par rapport à celle relevée chez un animal témoin.

Au contraire, les stimulations dont l'intensité est comprise entre 180 et 400 μ A déclenchent une expression homolatérale spectaculaire de la protéine Fos (Fig. 21-27).

β 1 - Distribution de la protéine Fos chez le rat anesthésié

La distribution du marquage est identique d'un animal à l'autre pour cette série expérimentale. La répartition du marquage Fos dans l'ensemble de l'hypothalamus induit par la stimulation septale sur un rat anesthésié (uréthane) est reportée Fig. 22A-G. D'autres figures, illustrant le marquage observé sur des rats endormis avec d'autres anesthésiques ou des rats éveillés, permettent de compléter les données fournies (Fig. 23, 24, 25, 26).

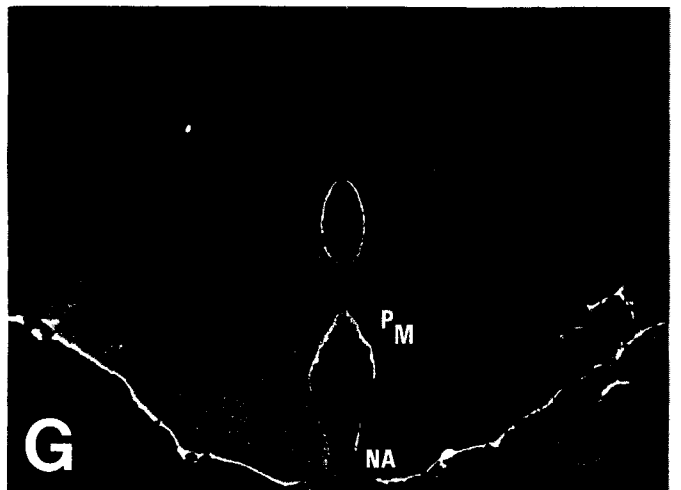
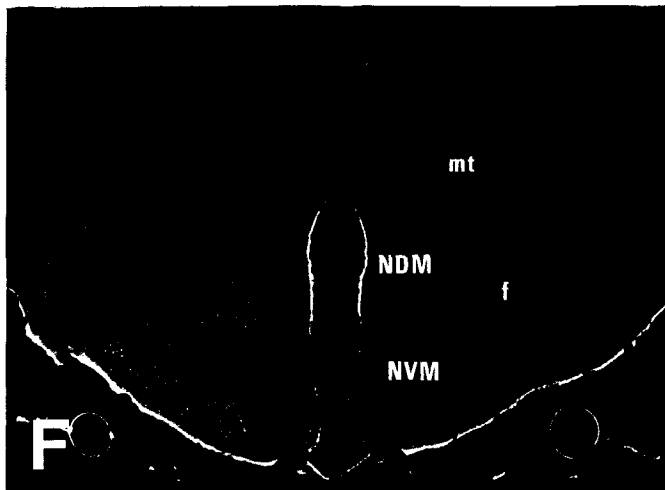
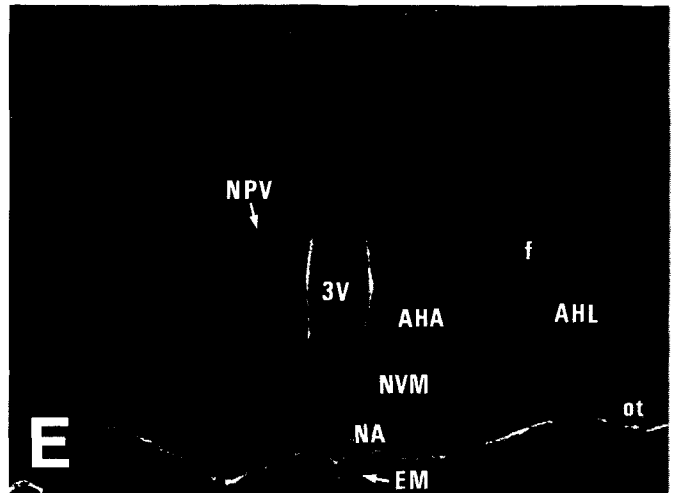
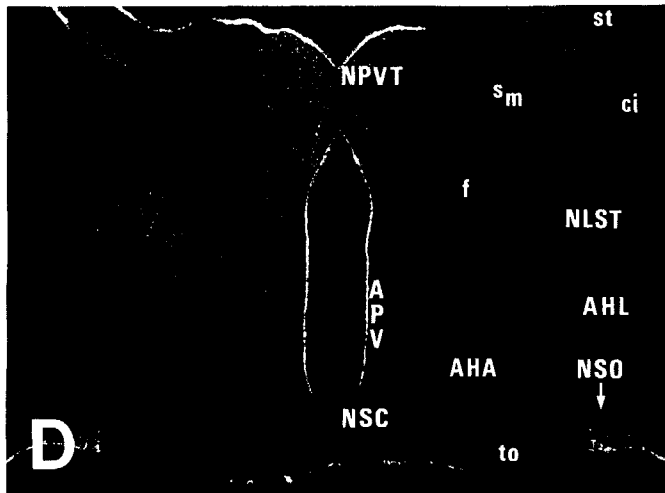
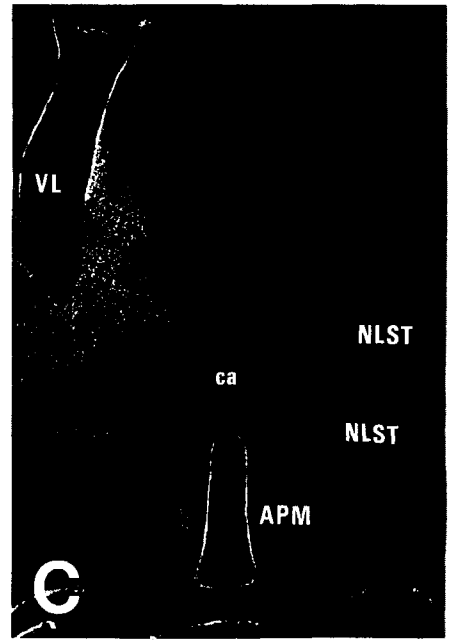
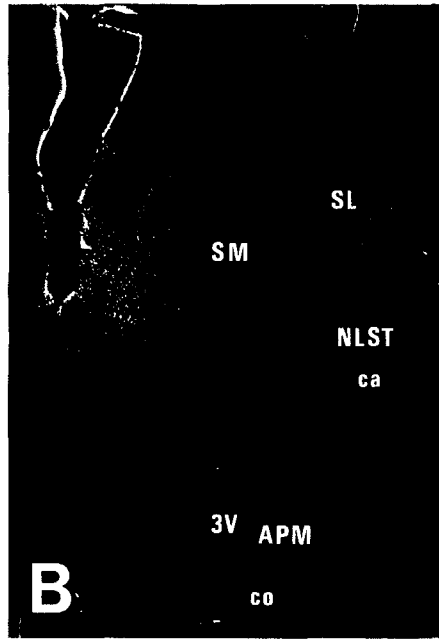
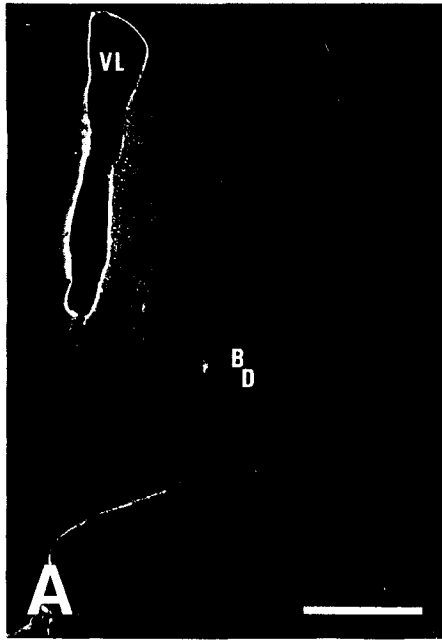
Figure 22 : Microphotographies de coupes frontales du septum, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus médian de rat ayant subi une stimulation électrique du SL. Détection de la protéine Fos.

Les coupes, qui ont subi une révélation à la DAB, ont été directement projetées sur le papier photographique, ce qui conduit à une image en négatif.

En raison de l'ipsilatéralité de la projection septale, le marquage observé du côté controlatéral à la stimulation fait office de marquage témoin (Animal anesthésié à l'uréthane).

La stimulation électrique, centrée dans le striatum, induit le marquage de très nombreux neurones du SLml/v (B-C). Le noyau du lit de la strie terminale (NLST) antérieur (B-C) et postérieur (D), l'aire antéroventrale périventriculaire et l'aire préoptique médiane (APM) contiennent de nombreux neurones marqués (B-C). L'aire préoptique latérale présente également une augmentation modérée de l'expression de Fos (B-C). L'aire hypothalamique antérieure (AHA), l'aire hypothalamique périventriculaire (APV), la région périfornicale et le noyau paraventriculaire thalamique (NPVT) contiennent de nombreux neurones immunoréactifs pour Fos (D). Dans l'hypothalamus médian (E), une augmentation du marquage Fos est observée dans le noyau paraventriculaire (NPV), la région subparaventriculaire, l'aire hypothalamique latérale (AHL) le noyau arqué (NA) dorsal (E-F) et postérieur (G). Le noyau ventromédian (NVM) antérieur est peu marqué mais ce marquage s'accroît de façon spectaculaire dans sa portion postérieure (F). Dans la mesure où la projection septale dans la région prémamillaire (G) est sensiblement bilatérale, il est plus difficile de conclure dans ce cas, à une expression spécifique de la protéine dans cette région.

Barre de calibration : 500 μ m en A pour A-G



Il faut considérer le marquage controlatéral à l'injection comme correspondant au marquage non spécifique induit par l'anesthésie.

En retranchant ce marquage de celui observé du côté de la stimulation, il est possible de déterminer la topographie et la densité de marquage Fos spécifique dû à la stimulation.

Ainsi, la stimulation électrique du SL induit l'expression de la protéine Fos dans le SL, le noyau du lit de la strie terminale et l'aire antéroventrale périventriculaire (Fig. 22A-C, 23B,D).

L'aire préoptique médiane antéroventrale et antérodorsale, et l'aire préoptique latérale montrent également une augmentation modérée du nombre de neurones immunoréactifs pour la protéine Fos (Fig. 21A-C, 22B-C, 23D, 24B).

Il en est de même dans l'aire hypothalamique antérieure, dont l'aspect ventromédian contient un nombre plus élevé de neurones marqués. De nombreux neurones du noyau préoptique médian expriment également Fos en réponse à la stimulation (Fig. 22D, 24B,D). Le noyau suprachiasmatique n'est pas marqué (Fig. 22D, 23D, 24B). L'aire périventriculaire, en particulier dans l'hypothalamus postérieur, présente un marquage Fos spécifique (Fig. 22D-F, 24D, 25B,D, 26B).

L'induction homolatérale de Fos est également observée dans l'hypothalamus médian : dans l'aire périfornicale, la région subparaventriculaire et l'hypothalamus latéral (Fig. 22E, 25B,D).

En raison de l'importante expression basale de Fos dans le noyau paraventriculaire provoquée par l'uréthane (Fig. 19H), il est difficile de conclure ici à une expression spécifique de Fos dans ce noyau (Fig. 22E). Cependant, d'autres clichés permettent d'affirmer que l'expression de Fos est spécifiquement induite dans le noyau paraventriculaire parvocellulaire (Fig. 21B,D, 25D).

Le noyau ventromédian montre, dans son ensemble, une expression spécifique de la protéine Fos, particulièrement prononcée dans sa périphérie dorsomédiane et ventrolatérale (Fig. 22F, 25D, 26B).

Dans le noyau arqué, de nombreux neurones expriment Fos en réponse à la stimulation du SL (Fig. 22E-G, 25D, 26B,D) dans ses parties dorsale, latérale et postérieure.

β2 - Comparaison des animaux stimulés endormis ou vigiles

La stimulation électrique réalisée sur l'animal éveillé permet d'éliminer à la fois l'influence du stress et celle de l'anesthésique.

Figure 23 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Septum et aire préoptique.

L'animal choisi pour illustrer le marquage Fos induit par une stimulation électrique du SL a été anesthésié au pentobarbital sodique (B, D).

A-B : L'expression de Fos suit le trajet des fibres issues du site (flèches) jusque dans l'aire préoptique médiane (APM) antéroventrale (flèche). Le noyau du lit de la strie terminale et l'aire antéroventrale périventriculaire contiennent de nombreux neurones marqués, mais ne sont pas la cible des projections septales.

C-D : Les neurones exprimant Fos sont présents dans les zones de projection massive du SL, telles que l'aire préoptique médiane antérodorsale et antéroventrale (flèches). Au contraire, l'aire antéroventrale périventriculaire est fortement immunoréactive pour Fos (pointes de flèches) alors qu'elle reçoit peu de terminaisons septales.

Barre de calibration : 100 μ m en A pour A-D

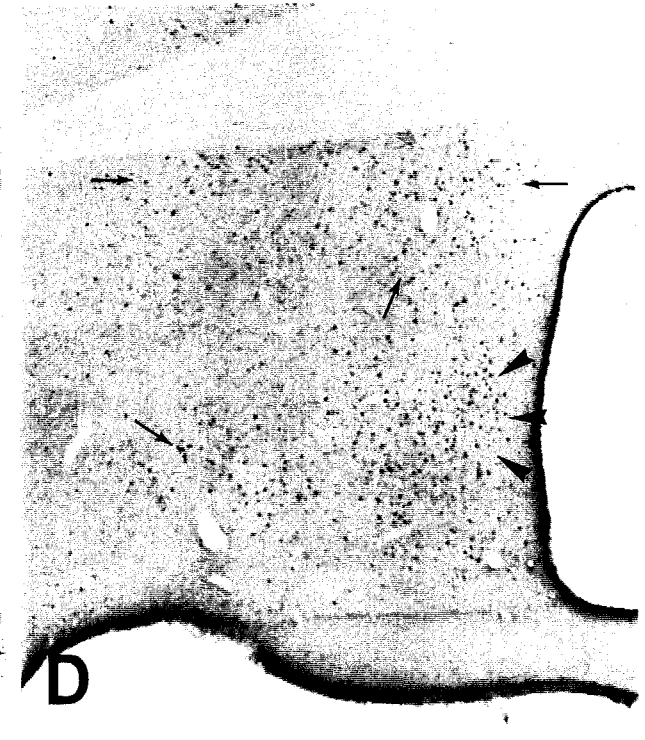
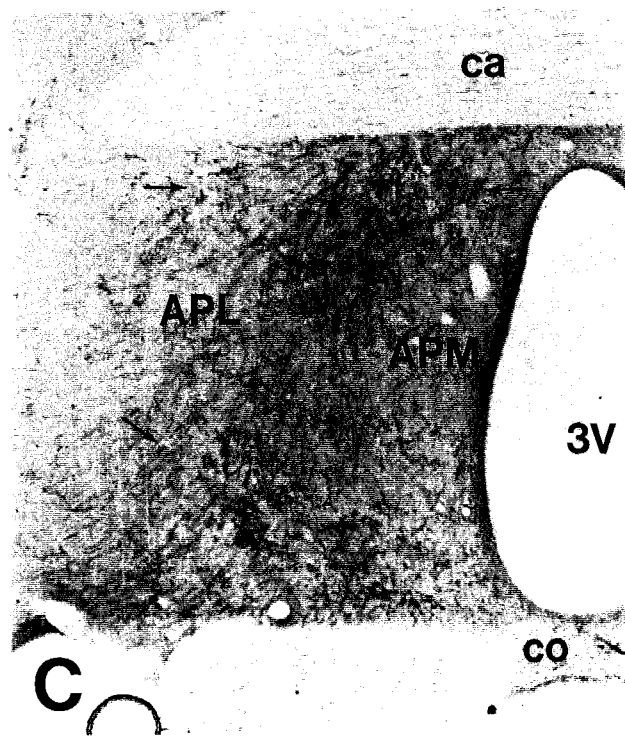
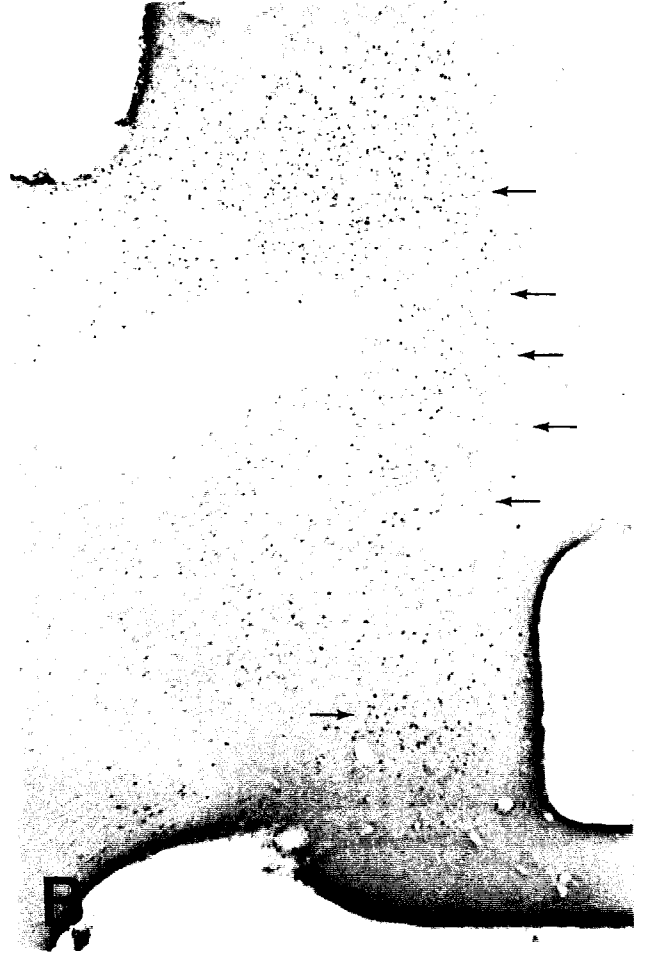
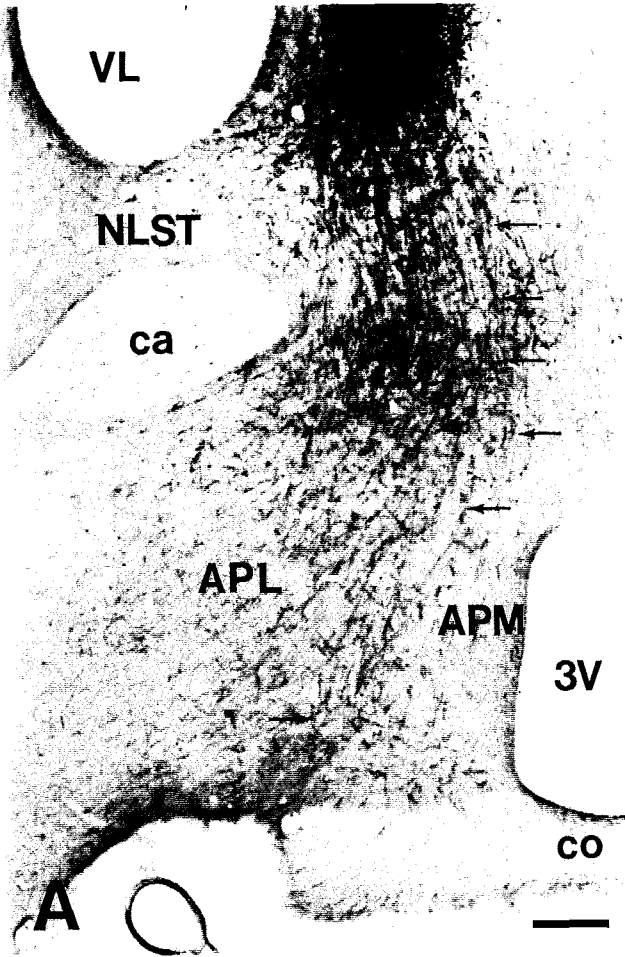


Figure 24 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Aire préoptique et hypothalamus antérieur.

L'animal choisi pour illustrer le marquage Fos induit par une stimulation électrique du SL a été anesthésié au pentobarbital sodique (B, D).

A-B : Comme dans les plans plus antérieurs, il existe une étroite corrélation entre la distribution des plexus de terminaisons septales et le marquage Fos dans l'aire préoptique médiane (APM) antérodorsale et antéromédiane (flèches). De même, le noyau du lit de la strie terminale (NLST) est riche en fibres septales et en neurones marqués dans sa portion postérieure (flèches). Le noyau suprachiasmatique (NSC) ne contient ni l'une, ni l'autre des populations d'éléments considérés, tandis que sa périphérie dorsolatérale constitue une importante aire de projection septale (pointes de flèches) et ne présente pas de neurones marqués; il en est de même pour la région immédiatement dorsale au tractus optique, considérée comme une voie de passage de fibres.

C-D : la partie postérieure du noyau du lit de la strie terminale (NLST), l'aire périfornicale et le noyau préoptique médian (NPM) dorsal contiennent de nombreuses fibres septales et des neurones exprimant Fos. Les longues fibres descendantes qui parcourent le noyau paraventriculaire thalamique (NPVT) sont corrélées à un faible marquage Fos. L'aire hypothalamique périventriculaire, peu innervée par le SL, est immunoréactive pour Fos. L'aire hypothalamique antérieure, riche en efférences septales, présente un marquage Fos modéré (pointes de flèches). Aux fibres de passage présentes au-dessus du tractus optique n'est associé aucun marquage Fos.

Barre de calibration : 100 μm en A pour A-D

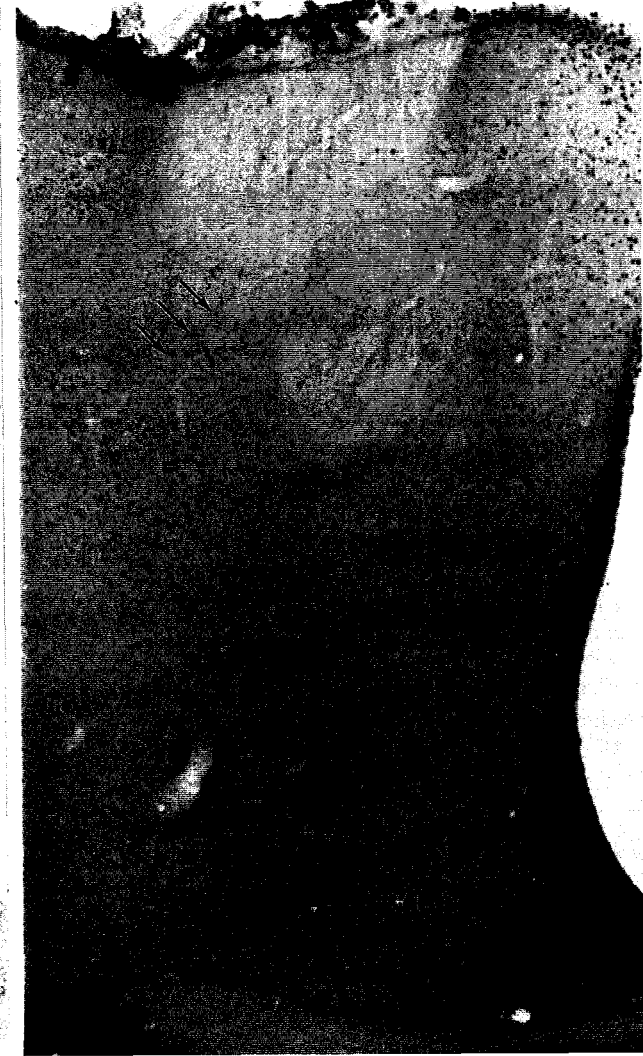
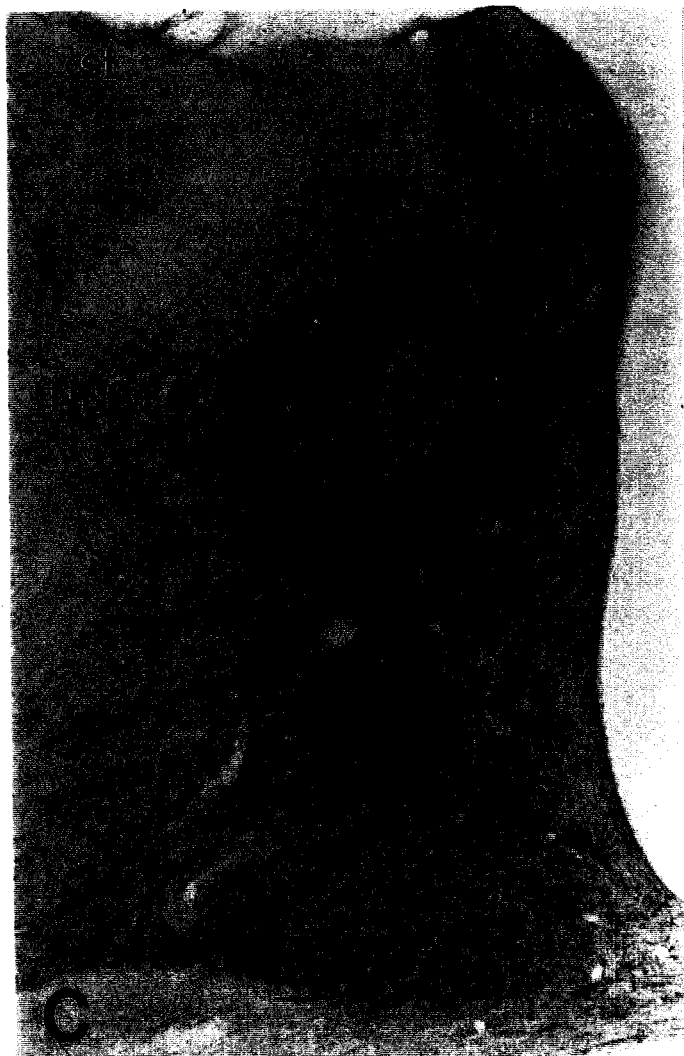
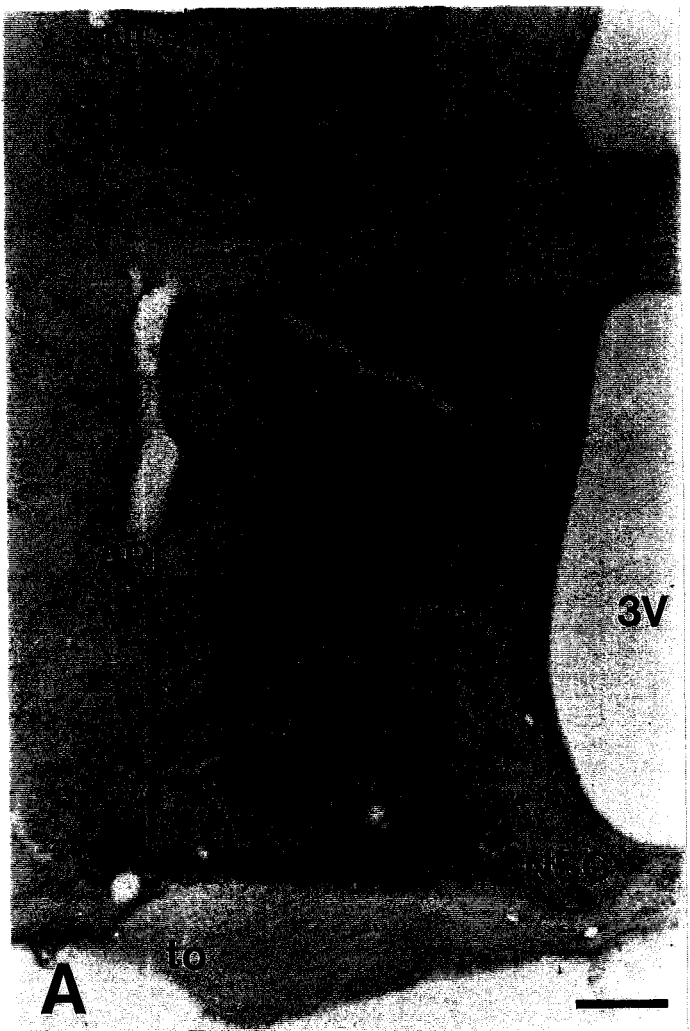


Figure 25 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Hypothalamus antérieur et médian.

L'animal choisi pour illustrer le marquage Fos induit par une stimulation électrique du SL a été anesthésié au pentobarbital sodique (**B, D**).

A-B : Comme dans les plans plus antérieurs, le fornix (f) est entouré dorsalement par des fibres septales qui, comme dans la région ventrale au fornix (aire hypothalamique latérale), sont associées à une expression importante de la protéine Fos (flèches). De denses plexus de terminaisons septales sont observés dans l'aire hypothalamique antérieure (AHA), qui présente un marquage Fos modéré à fort. Au contraire, l'aire hypothalamique périventriculaire et le noyau paraventriculaire antérieur (NPVa), peu innervés par les efférences septales, contiennent de nombreux neurones marqués.

C-D : L'hypothalamus médian montre une forte innervation septale, essentiellement organisée dans la périphérie des noyaux paraventriculaire (NPV), ventromédian (NVM) et arqué (NA), mais également dans l'aire hypothalamique latérale (AHL). Contrairement à la périphérie dorsale du noyau paraventriculaire, qui n'est pas immunoréactive pour Fos (pointes de flèches), la région subparaventriculaire et l'aire séparant les noyaux ventromédian et arqué sont riches en neurones exprimant Fos (flèches). Il existe une bonne corrélation entre l'innervation septale de l'aire hypothalamique antérieure et le marquage Fos que l'on y observe. Il est important de souligner que la partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire, l'aire hypothalamique périventriculaire, la partie dorsale du noyau arqué et le noyau ventromédian contiennent des neurones immunoréactifs pour Fos alors qu'ils reçoivent une projection septale ténue.

Barre de calibration : 100 μ m en D pour A-D

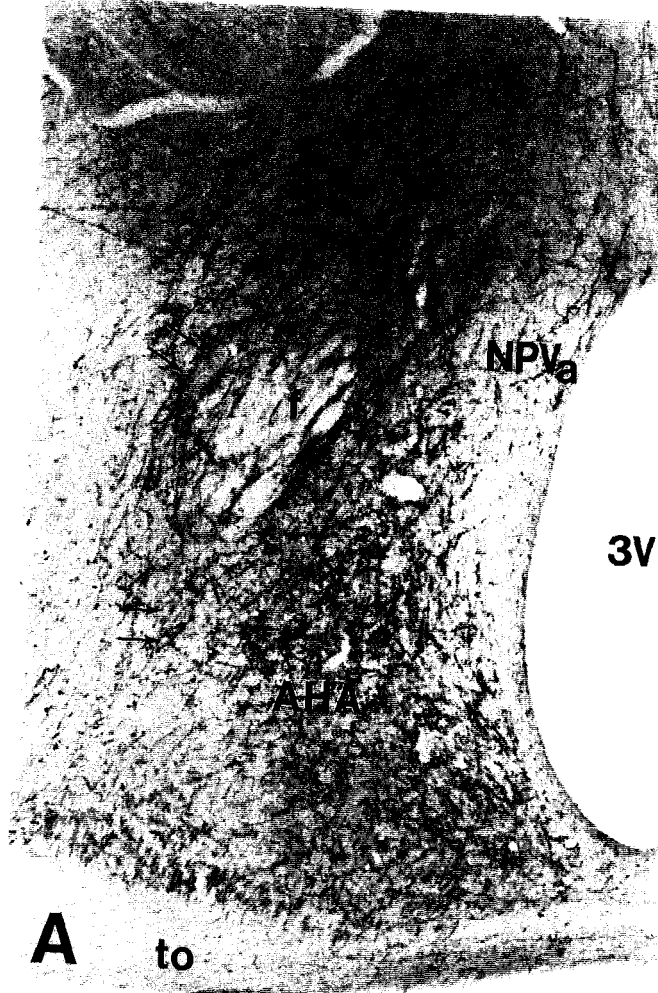


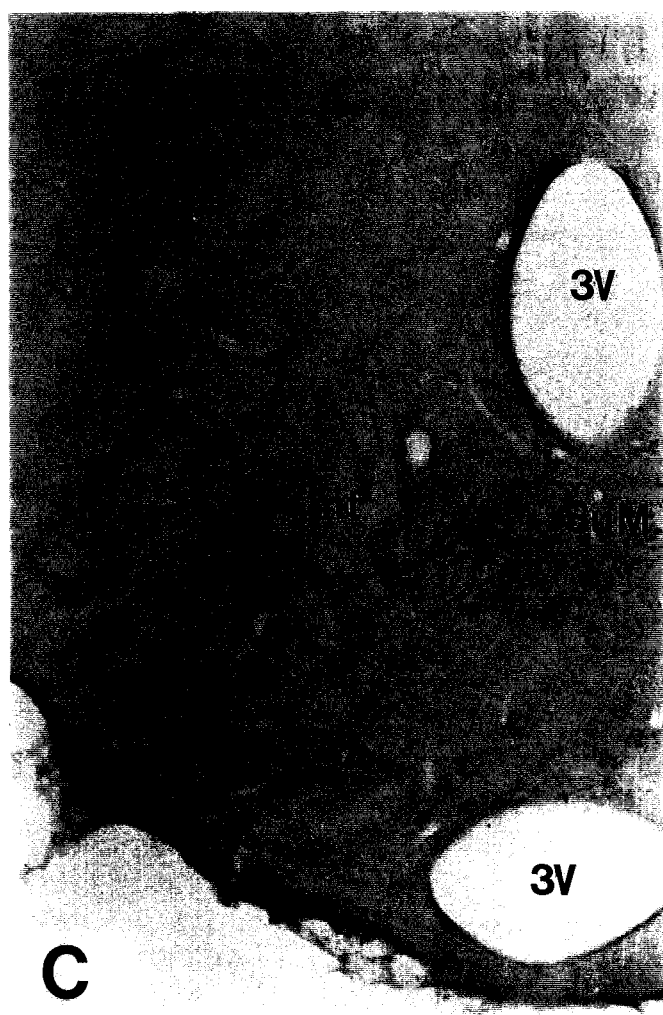
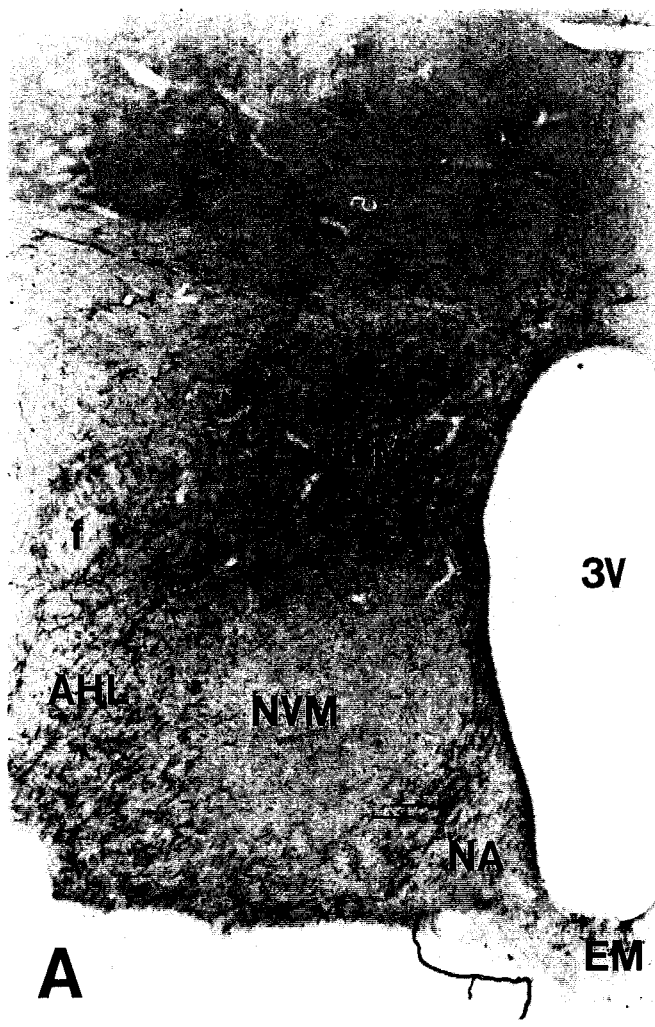
Figure 26 : Comparaison de la distribution, sur des coupes frontales d'animaux différents, des efférences septales et des neurones immunoréactifs pour Fos après stimulation du SL. Hypothalamus postérieur.

L'animal choisi pour illustrer le marquage Fos induit par une stimulation électrique du SL a été anesthésié au pentobarbital sodique (B, D).

A-B : Le noyau ventromédian (NVM), bordé mais non envahi par les efférences septales, présente une immunoréactivité Fos spectaculaire, dans ses portions ventrolatérale, médiane et dorsale (pointes de flèches). Il en est de même pour la partie dorsale du noyau arqué (NA). Le noyau dorsomédian (NDM), l'aire hypothalamique latérale (AHL) et la périphérie du noyau arqué sont densément innervés par les fibres septales et contiennent de nombreux neurones immunoréactifs pour Fos (flèches).

C-D : Dans le plan prémamillaire, le noyau arqué caudal contient des neurones marqués. Quelques fibres septales sont retrouvées dans sa périphérie, également immunoréactive pour Fos (flèche). De même, la région supramamillaire (SuM) est la cible directe du SL et contient de nombreux neurones exprimant Fos (flèches).

Barre de calibration : 100 μ m en D pour A-D



Des plans comparables -passant par l'aire préoptique et l'hypothalamus médian-, photographiés chez des rats stimulés l'un sous anesthésie (Fig. 21C-D), l'autre quand il est éveillé (Fig. 21A-B), illustrent la très bonne corrélation du marquage induit dans chaque cas. Ainsi, l'aire antéroventrale périventriculaire et l'aire préoptique médiane antérodorsale d'une part (Fig. 21A,C), la région subparaventriculaire et le noyau paraventriculaire parvocellulaire d'autre part (Fig. 21B,D), montrent une augmentation homolatérale importante de l'expression de Fos.

En résumé, il apparaît que les résultats des expérimentations sur des rats éveillés, techniquement plus contraignantes, sont comparables à ceux obtenus chez l'animal anesthésié et que les influences de l'anesthésique et de la stéréotaxie n'entachent pas l'interprétation des résultats de la stimulation.

β3 - variation du marquage Fos en fonction du site de stimulation

L'emplacement du site induit quelques variations du marquage : une stimulation de l'ensemble du SL, en particulier de sa partie dorsale, induit un marquage Fos bilatéral dans l'hippocampe, qui est absent lorsque la stimulation est plus ventrale.

En revanche, une stimulation centrée dans le striatum proche du ventricule latéral provoque une très forte immunoréactivité Fos dans les neurones du SLml/v voisin (Fig. 22B-C). Cette stimulation induit dans l'aire préoptique et l'hypothalamus un marquage Fos strictement identique à celui que l'on observe lors d'une stimulation centrée dans le SLml/v (Fig. 23B). Dans la mesure où le striatum ne se projette ni dans l'aire préoptique, ni dans l'hypothalamus, cette stimulation peut être considérée comme spécifique d'une stimulation septale. Il faut souligner qu'elle présente l'avantage d'éviter la nécrose du SLml.

VI - Comparaison de la distribution des efférences septales à celle de la protéine Fos induite par une stimulation électrique

La topographie des efférences septales est comparée à celle des aires présentant un marquage Fos après une stimulation électrique du SL.

A - Comparaison sur des groupes d'animaux différents

L'examen de coupes provenant d'animaux différents et représentatifs, les uns ayant reçu une injection iontophorétique de dextran biotinylé dans le SLml/v (Fig. 23A,C, 24A,C,

25A,C, 26A,C), les autres ayant subi une stimulation électrique de la même région (Fig. 23B,D, 24B,D, 25B,D, 26B,D), amène la conclusion suivante : la distribution des neurones activés par la stimulation n'est pas strictement superposable à celle des projections septales.

Ces observations sont reportées dans le tableau N°3 :

Tableau N°3 : Tableau récapitulatif présentant la distribution comparée des aires diencéphaliques contenant l'innervation septale et/ou des neurones activés après stimulation septale.

| Région étudiée | Fibres | Fos | Région étudiée | Fibres | Fos |
|-----------------|---------|---------|----------------------|---------|---------|
| AHA | ++ | ++ | NPM antérieur | + | +++ |
| AHL | + / +++ | + / +++ | NPM postérieur | +++ | +++ |
| AHP | + | + | NPVm | 0 / + | 0 |
| APL | ++ | + | NPVp | 0 / + | + |
| APMad | +++ | +++ | NSC | 0 | 0 |
| APMav | +++ | +++ | NSO | 0 / + | 0 |
| APV médiane | 0 | +++ | NVM | 0 / + | +++ |
| APV postérieure | + | +++ | MM | + | 0 |
| AVPV | 0 / + | +++ | PM | ++ | ++ |
| NA | + | +++ | région périfornicale | ++ | ++ |
| NDM | ++ | ++ | SubPV | +++ | +++ |
| NLST antérieur | 0 | +++ | SuM | + / +++ | + / +++ |
| NLST postérieur | + | +++ | | | |

La comparaison du marquage des régions évoquées dans le texte est donnée par ordre alphabétique. La signification des abréviations utilisées est rappelée dans la "liste des abréviations".

* La densité de l'innervation septale et du marquage Fos est exprimée de la façon suivante :
0 / + / ++ / +++ : absent / peu dense / dense / très dense.

L'animal stimulé choisi pour illustrer ces comparaisons a été anesthésié au pentobarbital sodique. On peut considérer que le marquage, limité au côté homolatéral, est spécifique de la stimulation car les neurones immunoréactifs pour Fos sont observés en très petit nombre du côté controlatéral (Fig. 23, 24, 25, 26).

Dans les plans très antérieurs, l'expression de Fos suit le trajet des fibres issues du site jusque dans l'aire préoptique latérale, en passant par l'aire préoptique médiane antérodorsale (Fig. 23A-B).

Le noyau du lit de la strie terminale et l'aire antéroventrale périventriculaire contiennent de nombreux neurones immunoréactifs pour Fos, bien qu'ils ne soient pas les cibles des efférences septales (Fig. 23 A-B).

Dans l'aire préoptique, l'innervation préférentielle de la portion antérodorsale puis de l'aire préoptique ventrale correspond, comme dans les plans antérieurs, à une expression de la protéine Fos (Fig. 23C-D, 24A-B). La partie sous-commissurale du noyau du lit de la strie terminale et le noyau préoptique médian sont très marqués pour la protéine Fos. Cependant, ils reçoivent peu de fibres septales, non ramifiées, qui ne semblent pas s'intéresser particulièrement à ces régions (Fig. 24A-B). A l'inverse, la région ventrale de l'aire préoptique médiane contient de nombreuses fibres venues du SL, mais ne présente pas d'immunoréactivité Fos (Fig. 24A-B).

Dans l'aire préoptique postérieure, on retrouve une bonne corrélation entre la présence de fibres et celle de Fos dans l'aire préoptique médiane. L'aire périventriculaire, peu innervée, est immunoréactive pour Fos. La région pauvre en fibres septales que l'on distingue médialement à l'interface entre l'aire préoptique latérale et l'aire préoptique médiane, contient de nombreux corps cellulaires marqués par la protéine Fos. Le noyau suprachiasmatique ne contient ni fibres septales, ni marquage Fos. La région surmontant le tractus optique, dans laquelle les fibres septales courent vers l'arrière de l'hypothalamus, n'est pas marquée par Fos (Fig. A-D).

Dans l'aire hypothalamique antérieure, la région périfornicale, le noyau du lit de la strie terminale postérieur, l'aire préoptique latérale et le noyau préoptique médian sont riches en efférences septales, et très immunoréactifs pour Fos. L'aire périventriculaire, à ce niveau, présente des neurones marqués par Fos mais est assez peu innervée médialement. L'aire rétrochiasmatique, qui contient des fibres septales de passage, n'est pas marquée par Fos (Fig. 24C-D, 25A-B).

Globalement, l'ensemble de l'hypothalamus médian, en particulier l'aire périfornicale, les aires hypothalamiques antérieure et latérale, contient de nombreuses efférences septales ainsi que la protéine Fos. L'aire dorsale au fornix et au troisième ventricule contient de nombreuses fibres mais n'est pas immunoréactive pour Fos. A l'inverse, l'aire périventriculaire est plus riche en neurones marqués qu'en efférences septales (Fig. 25A-D).

Le noyau paraventriculaire contient quelques fibres septales et peu de corps cellulaires marqués, hormis dans sa portion parvocellulaire médiane (Fig. 25C-D).

L'aire subparaventriculaire, très riche en fibres, est aussi la plus immunoréactive pour Fos (Fig. 25C-D).

Le noyau ventromédian, bordé par les projections septales, montre un marquage Fos spectaculaire et plus accentué dans sa portion ventrolatérale et médiane (Fig. 25C-D, 26A-B).

Le noyau arqué contient de nombreux neurones immunoréactifs pour Fos dans sa partie dorsomédiale, non concernée par les projections septales (Fig. 25C-D, 26A-B), et sa portion latérale, qui contient également des fibres marquées (Fig. 25C-D, 26A-B). Cette répartition reste valable dans le noyau arqué postérieur, et ce jusque dans la région préamillaire (Fig. 26C-D).

Dans les plans postérieurs de l'hypothalamus, le noyau dorsomédian, l'aire hypothalamique latérale et la région séparant le noyau ventromédian du noyau arqué sont très riches en marquage Fos et en fibres septales (Fig. 26A-B).

Enfin, les régions pré- et supramamillaires contiennent des fibres septales et expriment Fos; dans le même temps, la région mamillaire, immédiatement dorsale à la partie inférieure du troisième ventricule, n'est pas immunoréactive pour Fos bien que quelques fibres la parcourent (Fig. 26C-D).

B - Comparaison sur le même animal

Pour 5 rats, l'injection de dextran biotinylé a été combinée à la stimulation électrique du SL chez le même animal.

Il s'avère que la détection simultanée des deux signaux induit un important marquage de fond (du tissu), probablement dû à l'application répétée des kits avidine-biotine-peroxydase et de la DAB.

Les coupes ainsi traitées, observées à faible grossissement, nous ont permis cependant de confirmer la topographie comparée des fibres septales et de la protéine Fos dressée précédemment.

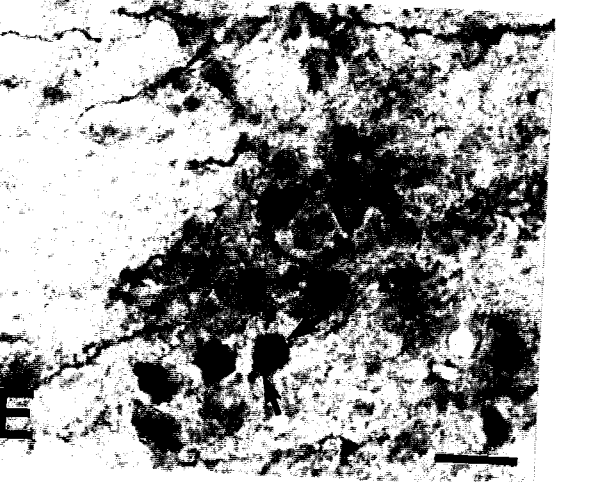
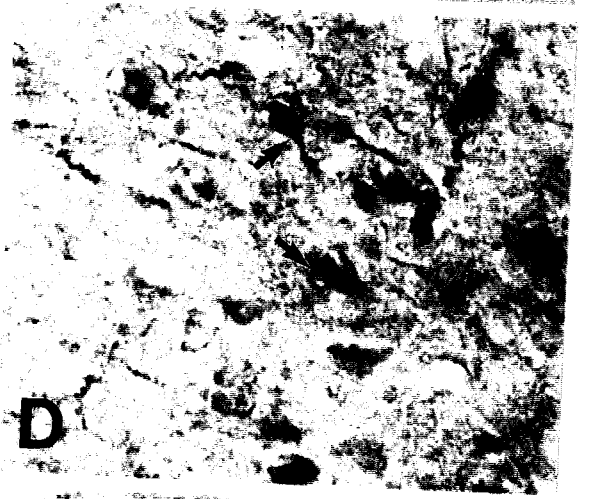
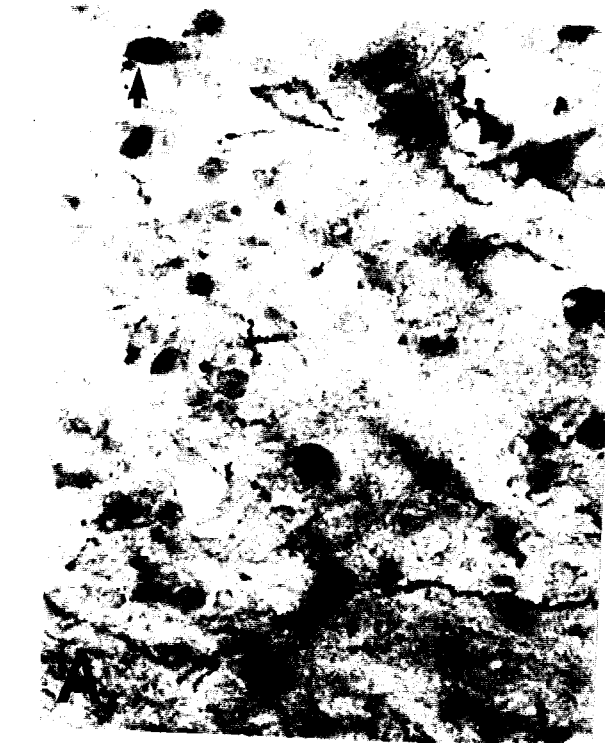
L'observation au fort grossissement (40 X) des régions contenant une double distribution, en l'occurrence l'aire préoptique médiane antérodorsale et la région subparaventriculaire, montre que certains neurones Fos semblent étroitement liés à des varicosités ou des terminaisons septales (Fig. 27A-E), alors que d'autres ne reçoivent pas d'afférences septales (Fig. 27A), ce qui permet d'envisager l'existence d'une influence septale indirecte.

Figure 27 : Détail des juxtapositions observées entre les efférences septales et les neurones exprimant la protéine Fos dans la région subparaventriculaire d'un rat ayant reçu une injection de dextran biotinylé et une stimulation électrique dans le SL.

A fort grossissement, de nombreuses juxtapositions sont relevées entre des neurones marqués et des terminaisons septales (flèches, A-E) ou encore des boutons " en passant " (flèches, B-C) au sein des régions contenant à la fois les efférences septales et les neurones immunoréactifs pour Fos, en l'occurrence la région subparaventriculaire.

Noter que certaines fibres septales sont, à l'évidence, également au contact de neurones non marqués (B). De même, la protéine Fos est exprimée dans les noyaux de neurones qui ne semblent pas concernés par une projection septale (C).

Barre de calibration : 10 μ m en E pour A-E



B

D

F

VII - Identification des neurones à LHRH produisant Fos après une stimulation électrique du SL

La détection des neurones immunoréactifs pour la LHRH a été réalisée sur les encéphales de trois rats qui ont reçu une stimulation électrique du SL.

Les coupes prélevées chez chacun de ces animaux ont été traitées pour détecter simultanément la présence de la protéine Fos (marquage par la DAB, observable en lumière blanche), et les neurones à LHRH (marquage par la fluorescéine, observable en microscopie de fluorescence).

L'examen de ces coupes nous a permis de comptabiliser le nombre de neurones immunoréactifs pour la LHRH qui expriment Fos dans les différents cas évoqués. Ces observations sont consignées dans le tableau N°4.

Tableau N°4 : Pourcentage de neurones à LHRH exprimant Fos à la suite d'une stimulation électrique du SL

| Nb neurones LHRH* | Anesthésie** | Stéréotaxie** | Stimulation** |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|
| côté homolatéral | 489 | 440 | 434 |
| % LHRH + Fos | 1,0 | 14,0 | 18,2 |
| côté controlatéral | 465 | 431 | 442 |
| % LHRH + Fos | 1,0 | 5,8 | 21,0 |

*Les comptages sont réalisés sur 1 coupe sur 3.

**Anesthésie : animal simplement anesthésié; Stéréotaxie : animal anesthésié ayant subi la descente d'un électrode de stimulation, sans stimulation; Stimulation : animal anesthésié et stimulé.

Une augmentation du nombre de neurones à LHRH exprimant Fos est observée à la suite d'une stimulation électrique du SL. L'un de ces neurones doublement marqué est illustré sur la Fig. 28.

Ces neurones sont très essentiellement recensés dans les régions proches du lieu de stimulation, à savoir le septum médian et les bandelettes diagonales de Broca.

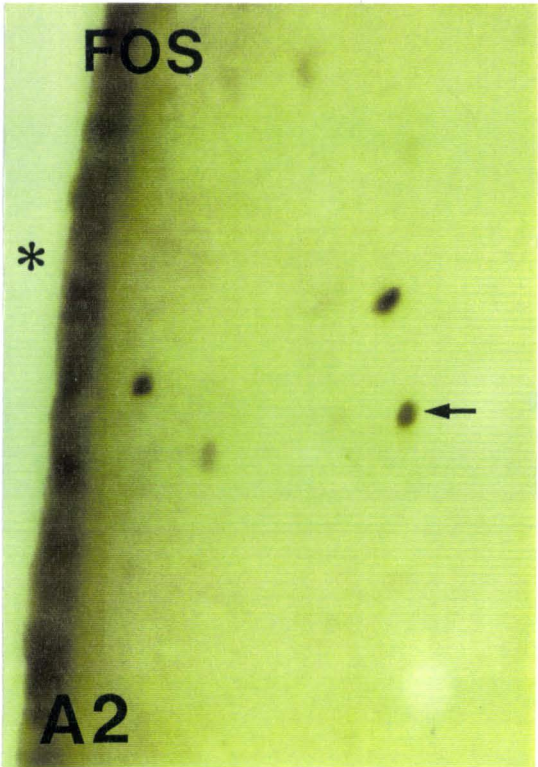
Chez les rats stimulés, ils sont observés en nombre égal du côté homolatéral à la stimulation et du côté controlatéral à la stimulation.

Figure 28 : Détection immunocytochimique combinée de la LHRH (fluorescéine) et de Fos (marquage à la DAB).

De très rares neurones immunoréactifs pour la LHRH (A1) expriment la protéine nucléaire Fos (A2) après stimulation électrique du SL (flèches). Cette microphotographie présente un neurone localisé dans le SLv, proche du site de stimulation.

* = ventricule latéral

Barre de calibration : 30 μm



Il est à noter que les rats implantés, mais pas stimulés ("stéréotaxie"), montrent également une augmentation du nombre de neurones à LHRH exprimant Fos, du côté homolatéral à l'implantation de l'électrode. Cette augmentation du nombre de neurones immunoréactifs du côté homolatéral est vraisemblablement due à la descente de l'électrode.

DISCUSSION

DISCUSSION

Pour des raisons de cohérence et de clarté, la discussion de ce travail suivra l'ordre d'apparition des résultats.

Elle traitera d'abord des études neuroanatomiques réalisées entre le SL et le diencéphale, à l'aide des traceurs axonaux antérogrades, à l'aide des souches virales et enfin à l'aide du marqueur d'activité Fos, qui sera considéré dans cette partie de la discussion comme un outil d'investigation neuroanatomique.

Elle traitera ensuite de l'exploitation fonctionnelle des données concernant la projection septale, en considérant les résultats obtenus avec le marqueur d'activité Fos.

En dernier lieu, la discussion sera axée sur les projections directes du SL vers les structures neuroendocrines.

Pour chacune de ces parties, seront traitées successivement les considérations méthodologiques sur les techniques mises en oeuvre et les apports des différentes études réalisées.

I - Etudes neuroanatomiques des efférences septales

A - Réexamen des projections directes du SL chez le cobaye et le rat à l'aide de traceurs axonaux antérogrades

1 - Considérations méthodologiques

a - Méthodes d'élucidation des circuits nerveux depuis les corps cellulaires vers les terminaisons axonales

Les premiers travaux de Nauta et Gyax (1954) concernant la mise en évidence de voies nerveuses étaient basés sur la dégénérescence antérograde des axones et terminaisons nerveuses induites par la lésion de la région contenant les corps cellulaires de ces neurones. Ainsi, l'imprégnation sélective par l'argent des produits de dégénérescence au sein de ces neurones a permis d'établir les premiers liens neuroanatomiques. Cependant, la lésion

concomitante des fibres nerveuses traversant la région étudiée a limité de façon définitive la généralisation de cette technique.

Par la suite, l'évolution des techniques de traçage axonal a permis d'affiner progressivement la description de l'organisation anatomique des circuits neuronaux dans le système nerveux central. Ainsi, les efférences d'une région ont pu être étudiées de façon plus fiable par l'application ponctuelle de composés exogènes, radioactifs ou non, véhiculés dans le cytoplasme du corps cellulaire du neurone vers ses zones de terminaisons présynaptiques (transport antérograde).

Récemment encore, la détection autoradiographique d'acides aminés tritiés (Leucine, Proline) était la méthode de traçage la plus répandue (Hendrickson et Edwards, 1978). Ces acides aminés, injectés dans la région étudiée, sont incorporés par les neurones et utilisés comme précurseurs lors de la synthèse protéique. Les protéines marquées sont alors transportées par le flux cytoplasmique au sein de l'axone jusqu'aux structures terminales. Après un temps de survie approprié, une émulsion photographique placée sur les coupes de cerveau fait apparaître le traceur radioactif.

Malheureusement, cette technique présente de nombreux inconvénients.

D'abord, l'autoradiogramme fournit un reflet indirect de la structure marquée, et non l'image de la structure elle-même. Pour cette raison, il est difficile de distinguer le marquage des fibres de celui des terminaisons, qui, en figurant le plus souvent des synapses, correspondent aux zones d'influence réelles de la région étudiée.

De plus, toujours en raison de la nature du système de détection, l'identification des structures marquées à l'échelle ultrastructurale est difficile.

Enfin, la faible résolution de cette méthode, par ailleurs techniquement contraignante, est peu favorable à la mise en évidence de connexions entre des régions proches.

Ces contraintes ont favorisé la découverte et l'utilisation d'autres traceurs axonaux antérogrades. Ce sont des composés de haut poids moléculaire qui ont la faculté de pénétrer dans les corps cellulaires par pinocytose spontanée.

Parmi eux, la peroxydase du raifort a été très largement employée (Mesulam, 1978). Elle est transportée rapidement, de façon fiable et sur de longues distances, et, bien que véhiculée de façon bilatérale au sein du neurone, sa composante antérograde peut être visualisée par l'utilisation d'une coloration spécifique à la tétraméthylbenzidine, alors que la méthode de détection classique à la DAB se révèle être insuffisante pour la mise en évidence des fibres et des terminaisons.

La peroxydase peut également être couplée à une lectine, telle que la lectine de germe de blé, WGA, ce qui facilite son incorporation par les corps cellulaires. En effet, les lectines

sont des agglutinines isolées d'une grande variété de plantes, qui se fixent sur des sites membranaires spécifiques avant d'être incorporées dans le corps cellulaire.

Quelques réserves peuvent être émises quant à l'utilisation de la peroxydase. La Vail et La Vail (1974) et Kristensson et Olson (1974) ont montré qu'elle est en partie incorporée par les fibres de passage. De plus, De Olmos et Heimer (1977) ont fait état de la possibilité d'un transport rétrograde de la peroxydase jusqu'au corps cellulaire du neurone, puis d'un transport antérograde par une collatérale de l'axone.

Dans le cas de sites d'injection étendus, et après un temps de survie long, Apkarian et Hodge (1989) ont également rapporté l'existence d'un passage transsynaptique de la WGA-HRP.

Enfin, lors de la mise en évidence de la peroxydase par la tétraméthylbenzidine, méthode de révélation la plus sensible, la morphologie des structures terminales des neurones peut être masquée par la présence de gros cristaux formés par les produits de réaction.

A l'heure actuelle, le traceur antérograde le plus largement utilisé est la lectine de haricot *Phaseolus* PHA-L, décrite pour la première fois par Gerfen et Sawchenko (1984) en microscopie optique et Wouterlood et Groenewegen (1985) en microscopie électronique.

Injectée par iontophorèse, la PHA-L est incorporée par un nombre limité de neurones au site d'injection. Elle est véhiculée presque exclusivement par transport antérograde dans tout le système axonal, à une vitesse de 4-6 mm/ jour. Elle remplit les fibres jusqu'aux plus fines arborisations et terminaisons présynaptiques. Elle n'est probablement pas incorporée par les fibres de passage.

La PHA-L est détectée par immunocytochimie et visualisée le plus souvent par la peroxydase, ce qui donne lieu à un marquage extensif excellent du corps cellulaire, des fibres et des terminaisons, aussi bien en microscopie optique qu'à l'échelle ultrastructurale. Cependant, Groenewegen et Wouterlood (1990), notamment, ont montré un caractère parfois capricieux quant à la reproductibilité du marquage obtenu par la PHA-L. De plus, la procédure immunohistochimique qui conditionne sa visualisation reste contraignante.

La biocytine, conjugué naturel de biotine et de lysine, a été décrite comme étant un excellent traceur antérograde en microscopie optique (King et Coll, 1989) et en microscopie électronique (Izzo, 1991). Injectée par pression ou iontophorèse, elle est véhiculée rapidement dans le neurone en raison de son faible poids moléculaire, et donne lieu à un marquage de haute résolution des efférences des neurones, sans imposer la contrainte d'une détection immunohistochimique. En effet, elle conserve l'affinité naturelle de la biotine pour

l'avidine, et l'utilisation d'une avidine marquée à la peroxydase ou à un fluorochrome permet de la visualiser. Cependant, son utilisation est limitée aux études faisant appel à un transport sur de courtes distances car elle est dégradée au cours du temps.

La neurobiotine, composé synthétique analogue à la biocytine, en présente les mêmes caractéristiques (Lapper et Bolam, 1991). Il est à noter que la biocytine et la neurobiotine sont également véhiculées par transport rétrograde dans le neurone.

Une autre famille de molécules pouvant être utilisées comme traceurs antérogrades a fait l'objet de nombreuses études.

Il s'agit de dextrans aminés de différents poids moléculaires, couplés à divers fluorochromes, qui montrent des aptitudes variables à être véhiculés dans un neurone.

Parmi eux, le F-R est un composé de 10.000 Da couplé à un fluorochrome, la tétraméthylrhodamine, qui s'est révélé être particulièrement intéressant pour réaliser des traçages neuroanatomiques (Schmued et coll, 1990). Injecté indifféremment par pression ou par iontophorèse, il est véhiculé majoritairement de façon antérograde et permet, sans procédure histochimique supplémentaire, car il est immédiatement visible en microscopie de fluorescence, d'observer les prolongements axoniques avec une résolution comparable à celle offerte par la PHA-L. Très stable, il peut être combiné sans restriction à de nombreuses autres techniques neuroanatomiques.

Une réserve peut être émise quant à sa capacité d'être incorporée par des fibres de passage, en particulier les fibres lésées (Schmued et coll, 1990; Nance et Burns, 1990). Il est alors important de veiller à obtenir un site d'injection restreint, préservant l'intégrité du tissu, pour une interprétation sans équivoque des résultats.

Cependant, la fluorescence disparaît au cours du temps et pendant l'observation microscopique; l'utilisation de fluorochromes, bien qu'aisée, n'est donc pas toujours recherchée. Seule une procédure de photoconversion de ces fluorochromes, longue et incertaine, permettrait d'exploiter les résultats obtenus en microscopie électronique.

C'est pourquoi un composé analogue, un dextran couplé à la biotine, a été également caractérisé (Veenman et coll, 1992; Brandt et Apkarian, 1992). Il s'est révélé être un excellent traceur antérograde. Sa mise en évidence nécessite simplement une réaction avec le complexe avidine-biotine-peroxydase, suivie par une révélation à la DAB. Elle est donc moins longue qu'une procédure immunocytochimique classique, telle que celle requise lors de l'utilisation de la PHA-L.

En conclusion, ce dextran biotinylé, facile à injecter et à révéler, fiable et offrant une visualisation très fine des prolongements axonaux, tant en microscopie optique

qu'électronique (Wouterlood et Jorritsma-Byham, 1993), s'avère être un outil de choix pour les études neuroanatomiques.

b - Choix des traceurs

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser, le F-R, chez le cobaye, puis ce dextran biotinylé, chez le rat, pour mener à bien nos investigations neuroanatomiques nécessitant un traçage axonal antérograde.

Dans les deux cas, nous avons préféré injecter ces traceurs par iontophorèse plutôt que par pression, afin d'obtenir aisément un site d'injection intense, limité et reproductible.

De plus, il s'avère que l'éjection de molécules de traceur obtenue par iontophorèse, au travers d'une micropipette de verre, minimise la lésion mécanique observée au site lors d'une éjection par pression, réduisant ainsi la possibilité d'incorporation du traceur par des fibres de passage lésées.

c - Caractérisation ultrastructurale des efférences septales

Dans cette étude, l'examen des sites de projection septale des fibres marquées par le F-R ou le dextran biotinylé a été basé sur l'observation de boutons terminaux ou de boutons "en passant", dont on peut supposer qu'ils représentent de éléments de contact fonctionnels. Nos observations en microscopie électronique ont permis d'affirmer, par l'observation de nombreux contacts synaptiques, que les boutons observés en microscopie optique correspondent bien à des synapses. Il est donc hautement probable que les projections septales mises en évidence par les traceurs antérogrades établissent des liens fonctionnels dans leurs aires de projection. Les études de Wouterlood et Groenewegen (1985) apportent des conclusions identiques.

2 - Apports de l'étude

a - Comparaison des efférences septales chez le cobaye et chez le rat

Nous avons souhaité définir la distribution détaillée des efférences du SL dans le diencéphale du cobaye et du rat, puisqu'elle n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude extensive chez le cobaye, et que les investigations globales menées chez le rat sont anciennes (Raisman, 1966a; Meibach et Siegel, 1977a; Swanson et Cowan, 1979; Garris, 1979), et quelque peu approximatives en raison des techniques de traçage employées. Précisément,

toutes les données neuroanatomiques concernant les projections du SL sont issues de travaux basés sur la dégénérescence axonale, l'autoradiographie et le transport axonal rétrograde.

L'utilisation de traceurs axonaux antérogrades présente, en plus des qualités intrinsèques des traceurs, l'avantage de lever l'ambiguïté consécutive aux études par traçage rétrograde. Avec ces derniers, il est pratiquement impossible de restreindre l'injection aux limites d'un noyau et par conséquent, il est difficile d'attribuer l'existence de neurones marqués à une connexion directe avec le noyau injecté plutôt qu'avec sa périphérie.

Récemment, Staiger et Wouterlood ont également réétudié la projection septale dans l'hypothalamus antérieur du rat (1990) puis Staiger et Nürnberger dans l'encéphale du cobaye (1991a, 1991b) à l'aide de la PHA-L.

Dans nos études, ainsi que dans celles de ces auteurs, la topographie des efférences septales s'est avérée très semblable chez le rat et chez le cobaye. Notamment, aucune différence majeure n'est observée dans l'aire périfornicale, qui contient les neurones donnant naissance au tractus enképhalinergique hypothalamo-septal, dont l'organisation est différente dans les deux espèces, puisque le noyau magnocellulaire dorsal, sous sa forme regroupée, n'existe que chez le cobaye.

C'est pourquoi nous pouvons discuter de manière globale des résultats apportés par notre étude à la fois chez le cobaye et le rat.

b - Réévaluation de la projection septale

Dans notre étude, la région du SLml, cible privilégiée du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal, ne présente pas de différences majeures quant à la répartition de ses efférences dans l'aire préoptique et l'hypothalamus par rapport aux régions plus ventrales du SL.

L'entité anatomique qu'elle forme au sein du SL, par la présence des populations de neurones à épines somatiques et son innervation privilégiée par l'hippocampe et l'hypothalamus, ne se reflète pas par une topographie très différente de ses efférences diencéphaliques si on la compare à celle de la région du SLv.

Simplement, il existe une certaine variation dans la densité de la distribution des projections septales dans l'hypothalamus, si l'on considère que plus les sites sont ventraux dans le SL, plus la projection est concentrée dans les aires médianes du diencéphale. Les travaux de Staiger et Nürnberger (1991b) vérifient nos observations et étendent cette particularité au SLd, qui se projette très majoritairement dans les aires latérales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus.

L'absence d'une projection du SL vers le septum médian confirme les travaux récents de Witter et coll (1992) et Leranthe et coll (1992).

En contradiction avec les travaux de Staiger et Nürnbergger (1991b), nous montrons que la projection septale n'intéresse pas le noyau du lit de la strie terminale dans son aspect rostral, mais parcourt sa portion caudale sans y former de véritables plexus de terminaisons. Ces auteurs décrivent, au contraire, une projection septale assez dense dans le noyau du lit de la strie terminale antérieur et plus ténue dans sa portion postérieure.

Les traceurs que nous avons utilisés permettent de souligner les variations de la projection septale dans l'aire préoptique, déjà signalée par Chiba et Murata (1985) et Simerly et Swanson (1986). Bien qu'une relation directe du SL avec le noyau supraoptique soit démontrée ici, elle est très ténue.

Nous pouvons affirmer que le noyau supraoptique n'est pas la cible privilégiée des efférences septales, confirmant ainsi les travaux de Sawchenko et Swanson (1983), Oldfield et coll (1985), Oldfield et Silverman (1985) et Tribollet et coll (1985), Jhamandas et coll (1989), Ferris et coll (1990), Staiger et Wouterlood (1990) et Anderson et coll (1990). Ces résultats sont en contradiction avec les conclusions qui évoquent une relation septale directe dans le noyau supraoptique, données par Zaborsky et coll (1975), Garris (1979) et Iijima et Ogawa (1980) d'une part, sur la base d'arguments anatomiques, et Powell et Rorie (1967), Tangapregasson et coll (1974), Poulain et coll (1980, 1981) et Cirino et Renaud (1985) d'autre part, à partir de données électrophysiologiques.

En fait, la périphérie dorsale du noyau supraoptique, et par extension la région dorsochiasmatic, sont richement innervées par le SL, ce qui suggère l'existence d'une relation indirecte du SL sur le noyau supraoptique.

De la même façon, nous montrons que le noyau suprachiasmatic n'est pas une cible privilégiée du SL, corroborant ainsi les travaux de Watts et coll (1987). Il faut signaler que Staiger et Nürnbergger (1991a) décrivent une projection significative du SL dans le noyau suprachiasmatic, sans avoir pu observer d'apposition entre les efférences septales et les corps cellulaires des neurones.

Les études anciennes des projections septales (Raisman, 1966a; Meibach et Siegel, 1977a; Swanson et Cowan, 1979; Garris, 1979) soulignent une innervation prépondérante des régions latérales de l'aire préoptique et de l'hypothalamus. En fait, c'est au niveau des régions médianes que les efférences septales sont ici le plus fréquemment observées. Elles y sont organisées en plexus de fibres très ramifiées qui présentent de nombreux boutons terminaux, très significatifs d'une relation fonctionnelle. Par opposition, les fibres plus latérales sont moins ramifiées et ressemblent plutôt à des fibres de passage, ce qui n'exclut pas l'existence de contacts synaptiques " en passant ".

Notre étude permet également de lever toute ambiguïté quant à la projection du SL vers le noyau paraventriculaire, très controversée jusqu'à présent.

En accord avec les travaux de Tribollet et coll (1985), Oldfield et coll (1985) et Staiger et Nürnbergger (1991a), nous pouvons la dissocier en deux parties :

~ Une projection majeure du SL est observée en périphérie du noyau paraventriculaire, en particulier sa périphérie ventromédiane, nommée aire subparaventriculaire chez le rat (Watts et coll, 1987) et noyau alaire chez le cobaye (Bleier, 1983). Notre étude met en exergue cette région, qui constitue la structure hypothalamique recevant l'innervation septale la plus dense.

~ Une projection mineure du SL dans l'ensemble du noyau paraventriculaire, tant dans sa portion magnocellulaire que dans sa portion parvocellulaire.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les travaux neuroanatomiques de Conrad et Pfaff (1976b), Silverman et coll (1981), Tribollet et Dreyfus (1981), Kiss et coll (1983) et Berk et Finkelstein (1985) et les travaux électrophysiologiques de Negoro et coll (1973), Pittman et coll (1981) et Saphier et Feldman (1987), qui établissaient une relation directe entre le SL et le noyau paraventriculaire.

En accord avec les travaux de Malsbury et coll (1979), Swanson et Cowan (1979), Kita et Oomura (1982), Fahrbach et coll (1989) et Staiger et Nürnbergger (1991a), nous montrons que le SL n'est pas en relation directe avec le noyau ventromédian, hormis dans son aspect le plus postérieur, mais qu'il se projette massivement dans sa périphérie, contrairement à ce qu'affirment les travaux de De Olmos et Carnes (1978), Garris (1979), Luiten et Room (1980) et Berk et Finkelstein (1981).

Enfin, nous confirmons l'existence d'une relation directe septo-arquée, suggérée par les résultats neuroanatomiques de Poulain (1977), Hagino et coll (1977) et Garris (1979), et électrophysiologiques de Poulain (1977) et Blume et coll (1982). De plus, le plexus dense de terminaisons septales qui borde le noyau arqué suggère une relation indirecte avec les neurones du noyau.

Nous avons également vérifié la projection septale vers la région prémamillaire, abondamment décrite par Wouterlood et coll (1988).

c - Spécificité du marquage

Les fibres issues du subiculum ventral et de l'amygdale postérieure traversent le SL, surtout dans son aspect ventral, pour marquer différentes régions de l'hypothalamus (Köhler, 1990; Canteras et Swanson, 1992; Canteras et coll, 1992), suivant une distribution très proche de celle obtenue après une injection de traceur dans le SL. Dans la mesure où le F-R, et en moindre part, le dextran biotinylé, sont susceptibles d'être incorporés au site

d'injection par les fibres de passage, le marquage décrit dans cette étude pourrait en partie être considéré comme non spécifique du SL. Cependant, l'observation des sites d'injection permet d'exclure l'existence d'un grand nombre de fibres lésées, qui pourraient avoir véhiculé le traceur. De plus, les travaux de Nance et Burns (1990) montrent que l'injection de F-R additionné à des neurotoxines, qui détruisent les corps cellulaires, diminue fortement l'ampleur du marquage obtenu par rapport à celui observé à la suite d'une injection de F-R seul. Les dextrans semblent donc peu sujets à être incorporés par les fibres de passage.

B - Examen des projections indirectes du SL chez le rat à l'aide des souches virales comme marqueurs axonaux transsynaptiques et du marqueur d'activité neuronale Fos

Après avoir établi la cartographie des aires de projections septales dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat, nous avons souhaité mettre en évidence les populations neuronales dont elles sont les cibles indirectes.

Nous avons donc recherché un traceur pouvant, après migration antérograde, franchir les synapses, permettant ainsi de montrer les éléments constitutifs d'une chaîne de neurones connectés.

A cette fin, nous avons utilisé les souches virales comme traceurs axonaux transsynaptiques. Nous avons également utilisé le marqueur neuronal Fos, qui permet de mettre en évidence des neurones qui, en étant connectés, sont activés en chaîne à la suite d'une intervention expérimentale.

1 - Utilisation de souches virales comme marqueurs axonaux transsynaptiques

a - Considérations méthodologiques

Un passage transneuronal a été reporté, de façon artéfactuelle, lors de l'utilisation de quelques toxines (fragment de toxine tétanique : Evinger et Ericksen, 1986) et de lectines (WGA, WGA-HRP : Porter et coll, 1985; Shipley, 1985, Apkarian et Hodge, 1989).

Pour qu'une substance soit réellement efficace en tant que traceur transneuronal, son transfert doit se faire de manière fréquente, exclusivement au niveau des synapses, et gagner le neurone-cible en quantité suffisante pour y permettre sa détection.

C'est pourquoi l'utilisation de virus neurotropes semble être indiquée pour établir des circuits neuronaux polysynaptiques (Kuypers et Ugolini, 1990). Les virus ont en effet la

propriété de migrer au sein du neurone, dans le sens antérograde et/ou rétrograde, puis de traverser les synapses et de se répliquer dans le neurone-cible.

Bien que cette capacité des virus à migrer au sein du tissu nerveux soit établie depuis longtemps (Goodpasture et Teague, 1923), l'utilisation de souches virales en tant que traceur ne s'est développée qu'au cours de la dernière décennie. Le plus souvent, elle a permis d'établir les circuits de l'innervation somatique et autonome de structures centrales et périphériques (revue dans Levine et Coll, 1994). Elles ne sont encore que très rarement employées pour montrer des connexions internes dans le système nerveux central (Norgren et Lehman, 1989; MacLean et coll, 1989).

Dans le cadre de notre étude, nous avons recherché une souche virale qui serait véhiculée à partir d'une inoculation dans le SL, dans le sens antérograde, avant de franchir les synapses et de marquer les populations cibles de premier et de second ordre.

Le plus souvent, les souches utilisées sont des virus à ADN de la sous-famille des virus α de l'Herpès. Parmi eux, on distingue notamment les Herpes-simplex-virus (HSV-1 : souches 17, F, H-129, McIntyre, HSV-2) et le virus de la pseudorange (PRV : souches Bartha, Becker, Kaplan).

Toutes les études de traçage viral font état d'un transport bidirectionnel du virus au sein des systèmes de neurones étudiés, ce qui rend l'interprétation des résultats assez difficile. Cependant, l'une des composantes de ce transport, le plus souvent la composante rétrograde, est très supérieure à l'autre et peut être utilisée comme référence. Par exemple, Card et coll (1990) rapportent un transport rétrograde de PRV de la périphérie vers le système nerveux central plus efficace, plus ample et plus rapide que son transport antérograde. De la même façon, Ugolini et coll (1987) et Barnett et coll (1993) montrent une composante antérograde dans la migration d'HSV-1 (McIntyre) négligeable par rapport à la quantité de virus véhiculé par voie rétrograde.

Le plus souvent, les virus sont donc utilisés comme traceurs transneuronaux rétrogrades.

Seule l'étude de Zemanick et coll (1991) fait état de façon précise d'un transport préférentiellement antérograde d'une souche virale dans le système nerveux central. Il s'agit de la souche H-129 de HSV-1. Ils décrivent une migration différentielle des deux souches HSV-1, H-129 et McIntyre, dans le cortex de primate, très majoritairement antérograde pour la souche H-129 alors que la souche McIntyre semble véhiculée par voie rétrograde, confirmant ainsi les observations de Norgren et Lehman (1989), dont les résultats permettent

d'affirmer que cette dernière est transportée de l'axone vers le corps cellulaire des neurones dans le système nerveux central.

Norgren et coll (1992) montrent qu'une autre souche, HSV-2 (186), est véhiculée par voie antérograde dans le système visuel du hamster. Il faut souligner que le comportement d'une souche virale varie selon le système qu'elle infecte (Dix et coll, 1983; Sedarati et Stevens, 1987). Ainsi, ces données ne nous permettent pas de certifier que cette même souche, inoculée dans une autre région du système nerveux central, aura une migration antérograde.

Ne disposant pas de la souche H-129 de HSV-1, nous avons expérimenté d'autres souches HSV-1, F et 17, afin de trouver une souche montrant le même comportement. Nous avons comparé deux souches virulentes, F et 17, à la souche 17 rendue défective pour la réplication (par délétion de gènes), et nommée alors 17(Δ 42), pour étudier leur capacité à se propager dans le système nerveux central.

En règle générale, les souches sauvages sont très virulentes : elles ont un grand pouvoir infectieux, se propagent vite, et se répliquent en grand nombre dans le neurone-cible. A l'inverse, la souche défective migre uniquement dans le neurone qui l'a incorporée, puis entre en latence.

L'étendue de la propagation du virus, qui correspond au nombre de synapses franchies, varie selon la virulence de la souche utilisée. Elle varie aussi selon le titre auquel elle est injectée. Le titre de la solution virale correspond au nombre de particules virales infectieuses en solution. Le titre des virus inoculés a donc été choisi pour permettre une infection du système étudié, en limitant la destruction des neurones et l'infection des cellules gliales.

Il est possible de suivre le cheminement du virus en faisant varier le temps de survie de l'animal (Ugolini, 1992). En effet, la progression du virus dans l'encéphale se fait de façon ordonnée, par étapes, correspondant à l'ordre des connexions nerveuses (Card et coll, 1990; Ugolini, 1993). Donc les premiers neurones infectés sont marqués les premiers, puis les neurones qui leur sont connectés sont marqués après un temps plus long.

Quel que soit le sens de migration du virus, la validité de ce type d'étude implique que seules les synapses soient le siège du transfert viral, d'un neurone à l'autre, ce qui est vérifié par les études de Card et coll (1990, 1993).

On peut toutefois imaginer d'autres voies de passage pour le virus :

~ Une partie du marquage pourrait être liée à une infection de la glie voisine du neurone infecté. On pourrait craindre que ces cellules gliales permettent le transfert du virus à d'autres neurones, qu'elles contactent par leurs prolongements. Au contraire, il est établi que

la glie forme une barrière autour du neurone lysé, ce qui évite la diffusion non spécifique de virions dans l'espace extracellulaire et contribue ainsi à la spécificité du mouvement transneuronal du virus (Card et coll, 1990, 1993).

~ Il est également envisageable qu'après son incorporation par les cellules gliales entourant le neurone infecté, le virus puisse diffuser, non plus d'une cellule gliale à un neurone, mais d'une cellule gliale à une autre. En fait, une telle diffusion est très lente et n'a que peu l'occasion de se produire lors des temps de survie appliqués à l'animal. De plus, les astrocytes et les macrophages ne peuvent pas libérer de particules virales (Card et coll, 1990). Les temps de survie utilisés dans notre étude permettent d'éliminer l'éventualité d'un transport glial du virus.

Dans nos expériences avec les souches HSV-1 F et 17, les rats ne survivent pas plus de trois jours à l'infection. Le marquage observé est étendu, même pour les temps de survie les plus courts, traduisant une virulence importante des souches utilisées. La densité du marquage s'accroît avec le temps de survie. De plus, les cellules marquées présentent des morphologies différentes. Le plus souvent, les neurones présentent un marquage qui dessine le corps cellulaire et les prolongements dendritiques. Ce type de marquage est couramment observé dans d'autres études (MacLean et coll, 1989; Astic et coll, 1993; Levine et coll, 1994). Le marquage des neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires est différent, en ce sens que seuls les corps cellulaires sont marqués. Ce type de marquage est rapporté dans les expériences de Card et coll (1990). D'autres neurones apparaissent lysés, et forment alors des " taches ". Elles pourraient correspondre à une invasion du virus dans les cellules gliales proches des neurones lysés, qui auraient incorporé le virus. Le nombre de ces " taches " augmente proportionnellement au temps de survie. Cette morphologie particulière est observée par d'autres, et souvent corrélée à un stade avancé de l'infection (Zemanick et coll, 1991; Dehal et coll, 1993; Levine et coll, 1994). Elle peut même servir à indiquer la durée de l'infection (Levine, 1974) et être utile pour dissocier les populations neuronales de premier ou de deuxième ordre. Dans notre étude, cette caractéristique est peu exploitable puisque le nombre de ces cellules irrégulières est élevé dès les premiers stades de l'infection.

b - Apports neuroanatomiques de l'étude

Les différentes souches utilisées dans notre travail apparaissent avoir le même comportement, puisqu'aucune variation topographique n'est notée.

Une observation importante est que les neurones marqués dans l'aire préoptique et dans l'hypothalamus présentent à la fois une distribution latérale, limitée au côté de l'injection, et une distribution bilatérale, symétrique, qui touche les structures médianes.

L'interprétation du marquage passe obligatoirement par sa comparaison avec les données apportées par les études neuroanatomiques classiques qui décrivent les afférences et les efférences de la région étudiée.

Il semble ici que seul le marquage unilatéral soit spécifique de l'injection intraseptale. En effet, les efférences septales sont principalement homolatérales, comme nous l'avons démontré, de même que les afférences (Staiger et Nürnberger, 1989).

Il apparaît alors que ce marquage se superpose incontestablement à celui des afférences septales, puisque les aires préoptique et hypothalamique latérales et la région dorsochiasmatique en particulier, plutôt que l'aire préoptique médiane et la région subparaventriculaire, sont marquées. Les particules virales ont donc migré par voie rétrograde, plutôt qu'antérograde, à partir du SL.

En règle générale, la comparaison du marquage viral à celui reporté dans des études neuroanatomiques classiques permet également de cerner les voies polysynaptiques que l'on s'attend à montrer. Nous pourrions envisager qu'une partie du marquage observé dans nos expériences résulte d'un transfert transsynaptique du virus. Cependant, toutes les aires homolatérales marquées sont connues pour se projeter dans le SL. Par ailleurs, la composante bilatérale du marquage, qui recouvre toutes les structures médianes, pourrait empêcher de reconnaître un tel transport, même s'il a eu lieu.

Contrairement au marquage unilatéral, le marquage bilatéral, symétrique et médian est observé dans les régions périventriculaires et le noyau suprachiasmatique.

Il laisse supposer une libération du virus dans le ventricule, qui aurait ensuite été incorporé par les cellules épendymaires ou les prolongements de cellules atteignant les ventricules. En effet, il a été montré que les virus peuvent se propager dans le liquide céphalorachidien (Barnett et coll, 1993).

Les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires sont les seules structures non médianes qui présentent un marquage bilatéral. Il n'apparaît que lorsque la survie est longue, ce qui est l'indice d'un marquage polysynaptique. Le type inhabituel du marquage des corps cellulaires laisse également pressentir qu'il ne provient pas d'un marquage d'un neurone de premier ordre, après transport dans le sens antérograde ou dans le sens rétrograde. Le marquage des neurones magnocellulaires pourrait donc provenir

d'un transport spécifique à travers une chaîne de neurones connectés, sans que l'on ne puisse préciser ni le sens du transport, ni le nombre de neurones en contact.

En conclusion, les études de traçage viral apportent des informations valables si l'on confronte le marquage obtenu avec les circuits déjà connus, afin de définir le sens de migration du virus et de dissocier un transport spécifique et une diffusion non spécifique du virus. En ce qui concerne cette étude, il est possible d'affirmer que le marquage unilatéral observé est spécifique et consécutif à un transport rétrograde. Les souches virales utilisées ne nous ont pas permis de reconnaître les corps cellulaires des neurones contactés par les efférences septales, ni d'identifier leurs cibles. Cependant, cette étude nous a permis de supposer l'existence d'un circuit polysynaptique, souvent suggéré par d'autres auteurs sur la base de données physiologiques, liant le SL aux populations magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Nous reviendrons plus loin sur ce sujet.

2 -Utilisation du marqueur d'activité Fos

a - Considérations méthodologiques

α - Choix de la méthode

L'activité neuronale peut être suivie par des enregistrements électrophysiologiques, mais ils ne permettent de caractériser qu'un petit nombre de neurones à la fois. D'une autre manière, comme l'activité métabolique des neurones varie selon qu'ils sont ou non sollicités, celle-ci peut être mesurée par injection périphérique de ^{14}C -2-déoxyglucose qui, repris au niveau cérébral, va être incorporé de façon proportionnelle à la quantité d'énergie nécessaire au fonctionnement du neurone, tant au niveau de son corps cellulaire que de ses prolongements (Sokoloff et coll, 1977). Cette méthode au 2-déoxyglucose permet, après autoradiographie, de recenser les aires activées, mais elle n'offre pas un degré de résolution suffisant pour analyser l'activité unitaire du neurone.

Plus récemment, le suivi par immunocytochimie de l'induction de la protéine Fos s'est avéré utile pour identifier des régions contenant des neurones activés dans diverses conditions expérimentales (Sagar et coll, 1988; Dragunow et coll, 1989). Comme ces neurones peuvent s'activer en chaîne, la méthode représente un outil neuroanatomique que nous avons utilisé comme tel dans cette étude.

β - Historique

La réponse d'un neurone à un stimulus se compose d'une cascade d'évènements complexes, comprenant à la fois des réponses rapides, par la modification de substrats présents, et des effets à plus long terme qui font appel à l'expression génique.

Alors que les processus moléculaires induisant les réponses neuronales rapides sont assez bien décrits, les bases du fonctionnement des réponses à long terme, et la façon dont elles varient, sont mal définies.

Pendant, de récentes avancées en biologie moléculaire ont permis d'identifier des molécules impliquées dans le couplage du stimulus et de la transcription du gène.

Des stimuli de diverses natures, tels que des agents convulsants (Daval et coll, 1989; Morgan et coll, 1987), un courant électrique (Krukoff et coll, 1992), des neurotransmetteurs (Stone et coll, 1991; Richard et coll, 1992), un stress d'immobilisation (Honkaniemi, 1992; Imaki et coll, 1992), la douleur (Bullitt, 1989; Hunt et coll, 1987), l'injection de solutions salines (Ceccatelli et coll, 1989; Sharp et coll, 1991), la déshydratation (Sagar et coll, 1988), le rythme nyctéméral (Kornhauser et coll, 1993), certaines conditions pathologiques, comme l'épilepsie (Dragunow et Faull, 1989) ou physiologiques, comme le proestrus (Lee et coll, 1990) activent la transcription rapide et transitoire d'une série de gènes, dont certains codent pour des protéines nucléaires, dans diverses régions de l'encéphale.

Ces gènes, dont l'expression est normalement basse, sont appelés gènes de réponse précoce. Ils sont supposés orchestrer la réponse plus tardive de la cellule à la stimulation (Curran et Morgan, 1987; Lau et Nathans, 1987)

Parmi eux, les gènes *fos* et *jun* donnent naissance aux protéines nucléaires, Fos et Jun. D'autres protéines, issues de l'expression d'autres gènes de réponse précoce, présentent d'importantes homologies de séquence avec Fos et sont regroupées sous le terme générique de FRA (Fos Related Antigens). Elles sont exprimées de façon concomitante à Fos et sont présentes dans le noyau pendant un temps plus long après la stimulation.

La protéine Fos présente une " glissière à Leucine " qui initie la formation de dimères avec l'une des protéines Jun. Ces dimères forment ainsi un facteur de transcription qui reconnaît une séquence consensus particulière de l'ADN, appelée site de liaison AP-1, située en aval de nombreux gènes. Cet hétérodimère nucléoprotéique va modifier la transcription génique.

Si l'on considère cet élément de régulation AP-1 comme étant essentiel à la transcription de certains gènes (Franza et coll, 1988; Rauscher et coll, 1988), Fos et Jun

représentent un lien crucial entre la stimulation du neurone et les modifications de l'expression génique qu'elle induit.

En tant que telles, ces protéines apparaissent comme les " troisièmes messagers " dans la cascade d'évènements liant la stimulation à la transcription.

C'est pourquoi la détection de la protéine Fos par immunocytochimie, ou de ses ARNm par hybridation *in situ* est maintenant largement utilisée comme outil permettant de réaliser une cartographie fonctionnelle de l'activation neuronale en réponse à divers stimuli.

b - Validité de la technique

α - Validité de l'outil chez le cobaye et le rat

Une seule étude de l'expression de Fos chez le cobaye a été publiée (Chahl et coll, 1993). Dans notre étude, la détection de la protéine Fos s'est avérée impossible dans cette espèce. C'est pourquoi toute notre étude a été menée chez le rat. L'absence de résultats chez le cobaye est vraisemblablement due au fait que l'épitope reconnu par les anticorps est différent chez le rat et le cobaye. Il ne faut pas non plus exclure la possibilité d'un problème méthodologique propre à l'utilisation des anticorps chez le cobaye

β - Choix de la détection de la protéine plutôt que de ses ARNm

Outre le fait que la détection de l'activation neuronale par immunocytochimie soit techniquement moins lourde et plus facile à interpréter que lorsqu'elle est réalisée par hybridation *in situ*, elle se prête aisément à la détection combinée du contenu des neurones.

De plus, la demi-vie de la protéine est plus longue que celle de ses ARNm et permet de recenser de façon sûre la totalité des neurones stimulés.

Enfin, le délai d'apparition de la protéine (30 à 45 minutes), beaucoup plus long que celui des ARNm (5 à 10 minutes), permet d'éviter un marquage non spécifique consécutif à la manipulation de l'animal juste avant son sacrifice.

γ - Spécificité du marquage Fos

γ_1 - Le marquage nucléaire correspond à la présence de la protéine Fos

Les protéines FRA présentent de nombreuses homologies de séquence avec Fos du côté C-terminal de la protéine (Cohen et coll, 1989).

Les anticorps que nous avons utilisés sont dirigés contre la partie N-terminale de Fos, ce qui leur confère une grande spécificité, dont il n'est pas établi cependant qu'elle soit absolue (Cohen et coll, 1989; Adamkiewicz et coll, 1990; Abate et coll, 1991).

Le fait qu'ils puissent détecter, en plus de Fos, des protéines de même type n'est cependant pas un obstacle dans la mesure où ils reflètent de toute façon un changement d'activité rapide et transitoire dans le neurone.

γ_2 - Le marquage Fos est observé principalement dans les neurones

Certains auteurs (Mugnaini et coll, 1989) affirment que seuls les neurones peuvent exprimer Fos, contrairement aux cellules gliales, épendymales ou épithéliales. Cependant, Kjaer et coll (1994) et Dragunow et coll (1990) illustrent un marquage Fos dans les cellules épendymales et gliales.

Dans notre étude, la très vaste majorité du marquage est recensée au sein de neurones; cependant, les cellules épendymaires bordant le ventricule latéral homolatéral à la stimulation et le troisième ventricule sont également marquées. Elles ont sans aucun doute la capacité de produire Fos, bien que la signification en soit inconnue.

γ_3 - Le marquage Fos est présent chez les animaux normaux

Il est établi que la protéine Fos est normalement exprimée dans l'encéphale (Krukoff et coll, 1992; Popovici et coll, 1990; Lee et coll, 1990; Hoffman et coll, 1990). On peut considérer qu'elle reflète une partie de l'activité cérébrale de l'animal au moment du sacrifice.

Comme nous l'avons observé sur les animaux témoins, sacrifiés juste après l'anesthésie, l'expression basale de Fos est faible et ne concerne que quelques neurones marqués disséminés dans le SL, l'aire préoptique et l'hypothalamus.

Bien que ce marquage puisse varier d'un animal à l'autre (Sandner et coll, 1992), il reste limité et ne gêne pas l'interprétation des images obtenues après stimulation.

γ4 - Le marquage Fos n'est pas consécutif à la manipulation

De nombreux travaux (Morgan et Curran , 1991, Krukoff et coll, 1992) montrent, ainsi que nous l'avons observé, que la descente d'une électrode ou d'une canule dans l'encéphale produit un marquage Fos homolatéral dans le cortex pariétal. Cela ne gêne pas l'interprétation des résultats.

D'autre part, Sharp et coll (1991), Honkaniemi et coll (1992), Kokonen et coll (1992) et Cullinan et coll (1995) montrent que le stress de contention induit une forte expression de Fos, notamment dans le SL et, au niveau de l'hypothalamus, dans le noyau paraventriculaire parvocellulaire, qui contient les neurones à CRF.

C'est pourquoi certains auteurs travaillent chez les animaux éveillés, qui ont subi longtemps auparavant l'implantation d'une canule ou d'une électrode, et qui sont ensuite habitués à être manipulés. Dans ces conditions, il s'avère que les animaux ne sont pas stressés et que le marquage Fos observé dans le cerveau est semblable à celui d'animaux témoins (Sharp et coll, 1991).

Au contraire, d'autres auteurs préfèrent utiliser des animaux anesthésiés plutôt que conscients, pour minimiser l'activation du stress. Ils décrivent alors un marquage Fos identique à celui que présentent des animaux témoins.

Dans nos expériences, on pouvait s'attendre à ce que la manipulation des animaux suffise à générer un stress et l'expression de Fos qui en résulte. C'est pourquoi nous avons réalisé des séries expérimentales avec des animaux éveillés, et habitués à être manipulés, d'une part, et des animaux anesthésiés d'autre part.

En fait, nous n'avons constaté, entre ces deux populations, aucune différence de marquage dans les aires impliquées dans l'expression de Fos à la suite d'un stress. Quand on considère la totalité des animaux stimulés, il est visible que ce marquage est semblable à celui des rats témoins implantés; dans de rares cas, un marquage Fos apparaît dans les noyaux paraventriculaires parvocellulaires, traduisant vraisemblablement un stress de l'animal.

Ces observations nous ont conduit à mener la plupart de nos expériences sur des rats anesthésiés, l'utilisation de rats vigiles étant beaucoup plus contraignante.

$\gamma 5$ - Le marquage Fos varie en fonction de l'anesthésique

L'utilisation d'anesthésiques peut entraîner une modification de l'activité ou de la capacité de réponse des neurones au stimulus appliqué. C'est pourquoi nous avons choisi de tester différents anesthésiques.

~ Effet de la kétamine

La kétamine est un antagoniste des récepteurs NMDA (MacDonald et Nowak, 1990). Son utilisation pourrait empêcher une induction de Fos induite par le stimulus (Dragunow et Faull, 1989), puisque l'activation du récepteur NMDA est associée à une augmentation de l'expression du proto-oncogène Fos (Dave et Tortella, 1994). Associée à la xylazine, la kétamine a cependant été choisie par Dave et Tortella (1994) et Bullitt et coll (1992) pour suivre l'expression de Fos.

Dans notre étude, l'anesthésie des rats à l'aide du mélange xylazine/kétamine nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de Fos dans de nombreuses régions à la suite de la stimulation du SL, bien que le marquage de base soit relativement important.

~ Effet de l'uréthane

Plutôt que la kétamine, l'uréthane semble être un anesthésique plus approprié, parce qu'il n'a pas d'effet dépresseur sur l'activité des neurones. Il est souvent employé, en particulier parce qu'il permet de préserver les réflexes sympathiques et parasympathiques sous anesthésie (Maggi et Meli, 1986a, 1986b), contrairement aux barbituriques.

Cependant, l'anesthésie à l'uréthane est associée à une expression de Fos dans les îlots de Calleja, le cortex, le noyau central de l'amygdale, l'hypothalamus (aire préoptique médiane, noyau ventromédian, noyaux supraoptique et paraventriculaire) et d'autres régions du tronc cérébral (Krukoff et coll, 1992). Dans la mesure où les liens entre le SL et les populations magnocellulaires sont recherchés, l'examen de l'expression de Fos dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire est primordiale. Or, l'uréthane induit une forte expression de Fos dans ces noyaux, due à une modification d'osmolarité et pourrait masquer l'activation des neurones après le stimulus (Krukoff et coll, 1994).

Dans notre étude, les animaux anesthésiés à l'uréthane présentent un marquage de base important. Cela rend plus difficile la comparaison entre le marquage observé du côté stimulé et celui du côté controlatéral à la stimulation. Toutefois, à la suite de la stimulation électrique du SL, l'augmentation de l'expression de la protéine Fos du côté homolatéral à la stimulation est retrouvée dans les mêmes aires que celles qui répondent à la stimulation chez un rat anesthésié avec le mélange xylazine/kétamine.

~ Effet du pentobarbital sodique

Les barbituriques, notamment le pentobarbital sodique, conduisent à une dépression généralisée des neurones, en agissant sur les récepteurs GABA. Ils peuvent donc empêcher l'augmentation du marquage Fos inhérent à la stimulation (Colwell et coll, 1993; Herrera et coll, 1993). Cependant, Fu et Beckstead (1992), Sugimoto et coll (1993) choisissent le pentobarbital plutôt que l'uréthane, notamment pour éviter l'induction de Fos due au changement d'osmolarité. Il ne produit un marquage Fos important que dans l'habenula (Krukoff et coll, 1992).

Au cours de notre étude, nous avons constaté que le pentobarbital sodique est l'anesthésique qui induit la plus faible expression basale de Fos. Il nous a permis de détecter des changements d'activité suite à une stimulation septale, dont la distribution est semblable à celle obtenue après anesthésie au mélange xylazine/kétamine ou à l'uréthane.

De ce fait, le pentobarbital sodique nous apparaît comme un anesthésique de choix puisque le marquage controlatéral à la stimulation est presque inexistant.

En conclusion, aucun des trois anesthésiques utilisés au cours de cette étude ne semble nuire à l'acquisition des résultats car nos observations sont basées sur la comparaison du marquage observé dans les aires homolatérales à la stimulation à celui des aires controlatérales.

δ - Validité des stimuli choisis

δ1 - Lésions

L'utilisation de substances excitotoxiques pour réaliser des lésions dans le but de modifier l'expression de Fos est intéressante, car elle n'entraîne pas la destruction des fibres de passage (Popovici et coll, 1990). Cependant, il nous a semblé judicieux de réaliser d'abord des lésions électrolytiques de grande étendue. Devant l'absence de variation dans

l'expression de Fos, même avec des temps de survie allant jusqu'à 8 jours, nous n'avons pas jugé utile de poursuivre l'étude avec des substances excitotoxiques.

δ2 -Stimulations

~ Stimulation chimique

Dans nos expériences, la stimulation chimique du SL n'entraîne pas de marquage Fos dans l'aire préoptique et l'hypothalamus. Pourtant, les substances choisies sont reconnues comme ayant une action excitatrice dans la structure. L'absence d'effet peut être attribuée à un temps trop court d'application ou à une concentration inadéquate des substances. Il a été récemment montré que la durée d'exposition à la substance excitatrice représentait un paramètre important dans ce genre d'intervention. Non seulement la durée d'application mais également la persistance de l'effet après l'application sont déterminants (Massamiri et coll, 1994). La manipulation des systèmes neuronaux par l'application ponctuelle de substances excitatrices est hasardeuse car, selon la structure étudiée et la densité et/ou le type de récepteurs présents, l'application d'une dose trop faible peut être inefficace, tout comme l'application d'une dose trop forte peut produire un blocage de l'activité neuronale après une dépolarisation membranaire trop soutenue. Nous avons donc préféré baser notre étude sur la stimulation électrique du SL.

~ Stimulation électrique

D'après Fu et Beckstead (1992), le marquage Fos est maximal 1 heure 45 après la stimulation électrique. Cependant, Dragunow et Faull (1989) et Sugimoto et coll (1993) préfèrent fixer le délai de survie de l'animal à 3 ou 4 heures après la stimulation. Les stimulations électriques que nous avons appliquées dans le SL induisent un marquage dont la répartition et l'intensité sont identiques pour une survie de 2 à 4 heures après le début de la stimulation.

Nous n'avons observé l'induction de l'expression de Fos à la suite d'une stimulation septale que pour une intensité de stimulation au moins égale à 150 μ A. Les paramètres de stimulation efficaces pour induire l'expression de Fos sont très variables d'une région à une autre (Sagar et coll, 1988; Krukoff et coll, 1992). Dragunow et Faull (1989) montrent que, lors de travaux sur des animaux anesthésiés, la stimulation électrique doit être intense pour induire une réponse des neurones. Ceci est en accord avec l'existence d'une intensité-seuil de stimulation. Cependant, d'autres études réalisent des stimulations efficaces, chez l'animal

éveillé, pour des intensités de stimulation plus faibles (Petrov et coll, 1994). Il est concevable que les neurones ne présentent pas la même sensibilité au stimulus appliqué, d'une région à l'autre. Hormis l'intensité du courant de stimulation, les autres paramètres (fréquence, durée) ont été choisis d'après les travaux de Krukoff et coll (1992).

Les stimulations que nous avons appliquées provoquent une lésion au centre du site, qui, en détruisant les corps cellulaires des neurones, pourrait empêcher l'expression de Fos. En fait, la distribution et la densité des neurones exprimant Fos sont comparables, que la stimulation soit centrée dans le SLml, ou qu'elle soit centrée dans le striatum proche du ventricule latéral, alors qu'aucune nécrose n'est produite dans le SLml.

Le marquage Fos induit par la stimulation électrique du SL peut être en partie dû à l'activation d'axones traversant la région stimulée et provenant de neurones d'une autre origine (Silveira et coll, 1994; Goodchild et coll, 1982). Dans notre étude, il faut savoir que le SLml ne constitue pas une voie de passage empruntée par un grand nombre d'axones issus de neurones d'autres régions. En revanche, les neurones du subiculum ventral et de l'amygdale postérieure empruntent la voie du fimbria-fornix et traversent le SLv pour se projeter dans l'aire préoptique et l'hypothalamus, selon une distribution étonnamment comparable à celle des efférences septales (Canteras et Swanson, 1992; Canteras et coll, 1992). Au cours de nos expériences de stimulation, une activation des fibres provenant du subiculum et de l'amygdale ne peut pas être exclue. Cependant, il faut souligner qu'aucune variation du marquage Fos n'est observée dans l'hypothalamus selon que le site englobe le SLml et le SLv, ou ne touche que le SLml (lors d'une stimulation plus dorsale, ou centrée dans le striatum). Il est donc très probable que l'expression de Fos observée soit réellement consécutive à la stimulation des neurones dont les corps cellulaires sont situés dans le SL.

c - Apports neuroanatomiques de l'étude

Il n'est pas surprenant de recenser un marquage Fos dans une région dont on sait qu'elle est anatomiquement (traçage) ou fonctionnellement (électrophysiologie) liée à la région stimulée par une relation monosynaptique. On met ainsi en évidence la capacité de fonctionnement d'une connexion déjà établie.

L'apparition de Fos dans une région qui n'est pas connue pour être la cible directe de la région stimulée est encore plus intéressante, puisqu'elle résulterait d'une activation indirecte par la mise en jeu d'une voie polysynaptique. Il est établi que l'expression de Fos peut se produire à tous les niveaux le long du circuit neuronal, marquant les neurones de deuxième et de troisième ordre (Sagar et coll, 1988; Sandner et coll, 1992).

En conséquence, l'identification de Fos peut être utilisée comme un outil neuroanatomique pour montrer les aires reliées directement ou indirectement à la structure stimulée.

Dans cette étude, à la suite de la stimulation septale, les neurones activés sont observés en majorité dans certaines régions précédemment décrites comme étant les cibles directes du SL. Dans nos expériences associant la stimulation du SL à une injection de traceur, la présence de varicosités septales à proximité de neurones immunoréactifs pour Fos suggère que les efférences septales modulent l'activité des neurones avec lesquels elles sont en contact.

L'aire préoptique antérieure, médiane (antérodorsale et antéroventrale) et postérieure, l'aire hypothalamique antérieure et latérale, l'aire périventriculaire postérieure, la région subparaventriculaire et les régions postérieures (aire hypothalamique postérieure, noyau dorsomédian, régions pré- et supramamillaires) contiennent à la fois des neurones activés après stimulation septale et des fibres issues du SL.

L'utilisation du marqueur d'activité Fos permet ici de renforcer la démonstration neuroanatomique d'une projection directe, monosynaptique, du SL sur toutes ces régions.

Au contraire, l'observation de neurones Fos dans l'aire antéroventrale périventriculaire, le noyau préoptique médian antérieur et surtout le noyau paraventriculaire parvocellulaire, le noyau ventromédian et le noyau arqué, régions qui ne sont pas contactées par les fibres septales, suggère l'existence d'une connexion polysynaptique entre le SL et ces structures, qui en représentent alors les cibles indirectes.

Il faut toutefois émettre une réserve en ce qui concerne les neurones marqués qui ne sont pas innervés par les fibres septales, mais qui sont situés à proximité des régions innervées. Il est possible que l'activation de ces neurones soit consécutive à des contacts entre les axones provenant du SL et les dendrites distales des neurones, qui établiraient dans ce cas une relation directe.

II - Données fonctionnelles sur les efférences septales obtenues à l'aide du marqueur d'activité Fos

In vitro, l'expression de Fos augmente rapidement dans les cellules phéochromocytaires PC12 après une dépolarisation membranaire ou une stimulation par des agonistes cholinergiques (Greenberg et coll, 1986; Morgan et Curran, 1986). *In vivo*, l'application d'agents excitateurs, ou la suppression d'une action inhibitrice par l'utilisation

d'antagonistes du GABA permet d'induire Fos (Curran et coll, 1985; Kruijer et coll, 1985; Cohen et Curran, 1988; Morgan et coll, 1987, Gass et coll, 1992).

L'augmentation du taux de calcium intracellulaire consécutive à la dépolarisation membranaire par l'ouverture des canaux dépendant du potentiel (Sheng et Greenberg, 1990), ou à l'activation de récepteurs glutamatergiques (lors de l'application de NMDA : Dave et Tortella, 1994 ou de kainate : Sonnenberg et coll, 1989) stimule l'expression de Fos.

D'après Luckman et coll (1994), l'entrée de calcium dans la cellule pendant la production des potentiels d'action ne semble pas suffisante pour induire Fos; la sollicitation d'une synapse excitatrice est indispensable.

Toutes ces données représentent un faisceau d'arguments qui laissent supposer que la protéine Fos sera détectée dans un neurone activé par un influx excitateur.

La transduction de cet influx s'effectue par le couplage du calcium entrant à la Calmoduline, entraînant l'activation de kinases calmoduline-dépendantes ou par l'augmentation des taux d'AMPC intracellulaire à la suite de la fixation du neuromédiateur sur son récepteur membranaire. Ces deux voies aboutissent à la phosphorylation de la protéine CREB, facteur de transcription qui contrôle l'expression de *fos* (Vallejo, 1994).

Il est possible également qu'une partie de l'activation neuronale détectée par la mise en évidence de Fos reflète la mise en jeu d'un circuit inhibiteur. En effet, une information synaptique inhibitrice pourrait induire Fos par la voie de l'AMPC, au même titre que certains neuromédiateurs excitateurs. Toutefois, cette hypothèse n'est pas retenue pour le moment car aucun argument expérimental ne permet de l'étayer.

Si la présence de Fos dans un neurone reflète un changement d'activité dont on considère qu'il est dû à l'intervention d'une synapse excitatrice, nous pouvons conclure que les efférences du SLml vers l'aire préoptique et l'hypothalamus sont en grande partie excitatrices. Le circuit excitateur supposé incluerait les efférences directes vers les neurones de premier ordre (voie monosynaptique) et les connexions entre les neurones de premier et de deuxième, voire de troisième ordre (voies polysynaptiques).

Cette interprétation va à l'encontre du schéma proposé par Jakab et Leranthe (1990a), qui suggère que les efférences du SLml, provenant des neurones à épines somatiques, sont principalement GABAergiques. Si tel était le cas, nos expériences de lésions électrolytiques, en détruisant le système GABAergique, auraient dû induire Fos par la levée de l'inhibition produite par le neurotransmetteur inhibiteur. Il est bien connu que l'application *in vivo* d'antagonistes du GABA, comme la bicuculline, déclenche des convulsions par levée d'inhibition et entraîne en conséquence un marquage Fos (Gass et coll, 1992). Or, les expériences de lésion ne provoquent pas de marquage significatif dans les régions innervées

par les fibres septales. En conclusion, le résultat des expériences de stimulation électrique et de lésion électrolytique s'accordent pour suggérer l'existence d'une relation de nature excitatrice entre le SLml et le diencephale.

L'absence de la protéine dans certaines catégories de neurones, dont on sait qu'ils reçoivent les afférences septales doit également être interprétée. Nos résultats montrent que c'est le cas pour l'aire préoptique médiane ventrale, la région dorsale au fornix et au noyau paraventriculaire et au troisième ventricule, qui sont dénués de marquage après stimulation. En premier lieu, ces résultats peuvent refléter l'absence d'activation du neurone. Des neurones capables de produire Fos peuvent ne pas être marqués si le seuil d'induction nécessaire n'est pas atteint lors de la stimulation. L'intensité d'une stimulation électrique, sa fréquence, le nombre de trains d'impulsions et le délai qui les séparent sont autant de facteurs qui favorisent ou non l'expression de Fos selon les régions considérées (Sheng et coll, 1993). En second lieu, l'absence de la protéine pourrait s'expliquer par la nature inhibitrice de la connexion afférente. Toutefois, cette considération est difficilement conciliable avec les résultats obtenus après lésion électrolytique, mais elle ne doit pas être négligée.

III - Examen des projections directes du SL vers les structures neuroendocrines

En raison de l'importance de l'implication du SL dans la modulation de fonctions neuroendocrines, nous avons axé une partie de notre investigation neuroanatomique et fonctionnelle du SL sur des populations neuronales identifiées, à savoir les neurones possédant les récepteurs des hormones stéroïdiennes gonadiques, les neurones magnocellulaires et les neurones hypophysiotropes, en particulier les neurones à LHRH.

A - Neurones possédant les récepteurs de la progestérone

La rétroaction dite positive de l'oestradiol au niveau central provoque la décharge préovulatoire de LH. Cette rétroaction s'exerce sur les neurones possédant les récepteurs intracellulaires des hormones stéroïdiennes gonadiques, qui sont différents des neurones à LHRH (revue dans Fink et coll, 1991).

1 - Considérations méthodologiques

Les récepteurs intracellulaires des hormones stéroïdiennes gonadiques, lorsqu'ils sont détectés par immunocytochimie, sont localisés dans le noyau de la cellule. Des études de plus en plus nombreuses s'attachent à démontrer les connexions efférentes et afférentes des neurones possédant ces récepteurs intranucléaires (Warembourg et Poulain, 1993).

Chez le cobaye, l'aire préoptique et l'hypothalamus médiobasal contiennent de nombreux neurones possédant à la fois les récepteurs de l'oestradiol et de la progestérone, qui sont mis en évidence par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs de la progestérone. Il doit en être de même chez le rat (Warembourg et coll, 1989). L'utilisation de cet anticorps permet donc de localiser les neurones possédant les récepteurs des deux hormones stéroïdiennes gonadiques.

L'étude a été réalisée exclusivement chez le cobaye, car il n'existe pas d'anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs de la progestérone chez le rat, et nous ne disposons pas de l'anticorps anti-récepteurs de l'oestradiol.

2 - Analyse des résultats

Nos résultats, obtenus après marquage des fibres issues du SL par le F-R et détection immunocytochimique des récepteurs de la progestérone, n'indiquent pas l'existence d'une relation directe entre le SL et les populations de neurones sensibles à la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques. Cependant, le SL est fortement impliqué dans la fonction LH. Il est suggéré par nos résultats que cette implication ne s'effectue pas par un contact direct avec les neurones possédant les récepteurs de ces hormones. Cependant, nous avons observé chez le rat que l'aire antéroventrale périventriculaire et l'aire préoptique médiane périventriculaire expriment Fos à la suite d'une stimulation septale. Il est envisageable qu'un des rôles du SL dans la fonction LH s'exerce indirectement par l'activation de neurones (non identifiés) de l'aire préoptique, qui établiraient des connexions avec les neurones sensibles à la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques.

B - Neurones magnocellulaires

1 - Considérations méthodologiques

Dans cette étude, les neurones magnocellulaires ont été mis en évidence chez le cobaye après une injection intracardiaque de G-B ou de F-G. L'identification de ces

neurones après une injection périphérique de traceurs est basée sur les travaux de Broadwell et Brightman (1976), qui, les premiers, démontrent une incorporation de la peroxydase par les terminaisons nerveuses présentes dans les régions dénuées de barrière hémato-encéphalique, dont l'hypophyse postérieure, où aboutissent les axones des noyaux magnocellulaires.

L'application de G-B (Poulain et coll, 1990; Warembourg et Poulain, 1991) et de F-G (Merchenthaler, 1990, 1991; Merchenthaler et Lennard, 1991) par voie périphérique permet de marquer les neurones magnocellulaires avec autant d'efficacité que la peroxydase. Nous avons choisi de réaliser ces injections par voie intracardiaque car la quantité de traceur nécessaire pour produire un marquage suffisamment intense des neurones dans le diencephale est plus faible que celle requise lors d'injections intrapéritonéales. Les injections intracardiaques sont préférables aux injections intrajugulaires : elles sont plus faciles à réaliser, reproductibles, et ne provoquent que rarement la mort des animaux.

2- Analyse des résultats

La distribution des neurones magnocellulaires recensés dans notre étude est superposable à celle des neurones à ocytocine et à vasopressine, dont la topographie a été décrite chez le cobaye par les études de Dubois-Dauphin et coll (1989a, 1989b).

Les observations réalisées au cours de ce travail nous permettent de démontrer l'existence d'une relation directe entre des neurones du SL et les populations magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Cependant, cette relation n'intéresse qu'une faible population de neurones situés à la limite externe des masses magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires.

Ces données sont en accord avec les travaux de Staiger et Nürnberger (1991a), également réalisés chez le cobaye, qui mettent en évidence une relation directe, peu fréquente, entre les efférences septales et les corps cellulaires de neurones à ocytocine et à vasopressine, identifiés par immunocytochimie, des noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Elles confirment également les travaux plus anciens de Oldfield et coll (1985) et Silverman et Oldfield (1984).

En revanche, nous avons montré que les efférences septales sont essentiellement distribuées dans la périphérie de ces noyaux hypothalamiques, et en particulier dans la région immédiatement dorsale au noyau supraoptique, et la région subparaventriculaire, ventrale au noyau paraventriculaire.

Il est bien connu que le SL exerce une influence sur la libération d'ocytocine et de vasopressine, par une modulation de l'activité des neurones magnocellulaires. Nos résultats

montrent que la projection directe du SL sur les noyaux contenant ces neurones n'est pas massive. Au contraire, l'importante innervation septale que nous avons détaillée dans la périphérie des noyaux supraoptique et paraventriculaire pourrait être importante dans le contrôle septal des neurones magnocellulaires. En effet, les prolongements dendritiques de ces neurones s'étendent en dehors des limites du noyau (noyau supraoptique : Felton et Cashner, 1979; noyau paraventriculaire : Armstrong et coll, 1980; Van den Pol, 1982). Ils pourraient être ainsi contactés directement par les terminaisons septales. D'une autre façon, ils pourraient être modulés indirectement par les efférences septales, par le biais d'interneurones dont les corps cellulaires seraient situés dans les régions bordant les noyaux. Il a récemment été démontré que des interneurones GABAergiques étaient présents dans ces régions, dont la sollicitation influençait directement l'activité des neurones magnocellulaires (Wuarin et Dudek, 1994). Cette hypothèse est confortée par la démonstration de l'expression de la protéine Fos après stimulation septale dans les neurones situés en périphérie des noyaux supraoptique et paraventriculaire, en particulier dans les régions dorsochiasmatiche et subparaventriculaire.

Il est connu que les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires montrent un fonctionnement synchrone au cours du réflexe d'éjection du lait (Belin et coll, 1984). Le corrélat anatomique de la communication entre ces noyaux est recherché par de nombreuses équipes. Ainsi, Thellier et coll (1994) ont récemment montré que ces noyaux sont en relation, bilatérale et réciproque, avec la région dorsochiasmatiche, qui constituerait le centre synchronisateur du fonctionnement des neurones magnocellulaires, tout en étant sous l'influence modulatrice du SLv. Nos observations convergentes de l'innervation septale et de l'expression de la protéine Fos dans la région dorsochiasmatiche après stimulation électrique, s'ajoutant au marquage viral observé à la fois dans la même région et dans les quatre noyaux magnocellulaires, étaient l'existence d'une interconnexion entre des centres qui pourraient agir en synergie au cours du réflexe d'éjection du lait.

C - Neurones hypophysiotropes

1 - Considérations méthodologiques

Les corps cellulaires des neurones hypophysiotropes ont été marqués chez le cobaye à la suite de l'incorporation du F-G ou du G-B par leur terminaisons au niveau des capillaires du plexus-porte de l'éminence médiane, après que ces traceurs aient été injectés par voie intracardiaque. Cette méthode avait déjà été utilisée avec le G-B (Poulain et coll, 1990) et le F-G (Merchenthaler, 1990, 1991; Merchenthaler et Lennard, 1991). Elle

remplace avantageusement l'application stéréotaxique de traceur par une approche dorsale de l'éminence médiane, ou par voie rétropharyngée (Wiegand et Price, 1980; Lechan et coll, 1982; Kawano et Daikoku, 1987; Silverman et coll, 1987; Merchenthaler et coll, 1989). L'anatomie particulière de la cavité buccale chez le cobaye rend cette dernière approche particulièrement difficile.

2 - Analyse des résultats

Les neurones hypophysiotropes marqués sont principalement présents dans l'aire préoptique médiane, le noyau paraventriculaire parvocellulaire, l'aire hypothalamique périventriculaire et le noyau arqué.

Sachant que les traceurs ont été véhiculé dans la circulation générale, un petit nombre de neurones parvocellulaires marqués pourraient correspondre à des neurones qui se terminent dans des organes circumventriculaires différents de l'éminence médiane. Ce pourrait être le cas des neurones à LHRH, dont les terminaisons autour de l'organe vasculaire de la lame terminale sont nombreuses (Barry et coll, 1973). Cependant, le nombre total des neurones se projetant dans l'organe vasculaire de la lame terminale est faible, comparé au nombre total de neurones hypophysiotropes (Weindl et Sofroniew, 1981; Merchenthaler et coll, 1989). En fait, seuls quelques neurones de l'aire préoptique et de l'hypothalamus se terminent au niveau des organes circumventriculaires autres que l'éminence médiane (Miselis et coll, 1987), et la plupart des neurones parvocellulaires observés au cours de notre étude peuvent être assimilés à des neurones hypophysiotropes.

L'apport majeur de cette étude est fourni par l'observation de la co-distribution des efférences septales et des populations hypophysiotropes dans l'aire préoptique et l'aire hypothalamique périventriculaire. En particulier, les nombreuses juxtapositions relevées entre les fibres septales et les corps cellulaires de neurones hypophysiotropes de l'aire préoptique, de l'aire hypothalamique périventriculaire, du noyau paraventriculaire parvocellulaire et du noyau arqué fournissent le substrat anatomique permettant d'étayer l'existence d'une relation directe du SL sur ces populations de neurones.

Au passage, il faut souligner que le nombre des juxtapositions relevées entre les efférences septales et les corps cellulaires des neurones hypophysiotropes est inévitablement sous-estimé, parce que le marquage rétrograde ne permet pas de visualiser l'arborisation dendritique de ces neurones; seules les juxtapositions axo-somatiques, par opposition aux juxtapositions axo-dendritiques, sont visibles. Dans cette optique, il est probable que des neurones hypophysiotropes du noyau arqué puissent recevoir des afférences septales par des

contacts axo-dendritiques s'effectuant dans sa périphérie, pour laquelle il a été noté une abondance particulière de fibres provenant du SL.

A travers cette étude, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'un contrôle direct du SL sur les populations hypophysiotropes, sans en considérer le contenu peptidergique.

Cependant, les neurones de l'aire préoptique et de l'aire hypothalamique périvericulaire contactés par les efférences septales pourraient être, respectivement, des neurones à LHRH et à somatostatine, dont on sait qu'ils sont présents dans ces régions chez le rat (Kawano et Daikoku, 1988; Merchenthaler et coll, 1989). Le cas des neurones à LHRH sera considéré dans le paragraphe suivant. Les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire observés à proximité des fibres septales seraient des neurones à CRF (Kawano et coll, 1988) et à TRH (Kawano et coll, 1991), dont la distribution a également été établie chez le rat.

Le noyau arqué contient diverses populations de neurones hypophysiotropes. La plupart sont de nature dopaminergique (Kawano et Daikoku, 1987), une partie d'entre eux inhibent la libération de prolactine, ou contiennent le facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF :). Certains neurones pourraient contenir de la substance-P (Tsuruo et coll, 1983), ou encore de la neurotensine (Merchenthaler et Lennard, 1991).

Nos observations, en suggérant l'influence directe du SL sur diverses populations hypophysiotropes, aident à comprendre l'implication bien connue de la structure sur des fonctions neuroendocrines aussi diverses que celles qui dépendent des hormones hypophysaires LH, GH, ACTH et prolactine.

D - Neurones à LHRH

Nous avons porté une attention particulière à la projection que pourraient recevoir du SL les neurones à LHRH, compte-tenu du rôle reconnu du SL dans la fonction LH et de l'observation, chez le cobaye, de contacts entre les efférences septales et les neurones hypophysiotropes de l'aire préoptique, qui contient une forte population de neurones à LHRH, chez le cobaye et chez le rat.

1 - Considérations méthodologiques

Pour cette étude menée chez le rat, nous avons choisi de révéler les efférences septales par la DAB et les corps cellulaires contenant la LHRH par une méthode

d'immunocytochimie en fluorescence afin de ne pas introduire à l'observation une confusion entre les fibres provenant du SL et les fibres à LHRH, dont on sait qu'elles établissent des contacts locaux avec les corps cellulaires à LHRH. Bien que le nombre de contacts entre les terminaisons septales et les neurones à LHRH soit élevé, il est indiscutablement sous-estimé, car les contacts sont fréquemment observés au niveau de l'arborisation dendritique, qui n'est pas visible dans son intégralité.

2 - Analyse des résultats

Cette étude démontre qu'une importante population de neurones à LHRH reçoit les projections directes du SL. Bien qu'un grand nombre des afférences aux neurones à LHRH soit identifiés (Halasz, 1993), une seule étude jusqu'à présent avait pu établir l'origine précise d'une de ces afférences, en l'occurrence le NSC (Van der Beck, 1993).

L'importance quantitative de la relation découverte dans cette étude indique de toute évidence que le SL exerce une action directe sur les neurones à LHRH et que, par ce biais, il peut être impliqué dans la libération de LH.

Classiquement, l'intervention de l'axe hippocampo-septal dans la modulation de LH est considérée comme étant de nature inhibitrice (Velasco et Talesnik, 1969). Si l'on considère dans cet axe que le maillon septo-diencéphalique est représenté par les neurones GABAergiques (Jakab et Leranth, 1990a), il est envisageable que les afférences septales trouvées au contact des neurones à LHRH représentent le substrat anatomique de cette intervention inhibitrice. Cette suggestion est tout-à-fait en accord avec l'absence d'expression de la protéine Fos que nous avons montrée dans les neurones à LHRH après une stimulation septale.

CONCLUSION

CONCLUSION

Cette étude s'intègre dans une tentative de réévaluation des connexions du septum. Jusqu'à une époque récente, le SL était considéré comme une structure assurant le relais entre la formation hippocampique et le septum médian. Comme l'hippocampe est la principale efférence fonctionnelle de ce dernier, les fonctions du SL se résumaient à une intervention dans une boucle hippocampo-septo-hippocampique. Ce schéma était difficilement conciliable avec les rôles bien établis du SL, qui apparaît comme une structure-clé pour le traitement des stimuli sensoriels destinés à l'hypothalamus. Son rôle principal est d'imprimer une composante émotionnelle à certains mécanismes neuroendocrines, dont ceux de la reproduction. Il est également impliqué dans un éventail de processus physiologiques et comportementaux à l'interface entre le système endocrine et le système autonome.

Malgré l'intérêt croissant que suscitait le SL, les connaissances neuroanatomiques restaient sommaires. Les résultats apportés par la présente étude font le point sur l'importance des projections qu'établit le SL, en particulier le SLml, avec le diencephale. Ils ont été basés sur les techniques les plus récentes de traçage axonal, pour en démontrer les projections directes, et ont utilisé des techniques de marquage polysynaptique pour apporter les premières données sur les projections indirectes, qui mettent en jeu une chaîne de neurones connectés. Ces résultats vont dans le sens d'une nouvelle conception des connexions septales, qui minimise la projection du SL vers le septum médian (Witter et coll, 1992; Leranth et coll, 1992), tout en affirmant que les structures diencephaliques représentent la principale efférence du SL.

D'un point de vue fonctionnel, l'existence d'une forte projection directe du SLml vers le diencephale est intéressante à double titre :

Le SLml reçoit les projections glutamatergiques, donc excitatrices, de l'hippocampe. Si l'on considère que la projection du SLml vers le diencephale est assurée par des neurones GABAergiques, selon le schéma proposé par Jakab et Leranth (1995), l'effet principalement inhibiteur de l'hippocampe sur plusieurs fonctions gérées par le diencephale, principalement la fonction LH, peut se comprendre aisément.

Le SLml contient les neurones-cibles du tractus enképhalinergique originaire de l'hypothalamus. Les neurones du SLml sont sensibles aux actions inhibitrices spécifiques des enképhalines, qui agissent par des récepteurs spécifiques (Carette et Poulain, 1982). Le

tractus enképhalinergique représente vraisemblablement un élément frein dans la transmission des influences excitatrices de l'hippocampe vers le diencephale. De la même manière, les multiples afférences qui caractérisent les neurones du SLml vont jouer pour moduler l'information hippocampique. Cela montre que le SLml doit servir non seulement à relayer les informations hippocampiques vers le diencephale, mais aussi à les intégrer de manière très complexe à d'autres influences provenant de différentes régions du cerveau. Il apparaît dans ce cas très difficile de traduire selon un schéma simple la potentialité fonctionnelle des projections du SLml.

Un des apports de ce travail est d'avoir démontré que le système hippocampo-septal est en prise directe avec les éléments neurosécréteurs de la glande diencephalique, représentés par les neurones magnocellulaires et les neurones hypophysiotropes. En particulier, il apporte la démonstration d'une forte connexion avec le système à LHRH. Au contraire, il ne met pas en évidence de rapports directs avec les neurones sensibles à la rétroaction des hormones stéroïdiennes gonadiques.

Il est reconnu que tout l'axe neuroendocrine est soumis à une influence inhibitrice qui se manifeste par l'abondance des terminaisons GABAergiques trouvées au contact des neurones magnocellulaires et hypophysiotropes (voir Wuarin et Dudek, 1994). L'hypothèse du caractère GABAergique de la projection septale laisse penser qu'une partie de l'innervation inhibitrice des éléments neuroendocrines provienne du SLml. Au contraire, nos résultats obtenus avec le marqueur d'activité Fos suggèrent que la projection septale est principalement excitatrice, hormis celle qui intéresse le système à LHRH. Cela ne s'oppose pas au fait que l'axe hippocampo-septal puisse exercer une influence inhibitrice sur les populations neuroendocrines par l'intermédiaire du GABA, si l'on considère que l'activation de cet axe retentit sur des interneurons GABAergiques qui effectuent des contacts locaux avec les éléments neurosécréteurs. A cet égard, nos résultats insistent sur l'abondance des terminaisons septales présentes en périphérie des noyaux contenant les populations neuroendocrines.

Si l'on considère maintenant les conséquences fonctionnelles de l'intervention du tractus enképhalinergique hypothalamo-septal, le rôle exercé par les enképhalines dans le SLml peut être important dans le contrôle des fonctions neuroendocrines. Par exemple, il existe un maillon opiacé dans l'influence inhibitrice qu'exerce l'hippocampe sur la libération de LH, qui n'est pas localisé dans l'hippocampe lui-même (Endo et coll, 1990). L'injection d'enképhalines ou de leur antagoniste, la naloxone, dans le SL, modifie les sécrétions de LH et de GH (Halasz et coll, 1989). Les résultats de notre étude laissent supposer qu'une partie de l'action inhibitrice des enképhalines dans le SLml serait relayée vers les structures neuroendocrines au sein desquelles elle pourrait influencer les sécrétions hypophysaires.

De manière moins argumentée, les projections du SL mises en évidence dans ce travail peuvent être reliées à certaines autres fonctions auxquelles la structure participe, en considérant les rôles attribués aux noyaux atteints par ces projections. De la sorte, l'innervation massive de la région subparaventriculaire peut être reliée au rythme circadien, en sachant que la région est la principale efférence des noyaux suprachiasmatiques (Watts et coll, 1987). L'innervation de l'aire hypothalamique latérale pourrait être mise en rapport avec le contrôle de la prise alimentaire (Barone et coll, 1981). Des arguments en faveur de l'intervention du SL dans le contrôle de la lordose peuvent être apportés par la démonstration d'une activation des neurones des noyaux ventromédians après stimulation septale. Enfin, l'innervation de l'aire préoptique et de l'aire hypothalamique antérieure, ainsi que l'activation des neurones de ces régions après stimulation septale peuvent être rapprochées du contrôle exercé par le SL sur le comportement sexuel mâle.

En conclusion, par la démonstration descriptive et fonctionnelle de l'importance des relations, principalement directes, que le SL entretient avec le diencephale, ce travail montre que le SL, directement dépendant de l'expérience émotionnelle par ses rapports avec l'hippocampe, peut être étroitement relié à l'état fonctionnel de l'hypothalamus, non seulement en ce qui concerne l'axe neuroendocrine, mais aussi en relation avec des fonctions très diverses, principalement des fonctions comportementales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abate C., Luk D. et Curran T. (1991). Transcriptional regulation by Fos and Jun *in vitro*: Interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.*, 11 : 3624-3632.
- Adamkiewicz J., Brüller H.J., Gausepohl H., Franck R. et Müller R. (1990). Mapping of functional domains in Fos and Jun proteins using epitope-specific antibodies. *Oncogene*, 5 : 525-533.
- Albert D.J. et Richmond D.S.E. (1976). Hyper-reactivity and aggressiveness following infusion of local anesthetic into the lateral septum or surrounding structures. *Behav. Bio.*, 18 : 211-226.
- Allen Y.S., Adrian T.E., Allen J.M., Tatemoto K., Crow T.J., Bloom S.R., et Polak J.M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 221 : 877-879.
- Alonso A. et Köhler C. (1984). A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 225 : 327-343.
- Anderson W.A., Bruni J.E., Kaufman A. (1990). Afferent connections of the rat's supraoptic nucleus. *Brain Res.*, 24 : 191-200.
- Andy O.J., Stephan H. (1959). The nuclear configuration of the septum of the Galago demidorii. *J. Comp. Neurol.*, 111 : 503-545.
- Apkarian A.V. et Hodge C.J. (1989). The primate spinothalamic pathways. III. Thalamic terminations of the dorsolateral and ventrolateral spinothalamic pathways. *J. Comp. Neurol.*, 288 : 493-511.
- Armstrong W.E., Warach S., Hatton G.J. et McNeill T.M. (1980). Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus : a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neurosci.*, 5 : 1931-1958.
- Astic L., Saucier D., Coulon P., Lafay F. et Flamand A. (1993). The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. *Brain Res.*, 619 : 146-156.
- Azmitia E.C. et Segal M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 179 : 641-668.
- Baimbridge K.G., Miller J.J. et Parkes C.O. (1982). Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res.*, 239 : 519-525
- Barnett E.M., Cassel M.D. et Perlman S. (1993). Two neurotropic viruses, herpes simplex virus type 1 and mouse hepatitis virus, spread along different neural pathways from the main olfactory Bulb. *Neurosci.*, 57 (4) : 1007-1025.
- Barone F.C., Wayner M.J., Scharoun S.L., Guevara-Aguilar R. et Aguilar-Baturoni U. (1981). Afferent connections to the lateral hypothalamus: A horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 7 : 75-88.
- Barry J., Dubois M.P. et Poulain P. (1973). LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. *Z. Zelforsch.*, 146 : 351-366.
- Beauvillain J.C., Mitchell V., Tramu G., Mazzuca M. (1991). GABA and enkephalin in the lateral septum of the guinea pig : light and electron microscopic evidence for interrelation. *J. Comp. Neurol.*, 308 : 103-114.

- Beauvillain J.C., Tramu G., Poulain P. (1982). Enkephalin-immunoreactive neurons in the guinea pig hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 224 : 1-13.
- Belin V., Moos F., Richard P.H. (1984). Synchronization of oxytocin cells in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei in suckled rats: direct proof with paired extracellular recordings. *Exp. Brain Res.*, 57 : 201-203.
- Bennett-Clarke C., Romagnano M.A. et Joseph S.A. (1980). Distribution of the somatostatin in the rat brain: Telencephalon and diencephalon. *Brain Res.*, 188 : 473-486.
- Berk M.L. et Finkelstein J.A. (1981). Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neurosci.*, 6 : 1601-1624.
- Björklund A., Lindvall O. et Nobin A. (1975) Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Res.*, 89 : 29-42.
- Blanchard D.C., Blanchard R.J., Takahashi T. (1977). Septal lesions and aggressive behavior. *Behav. Biol.*, 21 : 157-161.
- Blaustein J. et Turcotte J. (1989). Estradiol-induced progesterin receptor immunoreactivity is found only in estrogen receptor-immunoreactive cells in guinea pig brain. *Neuroendocrinol.*, 49 : 454-461.
- Bleier. R. (1983). The hypothalamus of the guinea-pig. A cytoarchitectonic atlas. The University of Wisconsin Press : 30
- Blume H.W., Pittman Q.J., Lafontaine S. et Renaud L.P. (1982). Lateral septum-medial hypothalamic connections : an electrophysiological study in the rat. *Neurosci.*, 7 : 2783-2792.
- Borer K.T. , Kelch R.P., White M.P., Dolson L. et Kuhns L.R. (1977). The role of the septal area in the neuroendocrine control of growth in the adult golden hamster. *Neuroendocrinol.*, 23 : 133-150.
- Brandt H.M. et Apkarian A.V. (1992). Biotin-dextran : a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J. Neurosci. Meth.*, 45 : 35-40
- Broadwell R.D. et Brightman M.W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous system from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp Neurol.*, 166 : 257-284.
- Brück K., Zeisberger E. (1987). Adaptative changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis. *Pharmacol. Ther.*, 35 : 163-215.
- Brutus M., Shaikh M.B., Siegel H.E., Siegel A. (1984). An analysis of the mechanisms underlying septal area control of hypothalamically elicited aggression in the cat. *Brain. Res.* 310 : 235-248.
- Bullit E. (1989). Induction of c-Fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. *Brain Res.*, 493 : 391-397.
- Bullit E., Lee C.L., Light A.R. et Willcockson H. (1992). The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-Fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res.*, 580 : 172-179
- Caffé A.R., Van Leeuwen F.W. et Luiten P.G.M. (1987). Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and the ventral hippocampus. *J. Comp.Neurol.*, 261 : 237-252.
- Calaresu F.R., Ciriello J., Mogenson G.J. (1976). Identification of pathways mediation cardiovascular responses elicited by stimulation of the septum in the rat. *J. Physiol. (lond.)* 260 : 515-530.
- Canteras N.S. et Swanson L.W. (1992) Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus : a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 324 : 180-194.

- Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 324 : 143-179.
- Card J.P., Rinaman L., Lynn R.B., Lee B.H., Meade R.P., Miselis R.R. et Enquist L.W. (1993). Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system : Ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J. Neurosci.* 13(6) : 2515-2539.
- Card J.P., Rinaman L., Schwaber J.S., Miselis R.R., Whealy M.E., Robbins A.K. et Enquist L.W. (1990) Neurotropic properties of pseudorabies virus : Uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *Neurosci.*, 10(6) : 1974-1994.
- Carette B. et Poulain P. (1982). Postsynaptic inhibitory effects of Met-and Leu-enkephalin on endocrine and adjacent neurons in the preoptic-septal region of guinea pig. *Regul. Peptides*, 3 : 125-133.
- Carnes K.M., Fuller T.A. et Price J.L. (1990). Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 234 : 824-852.
- Carreras A., Mendoza C., Ortega E. et Ruiz E. (1987). Testosterone implants into the lateral septum of male rats, a positive effect on LH and FSH secretion. *Brain Res. Bull.*, 19 : 149-151.
- Carreras A., Robles R., Ruiz E., Ortega E., Mendoza C. et Osorio C. (1984). Role of septum on LH, FSH and prolactin secretion in male rats. *Brain Res. Bull.*, 13 : 339-342.
- Ceccatelli S., Villar M.J., Golstein M. et Hökfelt T. (1989). Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9569-9573
- Celio M.R. (1990). Calbindin D-28K and parvalbumin in the rat nervous system. *Neurosci.*, 35 : 375-475.
- Chahl L.A., Miller R., Leah J.D., Lynch A.M. et Trueman L.P. (1993). Effect of morphine withdrawal on Fos-like immunoreactivity in the ventral tegmental area of the guinea-pig brain.
- Chiba T. et Murata Y. (1985). Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: A WGA-HRP study. *Brain Res. Bull.*, 14 : 261-272.
- Cirino M. et Renaud L.P. (1985). Influence of the lateral septum and amygdala stimulation on the excitability of hypothalamic supraoptic neurons. An electrophysiological study in the rat. *Brain Res.*, 326 : 357-361.
- Cohen D. R. et Curran T. (1988). Fra-1 : A serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol. Cell Biol.*, 8 : 2063-2069.
- Cohen D.R., Ferreira P.C.P., Gentz R., Eranza B.R. et Curran T. (1989). The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun : transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.*, 3 : 173-184.
- Colwell C.S., Kaufman C.M., Menaker M. et Ralph M.R. (1993). Light-induced phase shifts and fos expression in the hamster circadian system : The effects of anesthetics. *J. of Biological Rhythms*, 8 : 179-188
- Compaan J.C., Buijs R.M., Pool C.W., De Ruiter A.J.H., Koolhaas J.M. (1993). Differential lateral septal vasopressin innervation in aggressive and non aggressive male mice. *Brain Res. Bull.*, 30 : 1-6.
- Conrad L.C.A. et Pfaff D.W. (1976a). Efferents from the medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.*, 169 : 185-220.
- Conrad L.C.A. et Pfaff D.W. (1976b). Efferents from the medial basal forebrain and hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 169 : 221-262.
- Cooper K.E. (1987). The neurobiology of fever : thoughts on recent developments. *Ann. Rev Neurosci.*, 10 : 297-324.

- Costa E., Panula P., Thompson H.K. et Cheney D.L. (1983). The transynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci.*, 32 : 165-179.
- Cuello A.C. et Kanazawa I. (1978). The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 178 : 129-156.
- Cullinan W.E. et Zaborszky L. (1991). Organization of ascending hypothalamic projections to the rostral forebrain with special reference to the innervation of cholinergic projection neurons. *J. Comp. Neurol.*, 306 : 631-667.
- Cullinan W.E., Herman J.P., Battaglia D.F., Akil H. et Watson S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neurosci.*, 64 (2) : 477-505.
- Curran T. et Morgan J.I. (1987). Memories of fos. *BioEssays*, 7 : 255-258.
- Curran T., Van Beveren C., Ling N. et Verma I.M. (1985). Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39,000 dalton cellular protein. *Mol. Cell Biol.*, 5 : 167-172.
- Dantzer R., Koob G.F., Bluthé R.M. et Le Moal M. (1988). Septal vasopressin modulates social memory in male rats. *Brain Res.*, 457 : 143-147.
- Daval J.L., Nakajima T., Gleiter C.H. et al. (1989). *J. Neurochem.*, 52 : 1954-1957.
- Dave J.R. et Tortella F.C. (1994). Regional changes in c-Fos mRNA in rat brain after i.v. or i.c.v. NMDA injections. *Neuroreport*, 5 : 1645-1648.
- De Olmos J.S. et Carnes H. (1978). A horseradish peroxidase study of the afferent connections of the medial basal hypothalamus in the rat. *Anat. Rec.*, 190 : 380.
- De Olmos J. et Heimer L. (1977). Mapping of collateral projections with the HRP method. *Neurosci.lett.*, 6 : 107
- De Vries G.J. (1990). Sex differences in neurotransmitter systems. *J. Neuroendocrinol.*, 2 : 1-13.
- De Vries G.J. et Buijs R.M. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res.* 273 : 307-317.
- De Vries G.J., Buijs R.M., Van Leeuwen F.W., Caffé A.R., Swaab D.F. (1985). The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *J. Comp. Neurol.*, 233 : 236-254.
- Dehal N.S., Debakan G.A., Krassioukov A.V., Picard F.J. et Weaver L.C. (1993). Identification of renal sympathetic preganglionic neurons in hamsters using transsynaptic transport of herpes simplex type 1 virus. *Neurosci.*, 56 (1) : 227-240.
- DeWield D., Gaffori O., Burbach J.P., Kovacs G.L. et Van Ree J.M. (1987). Structure-activity relationship studies with C-terminal fragments of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviors of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241 : 268-274.
- DeWield D., Van Wimersma Greidanus T.B., Bohus B., Urban I. et Gispen W.H. (1976). Vasopressin and memory consolidation. *Prog. Brain Res.*, 181-191.
- Disturnal J.E., Veale W.L. et Pittman Q.J. (1985). Electrophysiological analysis of potential arginine vasopressin projections to the ventral septal area of the rat. *Brain Res.*, 342 : 162-167.
- Dix R.D., Mc Kendall R.R. et Baringer J.R. (1983). Comparative neurovirulence of herpes simplex virus type 1 stains after peripheral or intercerebral inoculation of BALB/c mice. *Infect. Immun.*, 40 : 103-112.

- DonCarlos L.L, Monroy E. et Morrell J.I. (1991). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of the female guinea pig. *J. Comp. Neurol.*, 305 : 591-612.
- Doutrelant O., Ciofi P., Poulain P. (1993a). CaBP-D28K and NADPH-diaphorase coexistence in the guinea pig lateral septum. 23th Annual Meeting of the Neuroscience, Washington, November 7-12 (Abstract 589-16).
- Doutrelant O., Poulain P., Carette B. (1993b). Comparative distribution of calbindin and met-enkephalin immunoreactivities in guinea pig lateral septum, with reference to electrophysiologically characterized neurons in the mediolateral part. *Brain Res.*, 615 : 335-341.
- Dragunow M. et Faull R. (1989). The use of c-Fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Meth.*, 29 : 261-265.
- Dragunow M., Goulding M., Faull R., Ralph R., Mee E. et Frith R. (1990). Induction of the c-fos mRNA and protein in neurons and glia after traumatic brain injury : pharmacological characterization. *Exp. Neurol.*, 107 : 236-284.
- Drugan R.C., Skolnick P., Paul S.M. et Crowley J.M. (1986). Low doses of muscimol produce anticonflict actions in the lateral septum of the rat. *Neuropharmacology*, 25 : 203-205.
- Dubois-Dauphin M., Tribollet E. et Dreifuss J.J. (1989a). Distribution of neurohypophysial peptides in the guinea-pig brain. I. An immunocytochemical study of vasopressin-related glycopeptide. *Brain Res.*, 496 : 45-65.
- Dubois-Dauphin M., Tribollet E. et Dreifuss J.J. (1989b). Distribution of neurohypophysial peptides in the guinea pig brain. II. An immunocytochemical study of oxytocin. *Brain Res.*, 496 : 66-81.
- Dunn J. (1987). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.*, 407 : 327-331.
- Endo Y., Jinna K. et Kimura F. (1990). The roles of endogenous opioids in the inhibitory action of the hippocampus on preovulatory secretion of luteinizing hormone in rats. *Endocrinol., (Japan)* 37 : 535-543.
- Endrőczy E. et Lissak K. (1963). Effect of hypothalamic and brain stem structure stimulation on pituitary-adrenocortical function. *Acta Physiol. hung.*, 24 : 67-77.
- Evinger C. et Ericksen J.T. (1986). *Brain Res.*, 380 : 383-388.
- Fallon J.H. et Moore R.Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. The topography of the dopamine innervation to basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.*, 189 : 545-580.
- Fahrbach S.E., Morrell J.I. et Pfaff D.W. (1989). Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp. Brain Res.*, 77 : 221-233.
- Felton D.L. et Cashner K.A. (1979). Cytoarchitecture of the supraoptic nucleus. *Neuroendocrinol.*, 29 : 221-230.
- Ferreyra H., Kannan H. et Koizumi K. (1983). Influences of the limbic system on hypothalamo-neurohypophysial neurons. *Brain Res.*, 264 : 31-45.
- Ferris C.F., Delville Y., Grzonka Z., Luber-Narod J. et Insel T.R. (1993). An iodinated vasopressin (V1) antagonist blocks flank marking and selectively labels neural binding sites in golden hamsters. *Physiol. and Behav.*, 54 : 737-747.
- Ferris C.F., Gold L. De Vries, G.J. et Potegal M. (1990). Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behavior in golden hamsters. *J. Comp. Neurol.*, 293 : 476-485.

- Fink G., Rosie R. et Thomson E. (1991). Steroid actions on hypothalamic neurons with special reference to estrogen control of luteinizing hormone-releasing hormone biosynthesis and release. In: K. Fuxe et L.F. Agnati (Ed.), Volume transmission in the brain: Novel mechanisms for neural transmission. Raven Press, Ltd., New York, pp. 195-211.
- Finley J.C.W., Maderdrut J.L., Petrusz P. (1981a). The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 198 : 541-565.
- Finley J.C.W., Maderdrut J.L., Roger L.J., et Petrusz P. (1981b). The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neurosci.*, 6 : 2173-2192.
- Floody O.R. (1993). Cuts between the septum and preoptic area increase ultrasound production, lordosis, and body weight in female hamsters. *Physiol. And Behav.*, 54 : 383-392.
- Franza B.R., Rauscher F.J., Josephs S.F. et Curran T. (1988). The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*, 239 : 1150-1153.
- Fu L. et Beckstead R.M. (1992). Cortical stimulation induces Fos expression in striatal neurons. *Neurosci.*, 46 (2) : 329-334.
- Fuxe K. (1965). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. The distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.*, 64 (Suppl.247) 39-85.
- Gall C. et Moore R.Y. (1984). Distribution of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase, and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. *J. Comp.Neurol.*, 225 : 212-227.
- Garcia R. et Jaffard R. (1992). The hippocampo-septal projection in mice : long-term potentiation in the lateral septum. *Neuroreport*, 3 : 193-196.
- Garris D.R. (1979). Direct septo-hypothalamic projections in the rat. *Neurosci. Lett.*, 13 : 83-90.
- Gass P., Herdegen T., Bravo R. et Kiessling M; (1992). Induction of immediate early gene encoded proteins in the rat hippocampus after bicuculline-induced seizures : differential expression of Krox-24, Fos and Jun proteins. *Neurosci.*, 48 : 315-324.
- Gerfen C.R. et Sawchenko P.E. (1984). An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals : Immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *Brain Res.*, 290 : 219-238.
- Goodchild A.K., Dampney R.A.L., et Bandler R. (1982). A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J. Neurosci. Methods*, 6 : 351-363.
- Goodpasture E.W. et Teague O. (1923). Transmission of the virus of herpes fibrils along nerves in experimentally infected rabbits. *J. Med. Res.*, 44 : 139-184.
- Gordon F.J. et Johnson A.K. (1981). Electrical stimulation of the septal area in the rat: Prolonged suppression of water intake and correlation with self-stimulation. *Brain Res.* 206 : 421-430.
- Greenberg M.E., Ziff E.B. et Green L.A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, 234 : 80-83.
- Groenewegen H.J. et Wouterlood F.G. (1990). Light and electron microscopic tracing of neuronal connections with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L), and combinations with other neuroanatomical techniques. In : Bjorklund A., Hokfelt T., Venterload F.G. and Van Den Pol A.N. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol.8, Analysis of neuronal microcircuits and synaptic interactions*, Elsevier, Amsterdam, : 47-124.

- Groenewegen H.J., Ahlenius S., Haber S.N., Kowall W. et Nauta W.J.H. (1986). Cytoarchitecture, fiber connections, and somahistochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 249 : 65-102.
- Gulyas A.I., Seress L., Toth K., Acsady L., Antal M. et Freund T.F. (1991). Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey. *Neurosci.*, 41 : 381-390.
- Hagino N., Kosaras B. et Flerko B. (1977). Septal projection to the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Acta.biol. Sci. Hung.*, 28 : 235-243.
- Hallanger A.E. et Wainer B.H. (1988). Ascending projections from the pedunculopontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 274 : 483-515.
- Halasz B. (1993). Immunocytochemically identified afferent connections of hypophysiotrophic neurons. *Neuroendocrinol. Lett.*, 1 : 49-64.
- Halasz B., Kiss J. et Molnar J. (1989). Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system : morphological aspects. *J. Steroid. Biochem.*, 33 : 663-668.
- Heizmann C.W. et Celio M.R. (1987). Immunolocalization of parvalbumin. *Methods Enzymol.*, 139 : 552-570.
- Hendrickson A. et Edwards S.B. (1978). The use of axonal transport for autoradiographic tracing of pathways in the central nervous system. In : Robertson R.T. (Ed.), *Methods in Physiological Psychology*, Vol 2, (Ed.), *Neuroanatomical Research Techniques*, Academic, New York, 241-290
- Herkenham M. (1978). The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 177 : 589-610.
- Herman J.P., Cullinam W.E., Young E.A., Akil H. et Watson S.J. (1992). Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Res.*, 592 : 228-238.
- Hermes M.L.H.J., Kalsbeek A., Kirsh R., Buijs R.M. et Pévet P. (1993). Induction of arousal in hibernating European hamsters (*Cricetus, Cricetus L.*) by vasopressin infusion in the lateral septum. *Brain Res.*, 631 : 313-316.
- Herrera D.G., Maysinger D. et Gojny M. (1993). Induction of c-Fos immunoreactivity in the hippocampus following potassium stimulation. *Neurosci.*, 52 (2) : 237-244.
- Hoffman G.E., Lee W.S., Attardi B., Yann V. et Fitzsimons M.D. (1990). Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-Fos antigen after steroid activation. *Endocrinol.*, 126 : 1736-1741.
- Honkaniemi J. (1992). Colocalisation of peptide- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities with Fos-immunoreactive neurons in rat central amygdaloid nucleus after immobilization stress. *Brain Res.*, 598 : 107-113.
- Honkaniemi J., Kainu T., Ceccatelli S., Rechart L., Hökfelt T. et Peltö-Huikko M. (1992). Fos and Jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *NeuroReport.*, 3 : 849-852.
- Hunt S.P., Pini A. et Evans G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328 : 632-635.
- Iijima K. et Ogawa T. (1980). An HRP study on cell types and their regional topography within the locus coeruleus innervating the supraoptic nucleus of the rat. *Acta Histochem.*, (Jena) 67 : 127-138.
- Imaki T., Shibasaki T., Hotta M., et Demura H. (1992). Early induction of c-Fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinol.*, 131 : 240-246.

- Innis R.B., Correa F.M.A., Uhl G.R., Schneider B. et Snyder S.H. (1979). Cholecystokinin octapeptide-like immunoreactivity: Histochemical localization in the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76 : 521-525.
- Irvin R.W., Szot P., Dorsa D.M., Potegal M. et Ferris C.F. (1990). Vasopressin in the septal area of the golden hamster controls scent marking and grooming. *Physiol. Behav.*, 48 : 693-699.
- Ishikawa K., Taniguchi Y., Kurosumi K. et Suzuki M. (1986). Origin of the septal thyrotropin-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinol.*, 44 : 54-58.
- Izzo P.N. (1991). A note on the use of biocytin in anterograde tracing studies in the central nervous system : application at both light and electron microscopic level. *J. Neurosci. Meth.*, 36 : 155-166.
- Jacobowitz D.M. et Winsky L. (1991). Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 304 : 198-218.
- Jakab R.L. et Leranath C. (1990a). Catecholaminergic, GABAergic and hippocamposeptal innervation of GABAergic "somatospiny" neurons in the rat lateral septal area. *J. Comp. Neurol.*, 302 : 305-321.
- Jakab R.L. et Leranath C. (1990b). Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamposeptal fibers : a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse*, 6 : 10-22.
- Jakab R.L. et Leranath C. (1991a). Synaptology and origin of somatostatinergic fibers in the rat lateral septal area: Convergent somatostatinergic and hippocampal inputs of somatospiny neurons. *Brain Res.*, 565 : 123-134.
- Jakab R.L. et Leranath C. (1991b). Calbindin-containing neurons in the rat lateral septal area (LSA) exhibit somatic spines and are innervated by somatostatin-, vasopressin-, tyrosine-hydroxylase- (TH), corticotropin relasing factor- (CRF), and angiotensin II-containing fibers. *Third IBRO World Cong. Neurosci.*, Abstr.324
- Jakab R.L. et Leranath C. (1993). Presence of somatostatin or neurotensin in lateral septal dopaminergic axon terminals of distinct hypothalamic and midbrain origins : convergence on the somatospiny neurons. *Exp. Brain Res.*, 92 : 420-430.
- Jakab R.L. et Leranath C. (1995). Septum. In: G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system*. Academic Press, Inc., Sydney, Chap. 20, pp. 405-442.
- Jakab R.L., Deller T. et Leranath C. (1991a). Calbindin-containing somatospiny neurons of the rat lateral septal area project to the medial amygdala and the anterior hypothalamus. *Third IBRO World Cong. Neurosci.*, Abstr. 324.
- Jakab R.L., Horvath T.L., Leranath C, Harada N. et Naftolin F. (1993). Aromatase immunoreactivity in the rat brain: Gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-agmydala complex. *J. Steroid. Biochem.*, 44 : 481-498.
- Jennes L., Stumpf W.E. et Kalivas P.W. (1982). Neurotensin: Topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 210 : 211-224.
- Jhamandas J.H. et Renaud R. P. (1987). Neurophysiology of a central baroreceptor pathway projecting to hypothalamic vasopressin neurons. *Can. J. Neurol. Sci.*, 14 : 17-24.
- Jhamandas J.H., Raby W., Rogers J., Buijs R.M. et Renaud L.P. (1989). Diagonal band projection towards the hypothalamic supraoptic nucleus : Light and electron microscopic observations in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 282 : 15-23.
- Jirikowski G.F., Caldwell J.D., Pilgrim Ch., Stumpf W.E. et Peterson C.A. (1989). Changes in immunostaining for oxytocin in the forebrain of the female rat during late pregnancy, parturition and early lactation. *Cell. Tissue Res.*, 256 : 411-417.

- Joëls M. et Urban I.J.A. (1984a). Amino acid neurotransmission between fimbria-fornix fibers and neurons in the lateral septum of the rat : a microiontophoretic study. *Exp. Neurol.*, 84 : 126-139.
- Joëls M. et Urban I.J.A. (1984b). Electrophysiological and pharmacological evidence in favor of amino acid neurotransmission in fimbria-fornix fibers innervating the lateral complex of rat. *Exp. Brain Res.*, 54 : 455-462.
- Joëls M. et Urban I.J.A. (1984c). Arginin8-vasopressin enhances the responses of lateral septal neurons in the rat to excitatory amino acids and fimbria-fornix stimuli. *Brain Res.*, 311 : 201-209.
- Kato M., Koibuchi N. et Suzuki M. (1988). Inhibitory regulation by the central nervous system of the growth hormones secretion from the rat anterior pituitary.
- Kawakami M., Yoshioka E., Konda N., Arita J. et Visessuan S. (1978). Data on the sites of the stimulatory feedback action of gonadal steroids indispensable for luteizing hormone release in the rat. *Endocrinol.*, 102 : 791-797.
- Kawano H. et Daikoku S. (1987). Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems : retrograde tracing and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 265 : 242-253.
- Kawano H. et Daikoku S (1988). Somatostatin containing neuron systems in the rat hypothalamus ; retrograde tracing and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.*, 271 : 292-299.
- Kawano H., Daikoku S. et Shibasaki T. (1988). CRF-containing neuron system in the rat hypothalamus : retrograde tracing and immunohistochemical studies. *J. Comp. Neurol.*, 272 : 260-268.
- Kawano H., Tsuruo Y., Bando H. et Daikoku S. (1991). Hypophysiotropic TRH-producing neurons identified by combining immunocytochemistry for pro-TRH and retrograde tracing. *J. Comp. Neurol.*, 307 : 531-538.
- Kawata M., Nakao K., Morii N., Kiso Y., Yamashita H., Imura H. et Sano Y. (1985). Atrial natriuretic polypeptide: Topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neurosci.*, 16 : 521-546.
- Kendrick K.M. (1982). Effects of castration on medial preoptic/anterior hypothalamic neurone responses to stimulation of the fimbria in the rat. *J. Physiol., (Lond.)* 315 : 449-461.
- Kendrick K.M. (1983). Effect of testosterone on medial preoptic anterior hypothalamic neuron responses to stimulation of the lateral septum. *Brain Res.*, 262 : 136-142.
- Khachaturian H., Watson S.J., Lewis M.E., Coy D., Goldstein A. et Akil H. (1982). Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. *Peptides*, 3 : 941-954.
- King M.A., Louis P.M., Hunter B.E. et Walker D.W. (1989). Biocytin : a versatile anterograde neuroanatomical tract-tracing alternative. *Brain Res.*, 497 : 361-367.
- King T.R. et Nance D.M. (1985). The effects of unilateral frontolateral hypothalamic knife cuts and asymmetrical unilateral septal lesions on lordosis behavior of rat. *Physiol. Behav.*, 35 : 955-959.
- King T.R. et Nance D.M. (1986a). Differential effects of neurotoxic lesions on psychoneuroendocrine functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24 : 107-114.
- King T.R. et Nance D.M. (1986b). Neuroestrogenic control of feeding behavior and body weight in rats with kainic acid lesions of the lateral septal area. *Physiol. Behav.*, 37 : 475-481
- Kiss J.Z., Palkovits M., Záborszky L., Tribollet E., Szabó D. et Makara G.B. (1983). Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats. II. Number of local and certain afferent nerve terminals. *Brain Res.*, 265 : 11-20.

- Kita H. et Oomura Y. (1982). An HRP study of the afferents connections to rat lateral hypothalamic region. *Brain Res. Bull.*, 8 : 63-71.
- Kivipelto L. et Panula P. (1986). Light and electron microscopic immunocytochemistry of proenkephalin-derived peptides in septal neurons. *Med. Biol.*, 64 : 119-126.
- Kjaer A., Larsen P.J., Knigge U. Moller M. et Warberg J. (1994). Histamine stimulates c-Fos expression in hypothalamic vasopressin-, Oxytocin-, and corticotropin-releasing-hormone- containing neurons. *Endocrinol.*, 134 (1) : 482-491.
- Köhler C. (1990). Subicular projections to the hypothalamus and brainstem: Some novel aspects revealed in the rat by the anterograde *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) tracing method. *Prog. Brain Res.*, 83 : 59-69.
- Köhler C. et Chan-Palay V. (1983). Distribution of gamma aminobutyric acid containing neurons and terminals in the septal area. *Anat. Embryol.*, 167 : 53-65.
- Köhler C. et Eriksson L.G. (1984). An immunohistochemical study of somatostatin and neurotensin positive neurons in the septal nuclei of the rat brain. *Anat. Embryol.*, 170 : 1-10.
- Köhler C., Chan-Palay V. et Steinbush H. (1982). The distribution and origin of serotonin containing fibers in the septal area : a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 209 : 91-111.
- Koizumi K. et Yamashita H. (1972). Studies of antidromically identified neurosecretory cells of the hypothalamus by intracellular and extra-cellular recordings. *J. Physiol.*, 221 : 683-705.
- Kokonen J., Honkaniemi J., Alho H., Koistinaho J., Iadarola M. et Peltö-Huikko M. (1992). Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic pituitary axis after immobilization stress. *Endocrinol.*, 130 : 3041-3047.
- Kondo Y., Koizumi T., Arai Y., Kakeyama M. et Yamamouchi K. (1993b). Functional relationships between mesencephalic central grey and septum in regulating lordosis in female rats : Effect of dual lesions. *Brain Res. Bull.*, 32 : 635-638.
- Kondo Y., Shinoda A., Yamanouchi K. et Arai Y. (1990). Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behaviour in male rats. *Horm. Behav.*, 24 : 421-434.
- Kondo Y., Yamamouchi K. et Arai Y. (1993a). P-Chlorophenylamine facilitates copulatory behavior in septal lesioned but not in preoptic lesioned male rats. *J. Neuroendocrinol.*, 5 : 629-633.
- Kornhauser J.M., Mayo K.E. et Takahashi J.S. (1993). Immediate-early gene expression in a mammalian circadian pacemaker : the suprachiasmatic nucleus. Young M.W. Ed *Molecular Genetics of Biological Rhythms*. New York : Marcel Dekker : 271-307.
- Kovacs G.L., Bohus B., Versteeg D.H.G., De Kloet E.R. et DeWied D. (1979). Effects of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: Sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic-midbrain structures. *Brain Res.*, 175 : 303-314.
- Köves K., Arimura A., Görös T.G. et Somogyvari-Vigh A. (1991). Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylocyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinol.*, 54 : 159-169.
- Krainiak P.F., Weiner S. et Siegel A. (1980). An analysis of the efferent connections of the septal area in the cat. *Brain Res.*, 189 : 15-29.
- Krey L.C. et Silverman A.J. (1978). The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea-pig brain.-II. The regulation of gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence. *Brain Res.*, 157 : 247-256.

- Krieger M.S., Conrad, L.C.A. et Pfaff D.W. (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 183 : 785-816.
- Kristensson et Olsson Y (1974). Retrograde transport of horseradish peroxidase in transected axons. I-Time relationships between transport and induction of chromatolysis. *Brain Res.*, 75 : 101
- Kruijer W., Schubert D. et Verma I.M. (1985). Induction of the proto-oncogene Fos by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82 : 7330-7334.
- Krukoff T.L., Morton T.L. Harris K.H. et Jhamandas J.H. (1992). Expression of c-Fos protein in rat brain elicited by electrical stimulation of the pontine parabrachial nucleus. *J. Neurosci.*, 12(9) : 3582-3590.
- Krukoff T.L., Harris K.H., Linetsky E. et Jhamandas J.H. (1994). Expression of c-Fos protein in rat brain elicited by electrical and chemical stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinol.*, 59 : 590-602.
- Kuypers H.G.J.M. et Ugolini G. (1990). Viruses as transneuronal tracers. *Tins*, 13 (2) : 71-75
- La Vail J.H. et La Vail M.M. (1974). The retrograde intraxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system. A light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 157 : 303.
- Lambert R.C., Moos F.C., Ingram C.D., Wakerley J.B., Kermark P., Guerne Y. et Richard Ph. (1993). Electrical activity of neurons in the ventrolateral septum and bed nuclei of the stria terminalis in suckled rats : statistical analysis gives evidence for sensitivity to oxytocin and for the relation to the milk-ejection reflex. *Neurosci.*, 54 (2) : 361-376.
- Lapper S.R. et Bolam J.P. (1991). The anterograde and retrograde transport of neurobiotin in the central nervous system of the rat : comparison with biocytin. *J. Neurosci. Meth.*, 39 : 163-174.
- Lau L.F. et Nathans D. (1987). Expression of a set of growth-related immediately-early genes in BALB/C 3T3 cells : coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 1182-1186.
- Lebrun C.J. et Poulain D.A. (1982). Electrical activity of septal neurones during suckling and the milk ejection reflex in the lactating rat. *Exp. Brain Res.*, 47 : 203-208.
- Lebrun C.J., Poulain D.A. et Theodosis D.T. (1983). The role of the septum in the control of the milk ejection reflex in the rat : effects of lesions and electrical stimulation. *J. Physiol. (London)*, 339 : 17-31.
- Lechan R.M., Nestler J.L. et Jacobson S. (1982). The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunocytochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Res.*, 245 : 1-15.
- Lee T.F., Nürnberger F., Jourdan M.L., Wang L.C.H. (1989). Possible involvement of septum in seasonal changes in thermoregulatory responses to met-enkephalinamide in ground squirrel. In "thermoregulation : research and clinical applications." Lomax p. Et coll (Eds). Karger, Basel.
- Lee W.S., Smith M.S. et Hoffman G.E. (1990). Progesterone enhances the surge of luteinizing hormone by increasing the activation of luteinizing hormone releasing hormone neurons. *Endocrinol.*, 127 : 2604-2609.
- Leranth C., Deller T. et Buzsaki G. (1992). Intraseptal connections redefined : Lack of a lateral septum to medial septum path. *Brain Res.*, 583 : 1-11.
- Leung S.L., Martin L.A. et Stewart D.J. (1994). Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus*, 4(2) : 136-147.
- Levine D.J., Zhao X.S. et Miselis R.R. (1994). Direct and indirect retinohypothalamic projections to the supraoptic nucleus in the female Albino Rat. *J. Comp. Neurol.*, 341 : 214-224.

- Lindvall O. (1975). Mesencephalic dopaminergic afferents to the lateral septal nucleus of the rat. *Brain Res.*, 87 : 89-95.
- Lindvall O. et Björklund A. (1974). The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol. Scand.*, 412 (Suppl.) : 1-48.
- Lindvall O. et Stenevi U. (1978). Dopamine and noradrenaline neurons projecting to the septal area in the rat. *Cell Tissue Res.*, 190 : 383-407.
- Lisciotto C.A., De Bold J.F., Haney M. et Miczek K.A. (1990). Implants of testosterone into the septal forebrain activate aggressive behavior in male mice. *Aggress. Behav.*, 16 : 249-258.
- Ljungdahl A., Hökfelt T. et Nilsson G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neurosci.*, 3 : 861-943.
- Loren I., Emson P.C., Fahrenkrug J., Björklund A., Alumets J., Hakanson R. et Sundler F. (1979). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neurosci.*, 4 : 1953-1976.
- Luckman S.M., Dyball R.E.J. et Leng G. (1994). Induction of c-Fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J. Neurosci.*, 14(8) : 4825-4830.
- Luiten P.G.M. et Room P. (1980). Interrelations between lateral dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *Brain Res.*, 190 : 321-332.
- Luiten P.G.M., Kuipers F. et Schuitmaker H. (1982). Organization of diencephalic and brainstem afferent projections to the lateral septum in the rat. *Neurosci. Lett.*, 30 : 211-216.
- MacLean P.D. et Ploog D.W. (1962). Cerebral representation of penile erection. *J. Neurophysiol.*, 25 : 29-55.
- Mac Lean J.H., Shipley M.T. et Bernstein D.I. (1989). Golgi-like, transneuronal retrograde labelling with CNS injections of Herpes Simplex Virus type 1. *Brain Res. Bull.*, 22 : 867-881.
- MacDonald J.F. et Nowak L.M. (1990). Mechanism of blockade of excitatory amino acid receptor channels. *Trends Pharmac. Sci.*, 11 : 167-172.
- MacGinnis M., Nance D.M. et Gorski R.A. (1978). Olfactory, septal and amygdala lesions alone or in combination: Effects on lordosis behavior and emotionality. *Physiology and behavior*, 20 : 435-440.
- Maggi C.A. et Meli A. (1986a) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various system. 2. Cardiovascular system. *Experimentia*, 42 : 292-297.
- Maggi C.A. et Meli A. (1986b) Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various system. 3. Other systems. *Experimentia*, 42 : 531-536.
- Malsbury C.W., Harris V.S., Weisberg D. et Daood J. (1979). An HRP study of the afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus (VMN) in the hamster. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 5 : 755.
- Massamiri T., Khrestchatsky M. et Ben-Ari Y. (1994). Induction of c-fos mRNA expression in an *in vitro* hippocampal slice model of adult rats after kainate but not g-aminobutyric acid or bicuculline treatment. *Neurosci. Lett.*, 166 : 73-76.
- Meibach R. et Siegel A. (1977a). Efferent connections of the septal area in the rat : An analysis using retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res.*, 119 : 1-20.
- Meibach R. et Siegel A. (1977b). Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.*, 124 : 197-224.

- Merchenthaler I. (1990). Retrograde labeling of hypophysiotropic neurons by local injection of wheat germ agglutinin (WGA) into the median eminence or peripheral administration of fluoro-gold. *Mol. Cell Neurosci.*, 1 : 93-106.
- Merchenthaler I. (1991). Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat : a retrograde tracing study with fluoro-gold. *Neurosci.*, 44 : 655-662.
- Merchenthaler I. et Lennard D. (1991). The hypophysiotropic neurotensin-immunoreactive neuronal system of the rat brain. *Endocrinol.*, 129 : 2875-2880.
- Merchenthaler I., Görös T., Setalo G., Petrusz P. et Flerko B. (1984). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Res.*, 237 : 15-29.
- Merchenthaler I., Setalo G., Csontos C., Petrusz P. et Negro-Vilar A. (1989). Combined retrograde tracing and immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Endocrinol.*, 125 : 2812-2821.
- Mesulam M.M. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurochemistry : a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem Cytochem.*, 26 : 106-117.
- Miczek K.A. et Grossman S.P. (1972). Effects of septal lesions on inter- and intraspecies aggression in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 79 : 37-45.
- Miselis R.R., Weiss M.L., Shapiro R.E. (1987). Modulation of the visceral neuraxis. In : Gross PM (ed) *Circumventricular organs and body fluids*. CRC Press, Boca Raton Florida : 143-162.
- Moore R.Y., Björklund A. et Steveni U. (1971). Plastic changes in the adrenergic innervation of the rat septal area in response to denervation. *Brain Res.*, 33 : 13-35.
- Moore R.Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 177 : 665-684.
- Moos F., Ingram C.D., Wakerley J.B., Guerne Y., Freund-Mercier M.J. et Richard Ph. (1991). Oxytocin in the bed nucleus of the stria terminalis and lateral septum facilitates bursting of hypothalamic oxytocin neurons in suckled rats. *J. Neuroendocrinol.*, 3 (2) : 163-171.
- Morgan J.I. et Curran T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322 : 552-555.
- Morgan J.I. et Curran T. (1991). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12 : 343-349.
- Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L. et Curran T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237 : 192-197.
- Mugnaini E., Berrebi A.S., Morgan J.I. et Curran T. (1989). Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with euchromatin in neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 1 : 46-52.
- Nance D.M. (1983). Psychoneuroendocrine effects of neurotoxic lesions in the septum and striatum of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18 : 605-609.
- Nance D.M. et Burns J. (1990). Fluorescent dextrans as sensitive anterograde neuroanatomical tracers : applications and pitfalls. *Brain Res. Bull.*, 25 : 139-145.
- Nance D.M. et Myatt G.A. (1987). Female sexual behavior in the golden hamster following kainic acid lesions in the lateral septal area. *Brain Res. Bull.*, 19 : 751-754.
- Nance D.M., Shryne J., Gordon J.H. et Gorsky R.A. (1977). Examination of some factors that control the effects of septal lesions on lordosis behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 6 : 227-234.

- Nance D.M., Shryne J. et Gorsky R.A. (1974). Septal lesions : effects on lordosis behavior and pattern of gonatropin release. *Horm.Behav.*, 5 : 73-81.
- Nance D.M., Shryne J. et Gorsky R.A. (1975). Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Horm. Behav.*, 6 : 59-64.
- Nauta W.J.H. et Gyfax P.A. (1954). Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system : a modified technique. *Stain Technol.*, 29 : 91-93
- Negoro H., Visessuwan S. et Holland R.C. (1973). Inhibition and excitation of units in paraventricular nucleus after stimulation of the septum, amygdala and neurohypophysis. *Brain Res.*, 57 : 479-483.
- Neumann I. et Landgraf R. (1989). Septal and hippocampal release of oxytocin, but not vasopressin, in the conscious lactating rat during suckling. *J. Neuroendocrinol.*, 1 : 305-308.
- Norgren R.B. et Lehman M.N. (1989). Retrograde transneuronal transport of herpes simplex virus in the retina after injection in the superior colliculus, hypothalamus and optic chiasm. *Brain Res.*, 479 : 374-378.
- Norgren R.B., MacLean J.H., Bubel H.C., Wander A, Bernstein D.I. et Lehman N. (1992) Anterograde transport of HSV-1 and HSV-2 in the visual system. *Brain Res. Bull.*, 28 : 393-399
- Numan R. et Quaranta J.R. (1990). Effects of medial septal on operant delayed alternation in rats. *Brain Res.*, 531 : 232-241.
- Nyakas C., Luiten P.G.M., Spencer D.G. et Traber J. (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res. Bull.*, 18 : 533-545.
- Oldfield B.J. et Silverman A.J. (1985). A light microscopical HRP study of limbic projections to the vasopressin-containing nuclear groups of the hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, 130 : 121-134.
- Oldfield B.J., Hou-Yu A. et Silverman A.J. (1985). A combined electron microscopical HRP and immunocytochemical study of the limbic projections to rat hypothalamic nuclei containing vasopressin and oxytocin neurons. *J. Comp. Neurol.*, 231 : 221-231.
- Onteniente B., Menetrey D., Arai R. et Calas A. (1989). Origin of the Met-enkephalinergic innervation of the lateral septum in the rat. *Cell Tissue Res.*, 256 : 585-592.
- Onteniente B., Tago H., Kimura H., Mazedo T. (1986). Distribution of aminobutyric and acid-immunoreactive neurons in the septal region of the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 248 : 422-430.
- Oorjitham E.G., Godfrey D.A., Ross C.D. et Dunn J.D. (1989). Effect of septal ablation on choline acetyltransferase in the paraventricular nucleus. *Brain Res. Bull.*, 22 : 277-282.
- Ottersen O.P. et Storm-Mathisen J. (1984). Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunohistochemical technique. *J. Comp. Neurol.*, 229 : 374-392.
- Palkovits M. (1984). Distribution of neuropeptides in the central nervous system: A review of biochemical mapping studies. *Prog. Neurobiol.*, 23 : 151-189.
- Palkovits M., Kobayashi R.M., Brown M. et Vale W. (1980). Changes in hypothalamic, limbic and extrapyramidal somatostatin levels following various hypothalamic transections in rat. *Brain Res.*, 195 : 499-505.
- Palkovits M., Tapia-Arancibia L., Kordon C. et Epelbaum J. (1982). Somatostatin connections between the hypothalamus and the limbic system of the rat brain. *Brain Res.*, 250 : 223-228.
- Panula P., Revuelta A.V., Cheney D.L., Wu J.Y. et Costa E. (1984). An immunohistochemical study on the location of GABAergic neurons in the rat septum. *J. Comp. Neurol.*, 222 : 69-80.

- Paxinos G. (1975). The septum: Neural system involved in eating, drinking, irritability, muricide, copulation and activity in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 89 : 1154-1168.
- Paxinos G. et Watson C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Peterson G.M. et Shurlow C.L. (1992). Morphological evidence for a substance P projection from medial septum to hippocampus. *Peptides*, 13 : 509-517.
- Petrov T., Jhamandas J.H. et Krukoff T.L. (1994). Electrical stimulation of the central nucleus of the amygdala induces Fos-like immunoreactivity in the hypothalamus of the rat : a quantitative study. *Mol. Brain Res.*, 22 : 333-340.
- Pfaff D. et Keiner M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.*, 151 : 121-158.
- Pittman Q.J., Blume H.W., et Renaud L.P. (1981). Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal grey: An electrophysiological study in the rat. *Brain Res.*, 215 : 15-28.
- Platt J.L. et Michael A.F. (1983). Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* 31 : 840-842.
- Popovici T., Represa A., Crépel V., Bardin G., Beaudoin M. et Ben-Ari Y. (1990). Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-Fos-like proteins in rat brain. *Brain Res.*, 536 : 183-194.
- Porter J.D., Guthrie B.L. et Sparks D.L. (1985). *Exp. Brain Res.*, 57 : 411-416.
- Poulain P. (1974). L'hypothalamus et le septum du cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. *Arch. Anat. Micr. Morph Exp.*, 63 : 37-50.
- Poulain P. (1977). Septal afferents to the arcuate-median eminence region in the guinea pig : correlative electrophysiological and horseradish peroxidase studies. *Brain Res.*, 137 : 150-153.
- Poulain P. (1983). Hypothalamic projections to the lateral septum in the guinea pig : An HRP study. *Brain res. Bull.*, 10 : 309-315.
- Poulain D.A., Ellendorf F. et Vincent J.D. (1980). Septal connections with identified oxytocin and vasopressin neurones in the supraoptic nucleus of the rat : An electrophysiological investigation. *Neurosci.* 5 : 379-387.
- Poulain D.A., Lebrun C.J., Vincent J.D. (1981). Electrophysiological evidence for connections between septal neurons and the supraoptic nucleus of the hypothalamus of the rat. *Exp. Brain Res.*, 42 : 260-268.
- Poulain P., Martin-Bouyer L., Beauvillain J.C. et Tramu G. (1984). Study of the efferent connections of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea-pig hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunohistochemistry : evidence for a projection to the lateral septum. *Neurosci.*, 11 : 331-343.
- Poulain P., Warembourg M. et Jolivet A (1990). A small subpopulation of progesterone receptor-containing neurons in the guinea-pig arcuate nucleus projects to the median eminence. *J. Neurosci. Res.*, 25 : 375-385.
- Powell E.W. et Rorie D.K. (1967). Septal projections to nuclei functioning in oxytocin release. *Amer. J. Anat.*, 120 : 605-610.
- Raisman G. (1966a). The connections of the septum. *Brain* , 89 : 317-348.
- Raisman G. (1966b). An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus. *Brain*, 89 : 83-108.

- Raisman G; (1969). A comparison of the mode of termination of the hippocampal and hypothalamic afferents to the septal nuclei as revealed by electron microscopy degeneration. *Exp. Brain Res.*, 7 : 317-343.
- Rauscher F.J. , Sambucetti L.C., Curran T., Distel R.J. et Spiegelman B.M. (1988). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*, 52 : 471-480.
- Resibois A. et Rogers J.H. (1992). Calretinin in rat brain: An immunohistochemical study. *Neurosci.*, 46 : 101-134.
- Richard P.H., Moos F. et Freund-Mercier M.J. (1991). Central effects of oxytocin. *Physiol. Rev.*, 71 : 331-370.
- Richard D., Rivest S. et Rivier C. (1992). The 5-hydroxytryptamine agonist fenfluramine increases Fos-like immunoreactivity in the brain. *Brain Res.*, 594 : 131-137.
- Risold P.Y., Canteras N.S. et Swanson L.W. (1994). Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a *Phaseolus vulgaris*-Leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 348 : 1-40.
- Sagar S.M., Sharp F.R. et Curran T. (1988). Expression of c-Fos protein in brain : metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240 : 1328.
- Sakanaka M. et Magari S. (1989). Reassessment of enkephalin (ENK)-containing afferents to the lateral septum with reference to the fine structures of septal ENK fibers. *Brain Res.*, 479 : 205-216.
- Sakanaka M., Magari S. et Inoue N. (1990). Somatostatin colocalizes with tyrosine hydroxylase in the nerve cells of discrete hypothalamic regions in rats. *Brain Res.*, 516 : 313-317.
- Sakanaka M., Magari S., Shibasaki T., Lederis K. (1988). Corticotropin releasing factor-containing afferents to the lateral septum of the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 270 : 404-415.
- Sakanaka M., Senba E. ,Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki H., Takagi Y., Kawai Y., Hara Y. et Tohyama M. (1982b). Evidence for the existence of an enkephalin-containing pathway from the area just ventrolateral to the anterior hypothalamic nucleus to the lateral septal area of the rat. *Brain Res.*, 239 : 240-244.
- Sakanaka M., Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki S., Hara Y., Kawai Y., Senba E. et Tohyama M. (1982a). Origins of substance P-containing fibers in the lateral septal area of young rats: Immunohistochemical analysis of experimental manipulations. *J. Comp. Neurol.*, 212 : 268-277.
- Sakanaka M., Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki S., Takagi H., Senba E., Kawai Y., Hara Y., Iio H., Minagawa H., Matsuzaki T., Tohyama M. (1981). Evidence for the existence of the substance P-containing pathway from the nucleus laterodorsalis tegmenti (Castaldi) to the lateral septal area of the rat. *Brain Res.*, 230 : 351-355.
- Sakuma Y. (1992). Suppression of lordosis reflex in the female rat by electrical stimulation of the forebrain and ventral mid- brain. *J. Physiol. (Lond.)* . 446 : 84P.
- Sandner G., Di Scala G., Rocha B. et Angst M.J. (1992). c-Fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal grey in freely moving rats. *Brain Res.*, 573 : 276-283
- Saper C.B. et Loewy A.D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, 197 : 291-317.
- Saper C.B., Swanson L.W. et Cowan W.M. (1979).. An autoradiographic study of the efferents connections of the lateral hypothalamic area in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 183 : 689-706.
- Saphier D. et Feldman S. (1987) Effects of septal and hippocampal stimuli on paraventricular nucleus neurons. *Neurosci.*, 20 : 749-755.

- Sar M. et Stumpf W.E. (1975). Distribution of androgen-concentrating neurons in rat brain. In *Anatomical Neuroendocrinology*. (Stumpf W.E., Grant L.D., Eds) : 120-133. Karger, Basel.
- Sar M., Stumpf W.E., Miller R.J., Chang K.L. et Cuatrecasas P. (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 182 : 17-38.
- Satoh K. et Fibiger H.C. (1986). Cholinergic neurons of the latero-dorsal tegmental nucleus: Efferent and afferent connections. *J. Comp. Neurol.*, 253 : 277-302.
- Sawchenko P.E. et Swanson L.W. (1983). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 218 : 121-144.
- Schmued L.D. et Fallon J.H. (1986). Fluoro-gold : a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.*, 377 : 147-154.
- Schmued L.D., Kyriakidis K. et Heimer L. (1990). In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine- dextran-amerie, Fluoro-Ruby, within the CNS. *Brain Res.*, 526 : 127-134.
- Sedarati F. et Stevens J.G. (1987). Biological basis for virulence of three strains of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.*, 68 : 2389-2395.
- Segal M., Landis S.C. (1974). Afferents to the septal area of the rat studied with the method of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 82 : 263-268.
- Seggie J. et Brown G.M. (1971). Septal lesions and resling adrenal function, a possible explanation of conflicting findings. *Neuroendocrinol.*, 8 : 367-374.
- Seggie J., Uhler I. et Brown G.I. (1973). Adrenal Stress responses following septal lesions in the rat. *Neuroendocrinol.*, 16 : 225-236.
- Senut M.C., Menetrey D. et Lamour Y. (1989). Cholinergic and peptidergic projections from the medial septum and the nucleus of the diagonal band of Broca to dorsal hippocampus, cingulate cortex and olfactory bulb: A combined wheatgerm agglutinin-apohorse-radish peroxidase-gold immunohistochemical study. *Neurosci.*, 30 : 385-403.
- Sharp F.R., Sagar S.M., Hicks K., Lowenstein D. et Hisanaga K. (1991). c-Fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J. Neurosci.*, 11 : 2321-2331.
- Sheng H.Z., Fields R.D. et Nelson P.G. (1993). Specific regulation of immediate early genes by patterned neuronal activity. *J. Neurosci. Res.*, 35 : 459-467.
- Sheng M. et Greenberg M.E. (1990). The regulation and function of c-Fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.*, 4 : 477-485.
- Shiple M.T. (1985) *Brain Res. Bull.*, 15 : 129-142.
- Shivers B.D., Harlan R.E., Morrel, J.I. et Pfaff D.W. (1983). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in male and female rat brains. *Neuroendocrinol.*, 36 : 1-12.
- Siegel H.I. (1985). Aggressive behavior. In J.I. Siegel (Ed.), *The Hamster: reproduction and behavior*. Plenum Press, New York, pp. 261-288.
- Siegel A., Edinger H. et Ohgami S. (1974). The topographical organization of the hippocampal projection to the septal area: A comparative neuroanatomical analysis in the gerbil, rat, rabbit, and cat. *J. Comp. Neurol.*, 157 : 359-378.

- Sigler S.M., Mencio-Wszalek T. et Ramirez V.D. (1990). Central administration of a specific V₂ vasopressin antagonist blocks the male rats ability to recognize a familiar conspecific female. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 16 : 1329.
- Silveira M.C.L., Sandner G., Di Scala G. et Graeff F.G. (1994). c-Fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res.*, 674 : 265-274.
- Silverman A.J. et Oldfield B.J. (1984). Synaptic input to vasopressin neurons of the paraventricular nucleus. *Peptides*, 5 (Suppl. 1) : 139-150.
- Silverman A.J., Hoffman D.L. et Zimmerman E.A. (1981) The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res. Bull.*, 6 : 47-61.
- Silverman A.J., Jhamandas J. et Renaud L.P. (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J. Neurosci.*, 7 : 2312-2319.
- Simerly R.B. et Swanson L.W. (1986). The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 246 : 312-342.
- Simerly R.B. et Swanson L.W. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: A *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 270 : 209-242.
- Simerly R.B., Chang C., Muramatsu M. et Swanson L.W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An *in situ* hybridization study. *J. Comp. Neurol.*, 294 : 76-95.
- Sims K.B., Hoffman D.L., Said S.I. et Zimmerman E.A. (1980). Vasoactive intestinal peptide (VIP) in mouse and rat brain: An immunocytochemical study. *Brain Res.*, 186 : 165-184.
- Sokoloff L., Reivich M., Kennedy C., Des Rosiers M.H. Patlak C.S., Pettigrew K.D., Sakurada O. et Shinohara M. (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure and normal values in the conscious and anaesthetized albino rat. *J. Neurochem.*, 28 : 897-916.
- Sonnenberg J.L., Mitchelmore C., MacGregor-Leon P.F., Hempstead J., Morgan J.I. et Curran T. (1989). Glutamate receptor agonists increase the expression of Fos, Fra, and AP-1 DNA binding activity in the mammalian brain. *J. Neurosci. Res.*, 24 : 72-80.
- Staiger J. F. et Nürnberger F. (1989). Pattern of afferents to the lateral septum in the guinea pig. *Cell. Tissue Res.*, 257 : 471-490.
- Staiger J.F. et Nürnberger F. (1991a). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea-pig : Projections to the diencephalon and brain stem. *Cell. Tissue Res.*, 264 : 391-413.
- Staiger J.F. et Nürnberger F. (1991b). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea-pig : Intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas. *Cell. Tissue Res.*, 264 : 415-426.
- Staiger J.F. et Wouterlood F.G. (1990). Efferent projections from the lateral septal nucleus to the anterior hypothalamus in the rat : a study combining phaseolus vulgaris- leucoagglutinin tracing with vasopressin immunocytochemistry. *Cell. Tissue Res.*, 261 : 17-23.
- Stefanini M., De Martino C. et Zamboni L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216 : 173-174.
- Stevens D.R. et Cotman C.W. (1986). Excitatory amino acid antagonists depress transmission in hippocampal projections to the lateral septum. *Brain Res.*, 382 : 437-440.

- Stevens D.R. et Cotman C.W. (1991). Long-term potentiation of excitatory and slow inhibitory synaptic potentials in the hippocampo-septal projection of the rat. *Brain Res.*, 558 : 120-122.
- Stewart M. et Fox S.E. (1990a). Firing relation of the lateral septal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized rats. *Exp. Brain Res.*, 79 : 92-96.
- Stewart M. et Fox S.E. (1990b). Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm ? *TIN*, 13 : 163-169.
- Stoddard-Apter S.L. et Mc Donnel M.F. (1983). Septal and amygdala efferents to the hypothalamus which facilitate hypothalamically elicited intra-specific aggression and associated hissing in the cat. An autoradiographic study. *Brain Res.*, : 19-32.
- Stone E.A., Zhang Y., John S.M. et Bing. G. (1991). c-Fos response to administration of catecholamines into brain by microdialysis. *Neurosci. Lett.*, 133 : 33-35.
- Stratford T.R. et Wirtshafter D. (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.*, 511 : 173-176.
- Stuart D.G., Kawamura Y. et Hemingway A. (1961). Activation and suppression of shivering during septal and hypothalamic stimulation. *Expl. Neurol.*, 4 : 485-506.
- Stumpf W.E., Sar M. et Keefer D.A. (1975). Atlas of estrogen target cells in rat brain. In : *Anatomical Neuroendocrinology*. Basel : Karger, pp. 104-119.
- Sugimoto T., Sato K., Houtani T., Ueyama T. et Ikeda M. (1993). On the expression of Fos-like protein in the subthalamic nucleus and basal ganglia output systems following kainic acid injections into the rodent striatum. *Neurosci. Lett.*, 152 : 25-28.
- Sundsten J.W. (1971). Septal inhibition of antidromically activated hypothalamic paraventricular neurons in the monkey. *Anat. Rec.*, 169 : 439.
- Swanson L.W. (1976). An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 167 : 227-256.
- Swanson L.W. (1978). The anatomical organization of the septo-hippocampal projections. In "Function of the Septo-Hippocampal System" (A. Gray, Ed.), Ciba Foundation Symposium Series, Vol. 58, pp. 25-48. Elsevier, Amsterdam.
- Swanson L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 9 : 321-353.
- Swanson L.W. et Cowan W.M. (1975). A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.*, 92 : 324-330.
- Swanson L.W. et Cowan W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172 : 49-84.
- Swanson L.W. et Cowan W.M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 186 : 621-656.
- Swanson L.W. et Hartman B.K. (1975). The central adrenergic system: An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their afferent connections in the rat utilizing dopamine-b-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.*, 163 : 467-506.
- Swanson L.W., Köhler C. et Björklund A. (1987). The limbic region. I. The septohippocampal system. In "Handbook of chemical Neuroanatomy" (A. Björklund, T. Hökfelt, and L.W. Swanson, Eds.), Vol. 5, pp. 125-277. Elsevier, Amsterdam.

- Swanson L.W., Sawchenko P.E. et Cowan W.M. (1981). Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: A multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.*, 1 : 548-559.
- Taleisnik S., Velasco M.E. et Astrada J.J. (1970). Effect to hypothalamic deafferentation on the control of luteinizing hormone secretion. *J. Endocrinol.*, 46 : 1-7.
- Tangapregasson M.J., Tangapregassom A.M., Soulairac A.A. et Soulairac M.L. (1974). Effets des lésions septales sur l'ultrastructure du noyau supraoptique. *Ann. Endocrinol.*, (Paris) 35 : 149-152
- Ter Horst, G.J. et Luiten P.G.M. (1986). The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res. Bull.*, 16 : 231-248.
- Thellier D., Moos F., Richard P.H. et Stoeckel M.E. (1994). Evidence for connections between a discrete hypothalamic dorsochiasmatic area and the supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res. Bull.*, 34 (3) : 261-274.
- Thomas E. (1988). Forebrain mechanisms in the relief of fear : The role of the lateral septum. *Psychobiol.*, 16 : 36-44.
- Thomas E., Yadin E. et Strickland C.E. (1991). Septal unit activity during classical conditioning : a regional comparison. *Brain Res.*, 547 : 303-308.
- Torii M. et Kubo K. (1994)..The effects of intraventricular injection of B-endorphin on the initial estrogen action to induce lordosis behavior. *Physiol. and Behav.*, 55 :157-162.
- Tramu G., Beauvillain J.C., Croix D. et Leonardelli J. (1981). Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. *Brain Res.*, 215 : 235-255.
- Treit D., Pesol C. et Rotzinger S. (1993). Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behav. Neurosci.*, 107 (5) :770-785.
- Tribollet E. et Dreifuss J.J. (1981). Localization of neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus area of the rat : A horseradish peroxidase study. *Neurosci.*, 6 : 1315-1328.
- Tribollet E. Armstrong W.E. et Dubois-Dauphin M. (1985). Extra-hypothalamic afferents inputs to the supraoptic nucleus area of the rat as determined by retrograde tracing techniques. *Neurosci.*, 15 : 135-148.
- Tsuruo Y., Kawano H., Nishiyama T., Hisano S. et Daikoku S. (1983). Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus. Light and electron microscopy. *Brain Res.*, 289 : 1-9.
- Ugolini G. (1992). Transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV 1) from mixed limb nerves to the CNS. I. Sequence of transfer from sensory, motor, and sympathetic nerve fibres to the spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 326 : 527-548.
- Ugolini G. (1993). Transneuronal transfer of herpes simplex virus type 1 (HSV1) from mixed limb nerves to the CNS. I. Sequence of transfer from sensory, motor, and sympathetic nerve fibers to the spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 326 : 527-548.
- Ugolini G., Kuypers H.G.S.M. et Simmons A. (1987). Retrograde transneuronal transfer of herpes simplex virus 1 (H SV1) from motoneurons. *Brain Res.*, 422 : 242-256.
- Vallejo M. (1994). Transcriptional control of gene expression by cAMP-Response element binding proteins. *J. Neuroendocrinol.*, 6 : 587-596.
- Van den Hooff P., Seger M.A., Burbach J.P.H. et Urban I.J.A. (1990). The C. Terminal glycopeptide of propressophysin potentiates excitatory transmission in the rat lateral septum. *Neurosci.*, 37(3) : 647-653.

- Van den Pol A.N. (1982). The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: Intrinsic organization. *J. Comp. Neurol.*, 206 : 317-345.
- Van der Beek E.M., Wiegant V.M., Van der Donk H.A., Van den Hurk R. et Buijs M.(1993). Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J. Neuroendocrinol.*, 5 : 137-144.
- Vanderhaeghen J.J., Lostra F., De Mey J. et Gillies C. (1980). Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77 : 1190-1194.
- Van Leeuwen F.W. et Caffé A.R. (1983). Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Cell Tissue Res.*, 228 : 525-534.
- Veenman C.L., Reiner A. et Honig M.G. (1992). Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J. Neurosci. Meth.*, 41 : 239-254.
- Velasco M.E. et Taleisnik S. (1969). Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. *Endocrinol.*, 84 : 132-139.
- Veldhuis H.D., Van Wimmersma Greidanus T.B. et Versteeg D.H.G., (1987). Microinjection of anti-vasopressin serum into limbic structures of the rat brain: Effects on passive avoidance responding and on local catecholamine utilization. *Brain Res.*, 425 : 167-173.
- Vertes R.P. (1988). Brainstem afferents to the basal forebrain in the rat. *Neurosci.*, 24 : 907-935.
- Vertes R.P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 313 : 643-668.
- Vertes R.P. et Fass B. (1988). Projections between the interpeduncular nucleus and basal forebrain in the rat as demonstrated by the anterograde and retrograde transport of WGA-HRP. *Exp. Brain Res.*, 73 : 23-31.
- Vincent S.R., Hökfelt T., Christensson I. et Terenius L. (1982). Dynorphin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *Neurosci. Lett.*, 33 : 185-190.
- Wamsley J.K., Young W.S. et Kuhar M.J. (1980). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. *Brain Res.*, 190 : 153-174.
- Wang Z., Bullock N.A. et De Vries G.J. (1993). Sexual differentiation of vasopressin projections of the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdaloid nucleus in rats. *Endocrinol.*, 132 (6) : 2299-2306.
- Warembourg M. (1977). Radioautographic localization of estrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea pig. *Brain Res.*, 123 : 357-362.
- Warembourg M. et Poulain P. (1991). Presence of estrogen receptor immunoreactivity in the oxytocin-containing magnocellular neurons projecting to the neurohypophysis in the guinea-pig. *Neurosci*, 40 : 41-53.
- Warembourg M. et Poulain P. (1993). Progesterone and estrogen receptor immunocytochemistry in the central nervous system. *Meth. in Neurosci.*, 12 : 353-369.
- Warembourg M., Jolivet A. et Milgrom E. (1989). Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea-pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.*, 480 : 1-15.
- Watson S.J., Khachaturian H., Akil H., Coy D.H. et Goldstein A. (1982). Comparison of the distribution of dynorphin systems and enkephalins in brain. *Science*, 218 : 1134-1136.

Watts A.G., Swanson L.W. et Sanchez-Watts G. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J. Comp.Neurol.*, 258 : 204-229.

Weber E., Roth K.A. et Barchas J.D. (1982). Immunohistochemical distribution of α -neo-endorphin/dynorphin neuronal systems in rat brain: Evidence for colocalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 3062-3066.

Weindl A. et Sofroniew M.V. (1981). Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. In : Martin J.B., Reichlin S.Bick K.L. (eds) *Neurosecretion and brain peptides*. Raven Press, New York, : 303-320.

Wetmore L. et Nance D.W. (1991). Differential and sex specific effects of kainic acid and domoic acid lesions in the lateral septal area of rats on immune function and body weight regulation. *Exp Neurol.*, 113 : 226-236.

Wiegand S.J. et Price J.L. (1980). Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J. Comp.Neurol.*, 192 : 1-19.

Williams R.G. et Dockray G.J. (1983). Distribution of enkephalin-related peptides in rat brain. *Neurosci.*, 9 : 563-586.

Witkin J.W., Paden C.M. et Silverman A.J. (1982). The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinol.*, 35 : 429-438.

Witter M.P., Daelmans H.E.M., Jorritsma-Byham B., Staiger J.F. et Wouterlood F.G. (1992). Restricted origin and distribution of projections from the lateral to the medial septal complex in rat and guinea pig. *Neurosci. Lett.*, 148 : 164-168.

Woodhams P.L., Roberts G.W., Polak J.M. et Crow T.J. (1983). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat : the bed nucleus of the stria terminalis, septum and preoptic area. *Neurosci.*, 8 : 677-703.

Wouterlood F.G. et Groenewegen H.J. (1985). Neuroanatomical tracing by use of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) : electron microscopy of PHA-L filled neuronal somata, dendrites, axons and axon terminals. *Brain Res.*, 326 : 188-191.

Wouterlood F.G. et Jorritsma-Byham B. (1993). The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextranamine : comparison with the tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin in preparation for electron microscopy. *J. Neurosci. Meth.*, 48 : 75-87.

Wouterlood F.G., Gaykema R.P.A., Steinbush H.W.M., Watanabe T. et Wada H. (1988). The connection between the septum-diagonal band complex and histaminergic neurons in the posterior hypothalamus of the rat. Anterograde tracing with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidine decarboxylase. *Neurosci.*, 26 : 827-845.

Wuarin J.P. et Dudek F.E. (1994). Glutamate microstimulation of local inhibitory circuits in rat supraoptic nucleus. *Soc. Neurosci.*, 24th Annual Meeting, 2, 481-15.

Yadin E., Thomas E., Grishkat H.L. et Strickland C.E. (1993). The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol. Behav.*, 53 : 1077-1083.

Yamanouchi K. et Arai Y. (1990). The septum as origin of a lordosis-inhibiting influence in female rats : Effects of neural transection. *Physiol. Behav.*, 48 : 351-355.

Yamanouchi K. Matsumoto A. et Arai Y. (1985). Neural and hormonal control of lordosis behavior in the rat. *Zool. Sci.*, 2 : 617-627.

- Yoshida K. et Oka H. (1990) Topographical distribution of septohippocampal projections demonstrated by the PHA-L immunohistochemical method in rats. *Neurosci. Lett.*, 113 : 247-252.
- Záborszky L. (1980). Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv. Physiol. Sci.*, 13 : 299-304.
- Záborszky L. (1982). Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 69 : 1-107.
- Záborszky L., Léránth C.S., Makara G.B. et Palkovits M. (1975). Quantitative studies on the supraoptic nucleus in the rat. II. Afferent fiber connections. *Exp. Brain Res.*, 22 : 529-540.
- Zasorin N.L., Malsbury W.E. et Pfaff D.W. (1975). Suppression of lordosis in the hormone-primed female hamster by electrical stimulation of the septal area. *Physiol. Behav.*, 14 : 595-599.
- Zemanick M.C., Strick P.L. et Dix R.D. (1991). Direction of transneuronal transport of herpes simplex virus 1 in the primate motor system is strain dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* ,88 : 8048-8051.

RESUME

RESUME

Le septum latéral, en particulier sa partie médiolatérale, reçoit et intègre les influences limbiques. Il est étroitement corrélé aux fonctions neuroendocrines.

Chez 34 cobayes et 15 rats, ce travail définit la distribution des efférences directes du septum latéral vers les aires neuroendocrines du diencephale, par traçage axonal antérograde à l'aide de dextrans fluorescent (Fluoro-Ruby) ou biotinylé. La cartographie établie est semblable dans les deux espèces. L'innervation septale est abondante dans les aires préoptiques et hypothalamiques diffuses, et en périphérie des noyaux supraoptique, suprachiasmatique, paraventriculaire, ventromédian et arqué.

Chez 80 rats, la détection immunocytochimique du marqueur d'activité neuronale Fos recense les aires diencephaliques activées à la suite de la stimulation électrique du septum. L'étude démontre que l'aire antéroventrale périventriculaire, la partie parvocellulaire du noyau paraventriculaire, le noyau ventromédian et le noyau arqué reçoivent également une projection du septum. Elle suggère que le septum exerce une influence excitatrice sur ses neurones cibles.

L'utilisation de virus de l'Herpès comme marqueurs neuronaux transsynaptiques chez 15 rats suggère l'existence d'une connexion indirecte entre le septum et les noyaux magnocellulaires supraoptiques et paraventriculaires.

Chez 20 cobayes, une relation directe est établie entre le septum et les neurones magnocellulaires et hypophysiotropes, marqués par un traceur axonal rétrograde. Chez 7 rats, 25 % des neurones immunoréactifs pour la gonadolibérine, responsables de la synthèse de l'hormone lutéinisante, sont directement contactés par les efférences septales. Ces dernières n'atteignent pas les neurones possédant les récepteurs nucléaires de la progestérone, identifiés par immunocytochimie chez 5 cobayes.

Par différentes approches, le septum latéral est désigné, à travers ce travail, comme un maillon important du circuit de régulation hippocampo-septo-diencephalique impliqué dans les sécrétions hypophysaires.

