

50376
1995
65

gen 20103425

**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

Franck VANDENBULCKE

**LOCALISATION ULTRASTRUCTURALE DE L'ENDOPEPTIDASE-24.11
(E.C.3.4.24.11, ENDOPEPTIDASE NEUTRE, ENKEPHALINASE, E-24.11)
DANS L'EMINENCE MEDIANE DU RAT: ARGUMENTS
MORPHOLOGIQUES EN FAVEUR D'UNE ACTION LOCALE
MODULATRICE DES ENKEPHALINES.**

Soutenu le



D 030 063523 3

composé de:

Président: Monsieur le Professeur Jean Malécha
Rapporteurs: Monsieur le Docteur Olivier Bosler
Monsieur le Professeur Gérard Tramu
Examineurs: Madame le Professeur Maryvonne Leclerc
Monsieur le Professeur Marc-Pierre Mazzuca
Madame le Docteur Hélène Pollard
Directeur de thèse: Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain



AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille et la Région Nord-Pas-de-Calais qui, en m'attribuant une allocation de recherche, ont permis la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur Jean Malecha,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury, je vous en remercie.

Monsieur le Docteur Olivier Bosler,

Votre compétence dans le domaine de la microscopie électronique est telle que je suis particulièrement honoré de vous compter parmi mes juges.

Monsieur le Professeur Gérard Tramu,

Votre renommée en neuroendocrinologie est telle qu'il vous revient tout naturellement de juger ce travail.

Madame le Professeur Maryvonne Leclerc,

Malgré vos lourdes charges scientifiques au Muséum National d'Histoire Naturelle, vous me faites l'honneur de siéger à ce jury. Je vous en remercie.

Monsieur le Professeur Marc-Pierre Mazzuca,

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et soutenu au cours de ces années de préparation de thèse. Je vous exprime toute ma gratitude.

Madame le Docteur Hélène Pollard,

Vos nombreux conseils nous ont permis de réaliser cette étude. Soyez en remercié. Je vous remercie également d'avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain,

Vous avez dirigé mes travaux et su me communiquer votre intérêt pour la recherche. Je rends hommage à vos qualités scientifiques et humaines. Je vous suis reconnaissant et vous remercie.

Je remercie également:

Monsieur Philippe Ciofi, qui n'a ménagé ni son temps ni son aide à mon égard.

Monsieur Pierre Poulain, qui m'a permis de mener à bien les études de liaison.

Madame Valérie Mitchell, qui m'a initié à la radioautographie ultrastructurale.

Madame Dominique Croix et Mademoiselle Isabelle Dutriez, pour leurs conseils avisés.

Madame Marie-Claire Peers, qui m'a apporté aide et conseils lors de la rédaction du manuscrit.

Madame Françoise Bonet dont la longue expérience dans le domaine de la radioautographie m'a été précieuse.

Madame Danièle Deneux et Mademoiselle Soizic Dutoit qui m'ont apporté leur indispensable aide.

J'exprime tous mes remerciements aux membres de l'Unité INSERM 422 (ex-U156) et du Laboratoire d'Histologie.

Ce travail a été réalisé à l'Unité INSERM "Neuroendocrinologie et physiopathologie neuronale" (U 422) et a donné lieu aux publications et aux communications suivantes:

Publications:

1 Vandenbulcke F., Pollard H., Mitchell V., Beauvillain J. C. (1993) Radioimmunocytochemical distribution of neutral endopeptidase (Enkephalinase E.C.3.4.24.11.) at the ultrastructural level in the Rat median eminence. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 5, 205-212.

2. Vandenbulcke F., Ciofi P., Beauvillain J. C. (1994). Concomitant variation in immunoreactivity for enkephalins and neutral endopeptidase in the median eminence of the lactating rat. *Neuroscience letters*, Vol. 175, 53-57.

3. Vandenbulcke F., Ciofi P., Beauvillain J. C. Detection of neutral endopeptidase (NEP, enkephalinase, E.C.3.4.24.11) in relation to dopaminergic and gonadolibérinergic nerve endings in the median eminence of the male rat: a double labeling ultrastructural study. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 6, 655-664.

Communications:

1. Beauvillain J. C., Vandenbulcke F., Mitchell V., Poulain P., Pollard H., Moysé E et Mazzuca M. Arguments morphologiques ultrastructuraux en faveur d'une action des enképhalines sur des prolongements tancytaires dans l'éminence médiane.

Colloque de la Société des Neurosciences. Strasbourg, 4-7 Mai 1992.

2. Vandenbulcke F., Deneux D., Mitchell V., Beauvillain J. C. Arguments morphologiques ultrastructuraux en faveur de l'existence d'une modulation de type paracrine dans l'éminence médiane du Rat. 75^{em} Congrès de l'Association des Anatomistes. Lille, 12-14 Mai 1993.

3. Vandenbulcke F., Ciofi P., Deneux D., Beauvillain J. C. Modulation enképhalinergique indirecte de la libération de GnRH dans l'éminence médiane du Rat: arguments morphologiques. 22^{em} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale. Leuven, 8-10 Septembre 1993.

4. Vandenbulcke F., Ciofi P., Dutriez I., Deneux D., Beauvillain J. C. Enkephalins modulate median eminence GnRH release through a dopaminergic mechanism: morphological evidence. Society for Neuroscience. Washington, 7-12 November 1993.

5. Vandenbulcke F., Ciofi P., Beauvillain J.C. Variation concomitante d'immunoréactivité pour l'endopeptidase neutre et les enképhalines dans l'éminence médiane du Rat pendant la lactation. 23^{em} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale. Sophia Antipolis, 1-3 Septembre 1994.

6. Vandenbulcke F., Ciofi P., Beauvillain J.C. Concomitant variation in immunoreactivity for enkephalins and neutral endopeptidase in the median eminence of lactating rats. Society for Neuroscience. Miami Beach, Florida, 13-18 November 1994.

ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
GENERALITES	14
A- L'ENDOPEPTIDASE-24.11	14
B- LES ENKEPHALINES	16
C- ROLE DES ENKEPHALINES DANS LA REGULATION DES FONCTIONS NEUROENDOCRINES	18
D- LES RECEPTEURS AUX OPIOIDES	19
MATERIEL ET METHODES	25
A- SUJETS EXPERIMENTAUX	25
1) Animaux, conditions d'élevage	25
2) Sacrifice et dissection	25
B- IMMUNOCYTOCHIMIE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	25
1) Préparation des tissus	26
<i>a) Sacrifice des animaux</i>	
<i>b) Confection des coupes</i>	
2) Origine, préparation et spécificité des immunosérums	26
<i>a) Anti-octapeptide</i>	
<i>b) Anti-neurokinines</i>	
<i>c) Anti-endorépeptidase-24.11</i>	
3) Réactions immunocytochimiques	29
<i>a) Macroradioautographie et radioimmunocytochimie sur coupes au cryostat</i>	
<i>b) Immunocytochimie sur coupes à congélation</i>	
4) Contrôles	30
5) Quantification de l'immunomarquage	30

C- RADIOIMMUNOCYTOCHIMIE A L'ECHELLE ULTRASTRUCTURALE

1) Préparation des tissus	31
2) Traitement des coupes épaisses	31
<i>a) Immunocytochimie et inclusion</i>	
<i>b) Confection des coupes à l'ultramicrotome</i>	
3) Radioautographie des coupes semi-fines	32
4) Radioautographie des coupes ultrafines	32
5) Analyse des radioautographies	33

D- DOUBLES MARQUAGES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1) Préparation des tissus	34
2) Doubles marquages immunocytochimiques et inclusion	34
3) Contrôles	36
4) Analyse des radioautographies	36

E- MISE EN EVIDENCE DE SITES DE LIAISON

1) Liaison de la Deltorphin-I	42
<i>a) Préparation des tissus</i>	
<i>b) Technique de liaison de la Deltorphin-I</i>	
2) Liaison du FK-33824	43
<i>a) Préparation des tissus</i>	
<i>b) Technique de liaison du FK-33824</i>	
3) Traitement histologique des coupes épaisses	44
4) Analyse des radioautographies	45

RESULTATS

A- DISTRIBUTION DE L'ENDOPEPTIDASE-24.11 DANS L'EMINENCE MEDIANE DU RAT

1) Macroradioautographie	49
2) Radioautographie sur coupes semi-fines	49

3) Radioautographie à l'échelle ultrastructurale	49
B- DOUBLES MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES	53
1) Microscopie photonique	53
<i>a) Coupes au vibratome</i>	
<i>b) Coupes semi-fines</i>	
2) Microscopie électronique	53
<i>a) Double marquage endopeptidase-24.11/tyrosine hydroxylase</i>	
<i>b) Double marquage endopeptidase-24.11/gonadolibérine</i>	
<i>c) Double marquage endopeptidase-24.11/corticolibérine</i>	
<i>d) Double marquage endopeptidase-24.11/somatostatine</i>	
<i>e) Double marquage endopeptidase-24.11/somatolibérine</i>	
<i>f) Double marquage endopeptidase-24.11/thyrolibérine</i>	
C- L'ENDOPEPTIDASE-24.11 PENDANT LA LACTATION	60
1) Détection radioimmunocytochimique de l'endopeptidase-24.11	60
<i>a) Macroradioautographie</i>	
<i>b) Radioimmunocytochimie sur coupes au cryostat</i>	
2) Détection immunocytochimique de neuropeptides	61
<i>a) Détection des enképhalines</i>	
<i>b) Détection des neurokinines</i>	
D- MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS AUX ENKEPHALINES	63
1) Récepteurs opioïdes de type δ	63
2) Récepteurs opioïdes de type μ	63
DISCUSSION	65
CONCLUSION	90
BIBLIOGRAPHIE	93

ABBREVIATIONS

Liste des abréviations

ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
AchE	acétylcholinestérase
ACTH	hormone adrénocorticotrope
APM	aminopeptidase M
ARNm	acide ribonucléique messenger
β-END	β-endorphine
BSA	sérum albumine bovine
CRF	corticolibérine
DA	dopamine
DAB	diaminobenzidine
DOM	densité optique moyenne
DYN	dynorphine
E-24.11	endopeptidase-24.11
E.P	prolongement épendymaire
EM	éminence médiane
ENK	enképhalines
FSH	hormone folliculostimulante
GH	hormone de croissance
GnRH	gonadolibérine
GRF	somatolibérine
LH	hormone lutéinisante
NK	neurokinine
NPV	noyau paraventriculaire
NSO	noyau supraoptique
PIF	facteur inhibant la prolactine
POMC	proopiomélanocortine
PP	postpartum
PRL	prolactine
proDYN	prodynorphine
proENK	proenképhaline
RIA	radioimmunoassay
SNC	système nerveux central
SOM	somatostatine
TH	tyrosine hydroxylase

TIDA	tubéro-infundibulaire dopaminergique
TN	terminaison nerveuse
TRH	thyrolibérine
TSH	hormone thyroïdienne

INTRODUCTION

INTRODUCTION

En 1975, Hughes *et al.* découvrent l'existence dans des extraits de cerveaux, de substances mimant les effets de la morphine. La même année, ces auteurs isolent et caractérisent les premières molécules endogènes possédant une activité opiacée et une forte affinité pour des récepteurs opioïdes: les enképhalines (ENK). Les ENK sont en fait 2 pentapeptides, la met-ENK (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) et la leu-ENK (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Depuis cette découverte, environ une douzaine de peptides possédant une activité opioïde a été caractérisée.

Mis à part les ENK, les principaux sont les endorphines (Cox *et al.*, 1976; Bradbury *et al.*, 1976) et les dynorphines (Goldstein *et al.*, 1979). Tous ces peptides opioïdes sont issus de 3 précurseurs protéiques, la proopiomélanocortine (POMC), la proenképhaline (proENK) et la prodynorphine (proDYN), codés par des gènes différents dont la structure est connue.

La POMC, qui fut le premier précurseur découvert, cloné et séquencé (Nakanishi *et al.*, 1979; Mains *et al.*, 1977), donne naissance par clivage aux endorphines, à l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et aux hormones mélanotropes (α -, β -, γ -MSH). Le lobe intermédiaire de l'hypophyse est particulièrement riche en POMC, et la β -endorphine (β -END) est le peptide opioïde majeur dérivé de ce précurseur.

La séquence de la proENK et de ses gènes fut déterminée dans les années qui suivirent (Comb *et al.*, 1982; Gubler *et al.*, 1982; Noda *et al.*, 1982; Howells *et al.*, 1984; Yoshikawa *et al.*, 1984). La proENK contient 1 copie de leu-ENK, 4 copies de met-ENK, 1 copie de l'heptapeptide met-enképhaline-Arg-Phe et 1 copie de l'octapeptide met-enképhaline-Arg-Gly-Leu.

Enfin, le dernier précurseur opioïde cloné fut la proDYN (Kakidani *et al.*, 1982; Fishli *et al.*, 1982; Horikawa *et al.*, 1983). Ce précurseur donne naissance aux dynorphines A et B et aux α - et β -néoendorphines.

Les 3 précurseurs protéiques sont en fait des produits primaires de gènes qui contiennent la séquence de peptides opioïdes biologiquement actifs. Ces produits subissent une maturation qui conduit à la formation des peptides opioïdes actifs (Patey et Rossier, 1986; Simon, 1991).

De nombreuses études immunocytochimiques ont permis de caractériser les différentes régions du cerveau contenant les principaux peptides opioïdes (Petrusz *et al.*, 1985; Khachaturian *et al.*, 1985; Fallon et Ciofi, 1990). L'hypothalamus médiobasal est particulièrement riche en peptides opioïdes. En effet, les 3 familles μ sont représentées (Miller *et al.*, 1978; Petrusz *et al.*, 1985; Khachaturian *et al.*, 1985; Fallon et Ciofi, 1990). Parallèlement, la présence de récepteurs opioïdes fonctionnels dans cette région a été démontrée par des études physiologiques et électrophysiologiques (Carette et Poulain, 1978; Carette, 1981; Mac Millan et Clarke, 1983; Loose et Kelly, 1989; 1990; 1991)

Quel que soit le mode d'administration, la morphine et les peptides opioïdes modulent les sécrétions hypophysaires d'hormone lutéinisante (LH), d'hormone folliculo-stimulante (FSH), de prolactine (PRL), d'hormone thyrotrope (TSH), d'hormone corticotrope (ACTH) et d'hormone de croissance (GH) (Barraclough et Sawyer, 1975; Bruni *et al.*, 1977; Pang *et al.*, 1977; Shaar *et al.*, 1977; Cicero *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1977; 1979; Holaday et Loh, 1979; Jacob, 1979; Meites *et al.*, 1979; Buckingham, 1982). Les opioïdes agissent au niveau hypothalamique et non pas hypophysaire puisqu'*in vitro*, aucune action directe sur l'antéhypophyse n'est visible (Grandison et Guidotti, 1977; Rivier *et al.*, 1977; Cicero *et al.*, 1977; Buckingham, 1982; Buckingham et Cooper, 1986).

D'autres types d'approche ont démontré l'importance des peptides opioïdes dans les régulations endocrines.

-Pour la fonction gonadotrope, l'administration périphérique de naloxone chez le Rat bloque les récepteurs opioïdes endogènes et entraîne une nette augmentation de la sécrétion d'hormone gonadotrope (LH) (Bruni *et al.*, 1977; Kalra et Kalra, 1983; Orstead et Spies, 1987). Il a également été démontré que des peptides opioïdes tels que la β -END, la DYN et la met-ENK inhibaient la sécrétion de LH *in vivo* (Bruni *et al.*, 1977; Kinoshita *et al.*, 1982; Leadem et Kalra, 1985). D'autre part, la libération de la gonadolibérine (GnRH) à partir d'hypothalamus *in vitro* augmente après l'action de la naloxone (Leadem *et al.*, 1985; Wilkes et Yen, 1981). Par conséquent, ces travaux suggèrent que la sécrétion du GnRH est sous le contrôle d'une inhibition assurée par des peptides opioïdes endogènes (voir Clough *et al.*, 1990). L'existence d'une action inhibitrice des opioïdes sur la

sécrétion du GnRH est également évoquée chez le Mouton (Weesner et Malven, 1990; Whistnant *et al.*, 1991).

-La sécrétion de PRL est stimulée par l'administration périphérique de morphine ou de peptides opioïdes (Bruni *et al.*, 1977; Cocchi *et al.*, 1977; Cusan *et al.*, 1977; Grandison et Guidotti, 1977; Rivier *et al.*, 1977). Inversement, la naloxone bloque la libération de PRL induite lors d'un stress ou lors de la tétée (Grandison et Guidotti, 1977; Van Vugt *et al.*, 1978; Dupont *et al.*, 1979). Chez le rat, le pic de PRL observé en prooestrus est également supprimé par la naloxone (Ieiri *et al.*, 1980). Ces travaux montrent donc que des peptides opioïdes endogènes jouent un rôle physiologique majeur dans le contrôle de la sécrétion de PRL. En fait, cette action est vraisemblablement une conséquence de l'action des peptides opioïdes sur le système tubéro-infundibulaire dopaminergique (TIDA) car il a été démontré que l'administration de morphine ou de peptides opioïdes à des rats entraîne une réduction significative de la sécrétion de dopamine (DA) dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire (Gudelsky et Porter, 1979; Haskins *et al.*, 1981). D'autres études (Ferland *et al.*, 1977; Deyo *et al.*, 1979; Enjalbert *et al.*, 1979; Van Vugt *et al.*, 1979; Van Loon *et al.*, 1980; Reymond *et al.*, 1983; Manzanares *et al.*, 1992) prouvent aussi que les opioïdes inhibent l'activité des neurones TIDA. La DA étant le principal facteur inhibant la PRL ou Prolactin Inhibiting Factor (PIF) (MacLeod *et al.*, 1970; Gudelsky, 1981; Ben-Jonathan, 1985), le contrôle que les opioïdes exercent sur la sécrétion de PRL se fait donc probablement via la DA. Comme la DA est également impliquée dans la régulation du GnRH (Lichteinsteiger, 1969; Kordon et Glowinski, 1969; Kamberi *et al.*, 1970; Schneider et Mc Caan, 1970; Rotsztein *et al.*, 1977; Barraclough et Wise, 1982; Kalra et Kalra, 1983), on peut également penser que l'action inhibitrice des opioïdes sur la sécrétion de LH évoquée dans le paragraphe précédent s'exerce via une action sur la DA.

-L'hormone de croissance hypophysaire (GH) est également augmentée après administration périphérique de morphine (Kokka *et al.*, 1972; Ferland *et al.*, 1977; Bruni *et al.*, 1977; Holaday et Loh, 1979). Une action stimulatrice de la β -END sur la libération de GH *in vivo* a également été rapportée (Dupont *et al.*, 1977; Rivier *et al.*, 1977). Cependant, actuellement rien ne permet de préciser si cette action opioïde s'exerce directement sur le

système à somatolibérine (GRF) ou indirectement, par une action inhibitrice sur la somatostatine (SOM) qui inhibe la sécrétion de GH.

-Les opioïdes ont une action stimulatrice sur la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) par l'hypophyse antérieure *in vivo* (George et Way, 1959; Lotti *et al.*, 1969; George, 1971; Van Ree *et al.*, 1976; Gibson *et al.*, 1979). Des expériences menées *in vitro* excluent l'action directe des opioïdes sur les cellules corticotropes de l'adénohypophyse (Buckingham, 1982). Sur préparation d'hypothalamus *in vitro*, la morphine et les ENK modulent la libération de corticolibérine (CRF) et cet effet disparaît en présence de naloxone (Buckingham, 1982). En conséquence, la morphine et les ENK sont capables d'induire une activité de l'axe corticotrope en agissant au niveau de l'hypothalamus. Les opioïdes seraient donc impliqués dans le contrôle physiologique de la sécrétion du CRF.

-L'administration périphérique de morphine ou de met-ENK entraîne une baisse de la concentration sérique de TSH (Bruni *et al.*, 1977). L'existence d'une action opioïde inhibitrice au niveau hypothalamique est donc envisageable.

En conclusion, les opioïdes sont donc impliqués dans la plupart des fonctions neuroendocrines et agissent essentiellement au niveau hypothalamique.

L'action des peptides opioïdes sur les neurones synthétisant les facteurs hypophysiotropes peut s'exercer à 2 niveaux:

- au niveau des corps cellulaires de ces neurones en modifiant essentiellement la synthèse et vraisemblablement le flux dans les axones des substances synthétisées
- au niveau de la zone de libération des neurohormones

Une étude ultrastructurale, réalisée chez le Singe par Thind et Goldsmith en 1988, montre que des corps cellulaires à GnRH sont directement contactés par des neurones opioïdergiques (β -END). Ce travail constitue une des premières preuves morphologiques soutenant l'existence d'une influence inhibitrice des opioïdes sur l'activité de neurones à GnRH. Dans le noyau arqué, de nombreux travaux ont également démontré

l'existence d'une innervation de corps cellulaires par des peptides opioïdes. Dès 1986, Morel et Pelletier ont pu mettre en évidence l'existence d'afférences contenant des endorphines au contact de neurones à DA, ce qui a d'ailleurs été confirmé depuis par Horvath *et al.* 1992. Zhang *et al.* (1987) ont également observé que des neurones à POMC localisés dans l'hypothalamus médiobasal pouvaient eux-mêmes être régulés par des peptides opioïdes d'une autre famille, comme les ENK. Ces ENK peuvent d'ailleurs avoir une origine très variée (Magoul *et al.*, 1993a).

Plus récemment, une étude morphologique menée en microscopie électronique montre que 70% des corps cellulaires dopaminergiques du noyau arqué reçoivent une innervation marquée par un anti-DYN (Fitzsimmons *et al.*, 1992). Dans le noyau paraventriculaire (NPV), des péricaryons à CRF sont innervés par des neurones à POMC (Liposits *et al.*, 1988).

L'ensemble de ces observations montre donc qu'il existe une régulation directe au niveau de corps cellulaires impliqués dans les régulations neuroendocrines par les différents peptides opioïdes.

L'existence d'une modulation exercée par les peptides opioïdes au niveau même de la zone de libération des neurohormones a été suggérée par de très nombreux auteurs. Cependant, il existe très peu d'arguments morphologiques permettant d'affirmer la réalité de cette régulation.

Il faut rappeler que les terminaisons nerveuses (TN) contenant les neurohormones sont concentrées dans une structure appelée éminence médiane (EM). Sa zone interne contient surtout des axones à destination de la neurohypophyse alors que c'est dans sa zone externe que l'on trouve les TN contenant les neurohormones. (voir Fig. 1). Ces TN sont au contact des capillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire et déversent ainsi leurs substances dans le sang. La zone externe de l'EM correspond en fait au dernier maillon des circuits neuroendocriniens intervenant dans le contrôle de l'activité antéhypophysaire. Les facteurs hypophysiotropes ne sont jamais seuls dans les boutons terminaux mais sont colocalisés avec un certain nombre d'autres neurotransmetteurs et neuropeptides dont les peptides opioïdes.

Certains peptides opioïdes comme les ENK sont abondants dans la zone externe de l'EM et sont capables de moduler les sécrétions hypophysaires. Dans un premier temps on a logiquement imaginé qu'ils avaient une action

directe sur l'hypophyse, mais en fait cette action directe sur les cellules antéhypophysaires n'a jamais pu être démontrée. Ces résultats ont donc contribué à suggérer l'existence d'actions locales au niveau même de l'EM, impliquant par là même la présence de récepteurs. Malheureusement, jusqu'à maintenant, les approches radioautographiques classiques n'ont pas véritablement permis de visualiser des récepteurs aux peptides opioïdes dans l'EM du Rat (Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987; Desjardins *et al.*, 1990). Sur le plan morphologique seule une observation, menée à l'échelle ultrastructurale (Beauvillain *et al.*, 1992), démontre dans la zone externe de l'EM de Cobaye, l'existence de sites de liaisons de type μ pour des peptides opioïdes.

Cette pauvreté d'arguments morphologiques en faveur d'une action locale des peptides opioïdes contraste avec l'abondance des expériences physiologiques et biochimiques qui, s'intéressant surtout à la régulation du GnRH, considèrent comme inéluctable l'existence d'un tel type de régulation (Gambacciani *et al.*, 1986a; 1986b; Negro-vilar, 1982; Rasmussen, 1988). Pour certains auteurs, l'action opiacée pourrait s'exercer directement sur les TN à GnRH (Rotsztein *et al.*, 1978; 1982; Drouva *et al.*, 1981) mais pour d'autres, cette action opiacée pourrait se faire par l'intermédiaire des TN dopaminergiques (Leadem *et al.*, 1985; Rasmussen, 1988; Arita et Kimura, 1988).

A noter enfin que Rotsztein *et al.* (1982) et Drouva *et al.* (1981) suggèrent un effet local des peptides opioïdes sur la libération de somatostatine.

Une grande partie des auteurs qui envisagent la possibilité d'actions locales par des peptides opioïdes suggèrent plutôt une action de la β -END bien qu'en immunocytochimie très peu de TN soient observées dans la zone externe de l'EM. Par contre, l'action locale des ENK et de la DYN est moins souvent envisagée alors qu'en immunocytochimie, ces peptides apparaissent nettement plus abondants dans la zone externe de l'EM.

Par conséquent, il ressort de tous ces travaux:

- qu'il existe vraisemblablement une action locale opiacée dans l'EM mais très peu d'arguments morphologiques étayent cette action
- que l'implication exacte des différents types de peptides opioïdes dans le contrôle de certaines sécrétions hypophysaires au niveau de l'EM n'est pas connue

- que les sites éventuels d'action des peptides opioïdes sont à déterminer.

Notre travail a donc pour but de répondre à un certain nombre de ces interrogations. Ne pouvant pas évidemment résoudre l'ensemble des problèmes évoqués, nous nous sommes intéressés aux points suivants:

1- y-a-t-il des arguments morphologiques en faveur d'une action locale des enképhalines dans l'éminence médiane?

2- si oui, sur quels types de terminaisons peuvent agir ces enképhalines?

3- existe t-il des circonstances physiologiques particulières dans lesquelles on puisse démontrer que les enképhalines ont une action locale?

Compte tenu de la taille des structures de l'EM, l'étude ne peut être envisagée qu'en microscopie électronique. La mise en évidence de récepteurs aux ENK pouvait à priori apparaître comme l'outil de choix pour démontrer que ce neuropeptide possède une action dans l'EM. Cependant, cette approche a été immédiatement éliminée pour deux raisons essentielles: 1-) il n'y a pas de récepteurs opioïdes strictement spécifiques des ENK, 2-) en microscopie électronique, la détection des récepteurs au moyen de ligands radioactifs est très difficilement couplable à une détection immunocytochimique d'un neuropeptide et par conséquent la caractérisation chimique de la TN n'est pas possible.

Lorsqu'un neuropeptide est libéré pour agir sur un récepteur il est ensuite inactivé grâce à l'intervention de neuropeptidases d'inactivation qui sont plus ou moins spécifiques de ce neuropeptide (Turner *et al.*, 1985; Mc Kelvy et Blumberg, 1986; Schwartz *et al.*, 1986). En ce qui concerne les ENK, celles-ci sont notamment inactivées par l'endopeptidase-24.11 (E.C.3.4.24.11; enképhalinase; endopeptidase neutre; NEP; E-24.11).

L'E-24.11 est une enzyme membranaire de dégradation impliquée dans l'inactivation biologique des ENK mais pas de la β -END ni de la DYN (Roques *et al.*, 1980; Patey *et al.*, 1981; Alstein *et al.*, 1983; Schwartz, 1983; Schwartz *et al.*, 1985; Lynch et Snyder, 1986; Mc Kelvy et Blumberg, 1986; Bourgoin *et al.*, 1986; Schwartz *et al.*, 1986; Schwartz, 1988). Par contre, d'autres peptides, et plus particulièrement la substance P, sont de potentiels substrats de l'enképhalinase.

Cependant, l'abondante littérature (voir Etat des connaissances), nous a permis de penser que dans l'EM, la présence d'E-24.11 pouvait être un excellent indicateur d'une action des ENK.

Le but du travail a donc été de

1- localiser et établir la distribution ultrastructurale de l'E-24.11 dans l'EM du Rat. L'enzyme est détectée par radioimmunocytochimie.

2- déterminer la nature des systèmes neuroendocriniens exprimant l'enzyme. La détection radioimmunocytochimique de l'E-24.11 nous permet en effet de réaliser des doubles marquages immunocytochimiques en microscopie électronique et de caractériser ainsi les types de terminaisons nerveuses (TN) marqués par l'anti-enzyme. Nous détecterons successivement les TN à dopamine, à gonadolibérine, à corticolibérine, à somatostatine, à somatolibérine et à thyrolibérine.

3- d'observer les variations éventuelles du taux d'enzyme dans une condition physiologique particulière faisant fortement varier l'expression des ENK dans l'EM du Rat: la lactation (Fitzsimmons et Hoffman, 1989; Ciofi et al., 1993; Merchenthaler, 1993).

4- de déterminer par quels types de récepteurs opioïdes les enképhalines pouvaient agir.

Figure 1. Structure de l'éminence médiane.

(A) Coupe semi-fine frontale de la région infundibulaire (RI), à faible grossissement en microscopie photonique.

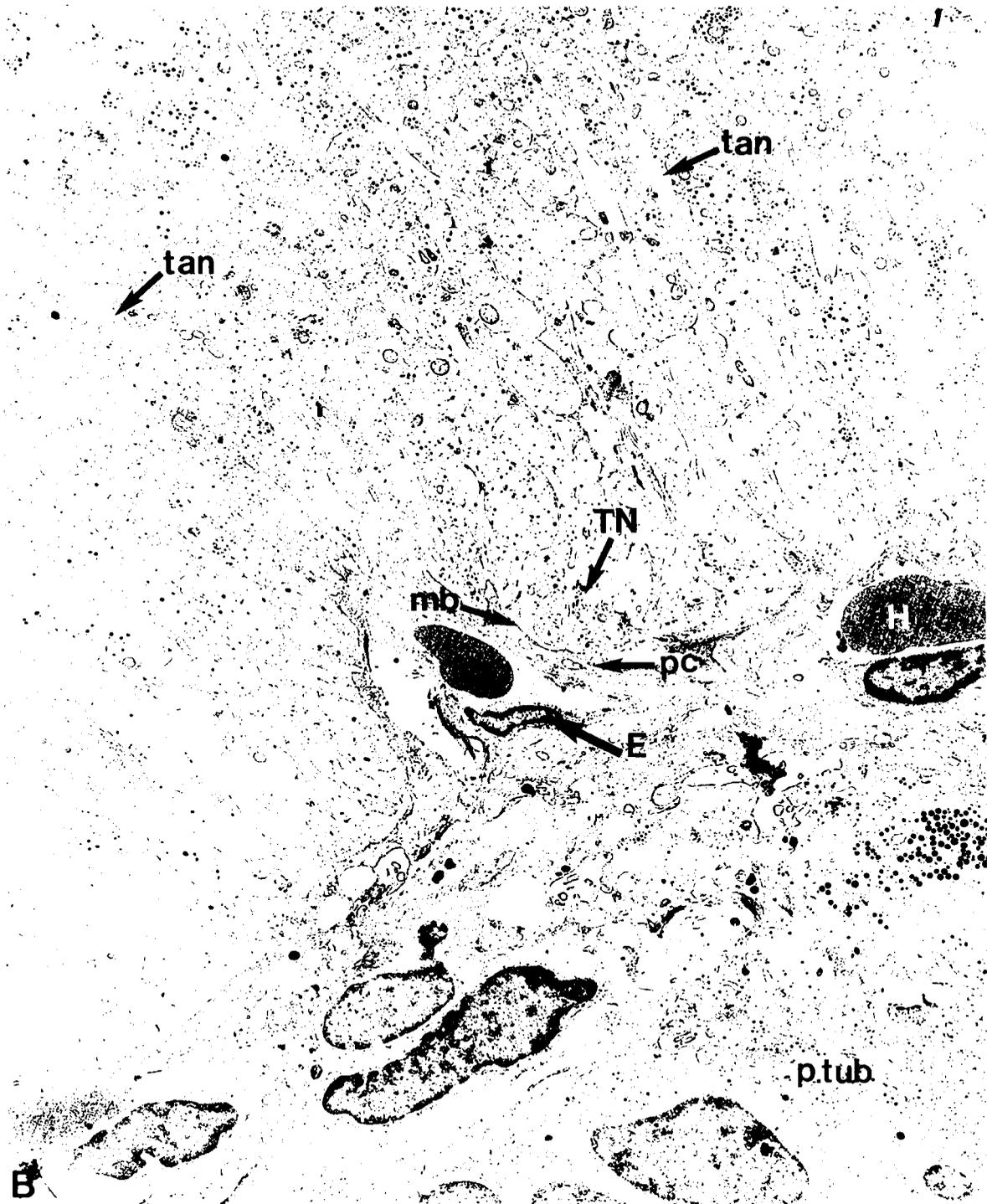
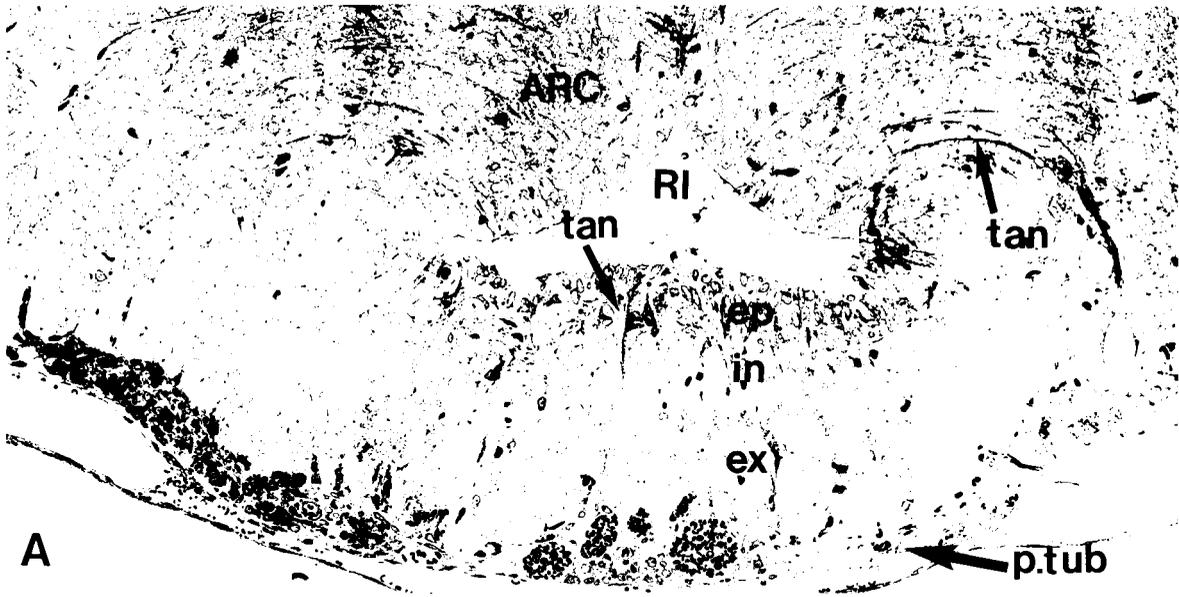
ARC, noyau arqué; ep, zone épendymaire; ex, zone externe; in, zone interne; p.tub, pars tuberalis; tan, tanocyte.

Barre d'échelle: 100 μm .

(B) Ultrastructure de la zone externe de l'éminence médiane, à faible grossissement en microscopie électronique.

E, cellule endothéliale fenêtrée du plexus porte primaire; H, hématie; mb, membrane basale; pc, espace péri-capillaire; p. tub, pars tuberalis; TN, terminaison nerveuse; tan, tanocyte.

Barre d'échelle: 4 μm .



GENERALITES

GENERALITES

A- L'ENDOPEPTIDASE-24.11

L'endopeptidase-24.11 (endopeptidase neutre, enképhalinase, E.C.3.4.24.11, E-24.11, NEP) isolée à partir de fractions membranaires de cerveau est semblable à l'E-24.11 initialement isolée dans le rein (Kerr et Kenny, 1974a; 1974b; Malfroy *et al.*, 1978; Almenoff *et al.*, 1981; Malfroy et Schwartz, 1982; Fulcher *et al.*, 1982; Matsas *et al.*, 1983; Almenoff et Orlowski, 1984). Il s'agit d'une métalloenzyme membranaire impliquée dans l'inactivation de la met- et de la leu-enképhaline. Le site de clivage se situe au niveau du pont Gly3-Phe4 (Malfroy *et al.*, 1978; Gorenstein et Snyder, 1980). *In vitro*, l'E-24.11 est également capable de cliver la substance P (Matsas *et al.*, 1983; Skidgel *et al.*, 1984; Matsas *et al.*, 1985), l'angiotensine (Swerts *et al.*, 1979; Gafford *et al.*, 1983), la cholécystokinine (Zuzel *et al.*, 1985), le facteur natriurétique atrial (Stephenson et Kenny, 1987; Sonnenberg *et al.*, 1988), la neurotensine (Checler *et al.*, 1983) et l'ocytocine (Turner *et al.*, 1985) (voir Tableau A). Ces travaux biochimiques suggèrent que l'E-24.11 est impliquée dans l'hydrolyse d'une grande variété de neuropeptides. Ces observations ne permettent cependant pas d'extrapoler le rôle biologique de l'E-24.11 dans le système nerveux central (SNC). En effet, une enzyme peut cliver un peptide *in vitro* et ne pas être impliquée dans l'inactivation biologique de ce peptide (Zuzel *et al.*, 1985).

Les constantes de spécificité, exprimées en K_{cat}/K_m relatif à la leu-ENK et qui traduisent l'affinité de l'enzyme pour les peptides, montrent que cette enzyme possède en fait une spécificité orientée. En effet, l'E-24.11 présente une affinité particulièrement élevée pour la substance P et les ENK et une affinité faible ou nulle pour les autres neuropeptides du SNC (voir Turner *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 1986). D'après les constantes de spécificité, l'E-24.11 du SNC serait essentiellement impliquée dans l'inactivation biologique de la substance P et des ENK. Effectivement, de nombreuses études *in vivo* montrent que l'E-24.11 du SNC inactive les ENK (Roques *et al.*, 1980; Patey *et al.*, 1981; Schwartz *et al.*, 1981; Alstein *et al.*, 1983; Schwartz, 1983; Schwartz *et al.*, 1985; 1986; Lynch et Snyder, 1986; Mc Kelvy et Blumberg, 1986; Bourgoin *et al.*, 1986) et la substance P (Mauborgne *et al.*, 1987; Littlewood *et al.*, 1988; Barnes *et al.*, 1993).

L'E-24.11 serait également impliquée dans l'inactivation de la neurotensine (Coquerel *et al.*, 1986; 1988; Kitabgi *et al.*, 1992) bien que l'affinité pour ce neuropeptide soit faible. Les travaux traitant du rôle de l'E-24.11 dans la dégradation de la neurotensine sont contradictoires, nous en parlerons dans la discussion.

Des études biochimiques réalisées sur membranes ont constaté que la distribution de l'E-24.11 dans différentes régions du cerveau du Rat (Sullivan *et al.*, 1978), de la Souris (Malfroy *et al.*, 1978; 1979), du Porc (Relton *et al.*, 1983) et de l'Homme (Llorens-Cortes *et al.*, 1982), était largement parallèle à la distribution des ENK. De plus, la cartographie de distribution de l'E-24.11 dans le SNC du Rat montre que la grande majorité des régions riches en E-24.11 sont également riches en ENK, ce qui constitue donc une base morphologique en faveur d'un rôle majeur de cette enzyme dans la dégradation des ENK du SNC (Pollard *et al.*, 1989).

L'activité de l'E-24.11 est fortement enrichie dans des fractions de membranes synaptiques contenant des récepteurs opioïdes (Alstein et Vogel, 1980; De La Beaume *et al.*, 1981) ce qui suggère l'existence d'une corrélation E-24.11/récepteurs opioïdes. De plus, il existe une bonne corrélation entre la distribution de l'E-24.11 et la distribution de récepteurs opioïdes de types μ et δ (Waksman *et al.*, 1986b; 1987).

Par conséquent, tous ces travaux montrent que les distributions régionales d'ENK, d'E-24.11 et de récepteurs opioïdes sont fortement parallèles. Ceci renforce l'idée que l'E-24.11 est impliquée dans l'inactivation biologique des ENK au niveau des sites d'action de celles-ci.

Il est généralement admis que l'E-24.11 est présente dans la membrane plasmique de la cible (Marcel *et al.*, 1990; Barnes *et al.*, 1992; 1993). Cependant, d'après Barnes *et al.* (1993), l'enzyme pourrait également être présente en position présynaptique.

L'E-24.11 a été mise en évidence à l'échelle ultrastructurale dans le néostriatum du Rat (Marcel *et al.*, 1990), dans le globus pallidus et la substance noire du Porc (Barnes *et al.*, 1988b; 1992; 1993) qui sont des structures contenant à la fois des ENK et de la substance P. Ces travaux sont autant d'arguments morphologiques en faveur de l'intervention de l'E-24.11 dans la dégradation des ENK et de la substance P.

L'abondance d'E-24.11 dans l'EM (Pollard *et al.*, 1989) nous a amené à penser que cette enzyme pouvait être considérée comme un bon indicateur d'une action locale de type paracrine et/ou autocrine sur les fonctions

neuroendocrines. La substance P étant quasiment absente de l'EM, on peut penser que l'E-24.11 présente dans cette région est essentiellement impliquée dans l'inactivation biologique des ENK.

B- LES ENKEPHALINES

La distribution des ENK dans le SNC des Mammifères a été étudiée par des techniques de dosage RIA (radioimmunoassay) et par des techniques de détection immunocytochimique. Les publications, particulièrement nombreuses, montrent que les ENK sont parmi les neuropeptides les plus largement distribués du SNC des Mammifères (Petrusz *et al.*, 1985; Merchenthaler *et al.*, 1986). De par leur très large répartition dans le SNC, les neurones contenant des ENK interviennent dans de nombreuses fonctions. Les neurones enképhalinerigiques sont souvent des interneurons de régulation mais peuvent également être des neurones de projection.

Il existe trois grandes voies enképhalinerigiques décrites chez le Rat: -la première est la longue voie enképhalinerigique issue des noyaux caudé et putamen et qui se projette dans le complexe striato-pallidal -la deuxième est la voie hypothalamo-éminence médiane-neurohypophyse dont les corps cellulaires sont situés dans le noyau paraventriculaire (NPV) et le noyau supraoptique (NSO) -la troisième est la voie hypothalamo-septale qui prend naissance dans la région périfornicale et se projette dans le septum latéral.

Dans l'hypothalamus, en plus des régions susdites, il existe des cellules enképhalinerigiques dans les noyaux ventromédian et arqué. Les techniques immunohistochimiques ont permis très tôt de mettre en évidence une quantité importante de TN contenant des ENK dans l'EM de Rat et de Cobaye (Hökfelt *et al.*, 1978; Tramu et Léonardelli, 1979). Les terminaisons marquées sont observées autour des capillaires des vaisseaux portes. A l'échelle ultrastructurale, les premières observations ont été effectuées chez le Cobaye (Beauvillain *et al.*, 1980) et ont montré que les ENK sont essentiellement localisées dans des granules ayant un diamètre d'environ 110 nm. Ces granules sont parfois au contact de l'espace péricapillaire entourant les capillaires fenêtrés.

En plus de ce marquage dans la zone externe, on a pu mettre en évidence, dans la zone interne, un marquage de fibres se projetant dans le lobe nerveux (Palkovits, 1982; Petrusz *et al.*, 1985; Merchenthaler, 1986).

En 1982, Romagnano *et al.* montrent, chez la Souris, qu'un traitement néonatal de monosodium glutamate, un neurotoxique provoquant une mort cellulaire dans le noyau arqué, entraîne une importante perte d'immunoréactivité pour les ENK dans la zone externe de l'EM. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une projection enképhalinergique du noyau arqué vers l'EM. Meister *et al.* (1989) ont confirmé cette observation chez le Rat et montré que cette projection se fait dans les régions latérales de la zone palissadique (synonyme de zone externe) de l'EM. Cependant, ces auteurs considèrent que l'importante population de TN enképhalinerghiques qu'ils observent dans la partie centrale de l'EM est originaire des régions parvocellulaires des noyaux paraventriculaires.

Une technique combinant à la fois le marquage rétrograde des neurones qui projettent dans la zone externe de l'EM et la détection immunocytochimique de neuropeptides a permis de montrer qu'effectivement, un grand nombre de neurones enképhalinerghiques de la partie parvocellulaire du NPV innervent la zone externe de l'EM (Merchenthaler, 1992). Par conséquent, les TN de l'EM contenant des ENK proviennent pour une petite part du noyau arqué (Meister *et al.*, 1989) et surtout de la région parvocellulaire du NPV (Merchenthaler, 1992). Compte tenu de la localisation des corps cellulaires dans le NPV, il semblait probable que les ENK pouvaient être coexprimées avec le CRF. Effectivement, Hökfelt *et al.* (1983) ont montré que le CRF et les ENK pouvaient être contenus dans les mêmes neurones dans la région parvocellulaire du NPV. Quelques années plus tard, Hisano *et al.* (1986) ont mis en évidence que des TN périportales chez le Rat contenaient à la fois des ENK et du CRF. Enfin, Ceccatelli *et al.* (1989) ont précisé qu'en fait 20% des cellules à CRF du NPV coexprimaient les ENK. L'importante population de TN à ENK observée dans la région médiane de la zone palissadique de l'EM (Meister *et al.*, 1989) correspondrait donc à des TN à CRF.

Pendant la lactation, le taux d'ENK de l'EM est particulièrement élevé. En 1993, Merchenthaler a constaté que l'expression des ENK contenues dans les neurones tubéroinfundibulaires dopaminergiques (TIDA) augmente pendant la lactation. Il est donc probable que la projection enképhalinerghique du noyau arqué, observée par Meister *et al.* (1989) corresponde à des neurones dopaminergiques, mais ceci reste à prouver car chez le mâle et la femelle normale, il n'a pas été véritablement montré une

coexpression de la DA et des ENK.

Par conséquent, on peut penser que chez le Rat, les ENK de l'EM sont contenues dans 2 grands systèmes hypophysiotropes: le système à CRF et le système à DA. Les ENK contenues dans ces systèmes sont, de par leur localisation, impliquées dans la régulation de fonctions neuroendocrines.

Les ENK sont également présentes dans le tractus hypothalamo-neurohypophysaire et sont observées dans les neurones à ocytocine (Martin *et al.*, 81; Adachi *et al.*, 1985).

Chez le Cobaye, autre animal de laboratoire très étudié, la situation est totalement différente. En effet, les ENK de l'EM externe proviennent du noyau périventriculaire et sont colocalisées avec la SOM (Tramu *et al.*, 1984; Beauvillain *et al.*, 1984).

C- ROLE DES ENKEPHALINES DANS LA REGULATION DES FONCTIONS NEUROENDOCRINES

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, l'influence des ENK sur les sécrétions hypophysiotropes peut potentiellement s'exercer à 2 niveaux de l'hypothalamus: les corps cellulaires et l'EM.

L'existence d'un contrôle au niveau des corps cellulaires est supportée par Fitzsimmons *et al.* (1992) qui montrent une innervation enképhalinergique de neurones à DA dans le noyau arqué. La DA est impliquée dans l'inhibition de la libération de PRL (Birge *et al.*, 1970; MacLeod *et al.*, 1970; Gudelsky, 1981; Ben Jonathan, 1985) et exerce une action stimulatrice sur la libération du GnRH (Brown, 1967; Barry et Léonardelli, 1968; Kordon et Glowinski, 1969; Lichteinsteiger, 1969; Kamberi *et al.*, 1970; Schneider et Mc Caan, 1970; Rotsztein *et al.*, 1977). Par conséquent, une action des ENK sur les fonctions gonadotrope et prolactinémique via des afférences sur les péricaryons à DA est envisageable. D'autre part, il existe des afférences enképhalinerghiques sur des cellules à POMC du noyau arqué se projetant sur des neurones à GnRH de l'aire préoptique (Zhang *et al.*, 1987).

Les travaux évoquant l'action spécifique des ENK dans l'EM sont peu nombreux bien que les ENK soient abondantes dans la zone de libération

des facteurs hypophysiotropes. Par ailleurs, il faut rappeler qu'aucune action hypophysiotrope directe des ENK sur l'adénohypophyse n'a été démontrée. Quelques travaux seulement suggèrent l'existence d'une action des ENK dans cette région (Rotsztein *et al.*, 1978; Ferland *et al.*, 1978; Drouva *et al.*, 1981; Rotsztein *et al.*, 1982; Arita et Kimura, 1988). Une action inhibitrice des ENK sur les TN à SOM de l'EM est envisageable (Drouva *et al.*, 1981), ce qui pourrait expliquer l'action stimulatrice des opioïdes sur la sécrétion de la GH (Kokka *et al.*, 1972, Ferland *et al.*, 1977). L'existence d'une action stimulatrice sur les TN à GRF, ne peut cependant pas être exclue. De même, Buckingham (1982) a montré que les ENK peuvent stimuler la sécrétion du CRF par l'hypothalamus mais le site d'action exact demeure inconnu. Une action des ENK sur les TN à CRF de l'EM, bien que non documentée, est possible. L'action stimulatrice des ENK sur la libération de la PRL serait, au moins en partie, exercée au niveau de la zone externe de l'EM. Cette action s'exercerait sur les TN dopaminergiques de l'EM (Ferland *et al.*, 1978; Arita et Kimura, 1988). A notre connaissance, aucune observation ne fait état d'un contrôle opioïde direct sur les TN à TRH de l'EM. Une telle action ne peut cependant pas être exclue. Enfin, il est actuellement impossible de préciser si l'influence que les ENK semblent avoir au niveau de l'EM sur la sécrétion du GnRH, s'exerce directement sur les TN à GnRH, indirectement via les TN à DA ou sur les 2 types de TN (Rotsztein *et al.*, 1978; Drouva *et al.*, 1981; Rasmussen, 1988).

D- LES RECEPTEURS AUX OPIOIDES

La découverte des ENK en 1975 (Hughes *et al.*, 1975) a initié des recherches afin de découvrir les récepteurs de ces opioïdes et l'année suivante, Martin et collaborateurs (Martin *et al.*, 1976; Gilbert et Martin, 1976) ont démontré l'existence d'au moins 3 types de récepteurs opioïdes qu'ils ont appelé μ , δ , κ . Depuis, d'autres travaux ont suggéré l'existence de sous-types de récepteurs (μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2) et d'un type de récepteurs très spécifiques de la β -END, le récepteur ϵ .

Néanmoins, les récepteurs opioïdes les plus étudiés, donc les mieux connus, sont les récepteurs de types μ , δ , κ (Wood et Iyengar S, 1988; Paterson *et al.*, 1983; Simon, 1991). Pour chacun de ces récepteurs, il existe des ligands très spécifiques qui permettent de les détecter et de les différencier. Nous n'en citerons que quelques uns. Le FK-33824 et la Diprenorphine sont des ligands

des récepteurs μ . La (D-Ala²)-Leu-Enképhaline, l'azido DTLET, la Deltorphin sont spécifiques des sites de liaison δ . La DP DYN, le CI-977 et le U-69593 reconnaissent les récepteurs de type κ (Fowler et Fraser, 1994).

Les récepteurs opioïdes sont capables de lier plus d'un opioïde endogène (Cox, 1982). Il existe cependant une spécificité orientée de chaque classe de récepteur. Le récepteur δ est un récepteur dont les ligands endogènes majeurs sont les ENK. Le récepteur κ semblent essentiellement médier les actions des dérivés de la proDYN (dyn A, dyn B, α et β néoendorphines). le récepteur μ semble pouvoir reconnaître plusieurs ligands endogènes, notamment la β -END et les ENK pour lesquelles le récepteur μ présente une forte affinité, seulement 10 à 20 fois plus faible que l'affinité du récepteur δ (Simon, 1991).

L'administration intrahypothalamique d'analogues opioïdes a de nombreux effets sur la physiologie de l'animal. Elle peut par exemple, provoquer une chute de la pression sanguine (Kregel *et al.*, 1985), stimuler l'appétit (Gosnell *et al.*, 1987) et moduler la libération de divers facteurs hypophysiotropes (Kalra *et al.*, 1987). Les peptides opioïdes de l'hypothalamus possèdent donc un rôle dans la régulation de certaines fonctions autonomes, comportementales et neuroendocrines.

Des techniques biochimiques de dosage de récepteurs (Chang et Cuatrecasas, 1979; Wolozin *et al.*, 1982) et des techniques de détection radioautographique (Atweh et Kuhar, 1977; Pearson *et al.*, 1980; Goodman *et al.*, 1980; Herkenham et Pert, 1980; 1982; Duka *et al.*, 1981; Wolozin *et al.*, 1982; Quirion *et al.*, 1983; Wamsley, 1983; Lynch *et al.*, 1985; Mc Lean *et al.*, 1986; Mansour *et al.*, 1986; 1987; Tempel et Zukin, 1987), ont montré que les 3 principaux types de récepteurs opioïdes sont présents dans l'hypothalamus des Mammifères.

Certains auteurs considèrent que l'hypothalamus est une région particulièrement riche en récepteurs de type μ (Atweh et Kuhar, 1977; Chang et Cuatrecasas, 1979; Goodman *et al.*, 80; Pearson *et al.*, 80; Duka *et al.*, 1981) alors que d'autres considèrent que cette région en contient très peu (Herkenham et Pert, 1980; 1982; Wolozin *et al.*, 1982; Quirion *et al.*, 1383; Mansour *et al.*, 1986; 1987; Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987). La densité de sites de liaison δ dans l'hypothalamus est considérée comme faible (Goodman *et al.*, 1980; Wolozin *et al.*, 1982; Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1986; Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987) ou modérée (Duka *et*

al., 1981). Quant aux récepteurs κ dans cette région, leur densité serait relativement importante et même supérieure aux densités de sites de liaison μ et δ (Lynch *et al.*, 1985; Morris et Hertz, 1986; Mansour *et al.*, 1987; Tempel et Zukin, 1987; Sharif et Hughes, 1989). Cependant, Jomary *et al.* (1988) ont montré une densité de sites de liaison κ beaucoup plus faible à l'aide de ligands hautement spécifiques. Tous ces travaux, parfois contradictoires, ne permettent pas de se faire une idée des proportions relatives des différents types de récepteurs dans l'hypothalamus.

En 1990, une étude centrée sur l'hypothalamus a été publiée par Desjardins *et al.*. Ces auteurs montrent que l'hypothalamus contient des quantités modérées mais mesurables de récepteurs opioïdes des 3 principaux types: μ , δ et κ . Le récepteur μ est le récepteur opioïde le mieux représenté dans cette région. Les 3 types de récepteurs étudiés sont relativement abondants dans le noyau suprachiasmatique et l'aire préoptique. Quelques sites de liaison μ et δ sont également détectés dans le NPV. Dans l'hypothalamus médiobasal, le noyau arqué possède les 3 types de récepteurs, mais en faible quantité. Par conséquent, la présence de récepteurs opioïdes dans des régions de l'hypothalamus impliquées dans les fonctions neuroendocrines (NPV, noyau arqué, aire préoptique) peut être mise en parallèle avec des travaux physiologiques suggérant l'intervention de récepteurs opioïdes dans la régulation de certaines fonctions neuroendocrines au niveau de l'hypothalamus (Pfeiffer *et al.*, 1983; Koenig *et al.*, 1984; Panerai *et al.*, 1985; Krulich *et al.*, 1986).

De plus, une équipe s'intéressant plus précisément à l'action des opioïdes au niveau du noyau arqué du Rat, a montré qu'un agoniste des récepteurs de type μ provoquait une hyperpolarisation des neurones (Loose et Kelly, 1989; Loose et Kelly, 1990; Loose *et al.*, 1991). Cette hyperpolarisation membranaire traduirait en fait l'inhibition opiacée dont certains neurones du noyau arqué sont l'objet. Ces neurones pourraient être dopaminergiques.

Peu d'études se sont intéressées à la présence éventuelle de sites de liaison opioïdes dans l'EM du Rat. Il n'a pas été mis en évidence de quantités significatives de récepteurs dans cette région (Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987; Desjardins *et al.*, 1990) bien que des travaux plus physiologiques prouvent leur présence (Drouva *et al.*, 1981; Rotsztein *et al.*, 1978; 1982; Rasmussen *et al.*, 1988; Arita et Kimura, 1988).

Exceptée une étude morphologique montrant la présence de récepteurs opioïdes de type μ dans l'EM du Cobaye à l'échelle ultrastructurale

(Beauvillain *et al.*, 1992), les méthodologies utilisées pour détecter les récepteurs opioïdes n'ont pas permis de déterminer d'une façon précise (à l'échelle cellulaire) leur localisation.

Ces 2 dernières années, le clonage des principaux récepteurs opioïdes (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993) a ouvert de nouvelles perspectives en permettant l'étude des récepteurs opioïdes par hybridation *in situ* (Chen *et al.*, 1993; Minami *et al.*, 1993; Mansour *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 1994). Ces travaux ont montré que les ARN messagers (ARNm) qui codent pour les 3 principaux types de récepteurs opioïdes (μ , δ , κ) ont une distribution très large dans le SNC du Rat.

Actuellement, peu d'informations sur la distribution de l'ARNm du récepteur δ dans l'hypothalamus sont disponibles; le travail de Mansour *et al.* (1993) montre cependant l'existence de l'ARNm du récepteur δ dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus. De plus, dans cette région, une faible densité d'ARNm du récepteur μ (Delfs *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 94) et une densité importante de l'ARNm du récepteur κ (Minami *et al.*, 93) sont détectées. Seule la distribution de l'ARNm du récepteur κ dans l'hypothalamus est bien établie: il existe une expression importante d'ARNm du récepteur κ dans des régions hypophysiotropes telles que le NPV, le NSO, l'aire préoptique et le noyau arqué (Minami *et al.*, 93; Mansour *et al.*, 1994b).

Les premiers résultats d'hybridation *in situ* ont montré pour les récepteurs opioïdes de type μ , δ et κ , une certaine corrélation entre la distribution de l'ARNm et la distribution des sites de liaison de ligands spécifiques dans le SNC (Mansour *et al.*, 1993; 1994a; 1994b; Delfs *et al.*, 94). Cependant, des régions riches en sites de liaison n'expriment pas forcément l'ARNm du récepteur correspondant et inversement, des régions ayant une forte expression d'ARNm pour un récepteur, ne sont pas systématiquement marquées par un ligand spécifique de ce récepteur. Ceci est vraisemblablement le reflet du transport de récepteurs en dehors de leur région de synthèse.

La mise en évidence des ARNm des récepteurs opioïdes par hybridation *in situ* est une technique compatible avec la détection immunocytochimique de peptides opioïdes. La réalisation de doubles marquages permettra sans aucun doute de mieux appréhender le rôle des opioïdes.

D'autre part, la connaissance de la séquence des différents récepteurs permet d'envisager la fabrication d'anticorps anti-récepteurs. Les premières études utilisant des anticorps anti-récepteurs ont fait l'objet de communications lors du 24^{em} Congrès de la Société des Neurosciences Américaine (Wessendorf *et al.*, 1994; Arvidsson *et al.*, 1994). La détection immunocytochimique des récepteurs opioïdes ouvre également de nouvelles perspectives. Cependant, compte tenu du marquage cellulaire obtenu (membranaire ou cytoplasmique) et des nombreux types et sous-types de récepteurs, l'interprétation des résultats s'avère d'ores et déjà délicate.

Tableau A: Substrats de l'endopeptidase-24.11

peptides	présence dans l'éminence médiane	constantes de spécificité	hydrolyse in vivo
-peptides opioïdes			
. Met-enképhaline	+	300	oui
. Leu-enképhaline	+	100	oui
. Heptapeptide	+	21	?
. dérivés de la POMC	+	0	
. dérivés de la prodynorphine	+	0	
-autres peptides			
. Substance P	-	362	oui
. Cholécystokinine-8	+	15	?
. Cholécystokinine-4	+	3	?
. Angiotensine II	+	24	?
. Neurotensine	+	10	?
. Facteur natriurétique atrial	+	non déterminée	oui (rein)

Tableau réalisé à partir des travaux de Turner *et al.*, 1985 et Schwartz *et al.*, 1986.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

A- SUJETS EXPERIMENTAUX

1) Animaux, conditions d'élevage

Les différentes observations et expérimentations sont menées chez des rats Wistar mâles adultes pesant environ 350g et des rates Wistar lactantes pesant environ 300g. Ces animaux proviennent de l'élevage Iffa Credo (Lyon, France), et sont soumis à un rythme d'éclairage artificiel 12h-12h, à une température de 20-22°C et ont libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson.

2) Sacrifice et dissection

Les animaux sont décapités sans anesthésie préalable. Le cerveau est alors rapidement disséqué, hypophyse attenante. Le cerveau est ensuite délimité de façon à obtenir un cube comportant l'hypothalamus, l'EM et l'hypophyse. Pour cela, nous éliminons à main levée les bulbes olfactifs, le cervelet et une partie du cortex. La limitation du volume des pièces facilite la pénétration du fixateur.

B- IMMUNOCYTOCHIMIE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Notre étude fait essentiellement appel à des techniques de microscopie électronique. Cependant, une approche en microscopie photonique a été utilisée pour l'étude de rates lactantes.

Dans cette partie de l'étude, 8 rates Wistar gestantes provenant de l'élevage Iffa Credo sont logées en cages individuelles, où elles mettent bas au bout de quelques jours. Deux jours après la parturition, les portées sont ajustées à 10 petits par femelle. Les animaux sont alors divisés en 2 groupes. Un lot comprend 4 femelles auxquelles les petits sont laissés jusqu'au jour 10 postpartum (jour 0 = jour de la naissance), ce lot est appelé: femelles lactantes (nursing females). L'autre groupe est constitué de 4 femelles séparées de leurs petits au jour 8 postpartum. Ce deuxième groupe est appelé: femelles séparées (separated females, no pups 48H).

1) Préparation des tissus

a) *Sacrifice des animaux*

Toutes les rates sont décapitées au jour 10 postpartum à 15H00. Le cerveau rapidement disséqué est immédiatement fixé par immersion 1 h à 20°C dans un mélange fixateur comprenant: 4% paraformaldéhyde, 0.2% d'acide picrique et 0.05% de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 0.1M pH 7.4 (Marcel *et al.*, 1990).

b) *Confection des coupes*

Après fixation et immersion pendant une nuit à 4°C dans du tampon phosphate 0.1M sucrose à 20% pH 7.2, les cerveaux sont congelés à l'aide de glace carbonique. Les blocs ainsi obtenus sont conservés à -80°C puis débités en coupes frontales de 10 µm d'épaisseur à l'aide d'un Cryostat Reichert-Jung. Toutes les coupes présentant l'EM sont récupérées sur des lames gélatinées (0.6% de gélatine, 0.2% alun de chrome) et sont conservées à -80°C jusqu'à la réalisation des détections immunocytochimiques.

2) Origine, préparation et spécificité des anticorps

a) *Anti-octapeptide*

Le système enképhalinergique de l'EM est mis en évidence à l'aide d'un immunosérum polyclonal anti-octapeptide [met]-enképhaline-Arg-Gly-Leu obtenu chez le lapin. La spécificité de l'immunomarquage vu avec cet immunosérum a été préalablement vérifiée (Magoul *et al.*, 1993a).

Ces auteurs ont montré que la réaction immunocytochimique obtenue avec cet immunosérum préalablement adsorbé par un excès de met-ENK, de leu-ENK, d'heptapeptide, de DYN 1-8 ou de DYN 1-17 est identique à la réaction obtenue avec l'immunosérum non adsorbé. En revanche, l'adsorption de l'immunosérum par l'octapeptide abolit le signal.

b) *Anti-neurokinines*

L'immunosérum anti-neurokinines utilisé dans ce travail a été obtenu par immunisation d'un lapin avec de la neurokinine A de synthèse liée à de la sérum albumine humaine. L'étude de spécificité montre que cet immunosérum reconnaît principalement la neurokinine A mais aussi la neurokinine B et la substance P (Magoul *et al.*, 1993b). Par conséquent, le

signal immunocytochimique observé à l'aide de cet immunsérum est un marquage anti-neurokinines (anti-NK).

c) Anti-endorphinase-24.11

L'E-24.11 est détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal de souris mAb 85A2 (don du Dr H. Pollard INSERM U29) dont la sélectivité et la sensibilité sont clairement établies (Pollard *et al.*, 1987a; 1987b; Ronco *et al.*, 1986; 1988). Pour les besoins de l'étude, l'anticorps monoclonal anti-E-24.11 (mAb 85A2) est iodé selon la méthode à la chloramine T (Mc Conahey et Dixon, 1966) suivant le protocole décrit en Annexe 1.

Annexe 1: Protocole d'iodation de l'anti-endopeptidase-24.11

-50 μg d'anticorps (3 mg/ml) c'est à dire 17.5 μl dans 50 μl de tampon phosphate K_2/K 0.1 M pH 7.4.

-ajout de 4 μl d'iode 125 (0.4 mCi).

-ajout de 4 μl chloramine T (3 mg/ml).

-contact 1 min en agitation avant l'adjonction de 4 μl de métabisulfite de sodium (6 mg/ml).

-agitation puis addition de 20 μl d'iodure de sodium 1M.

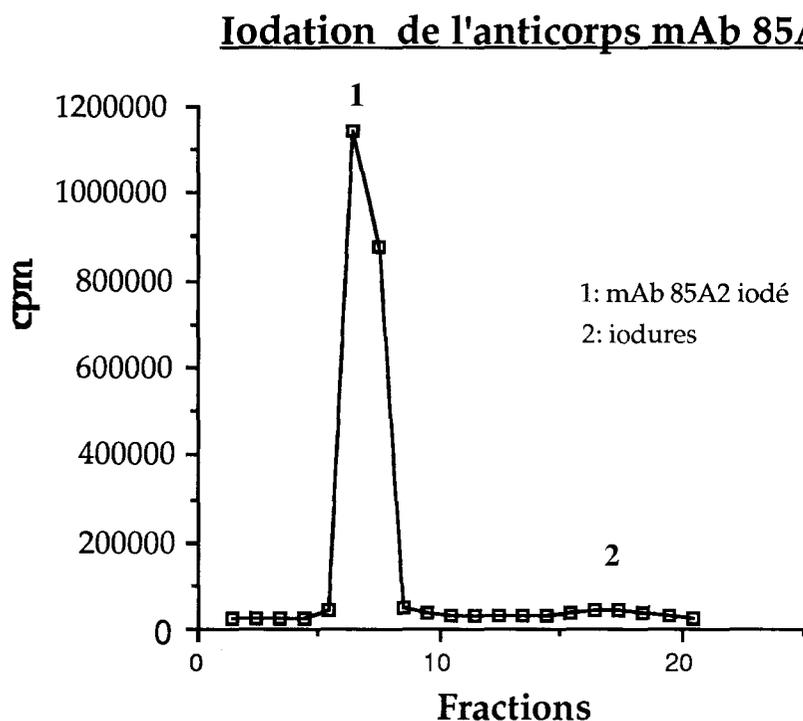
-dilution à 500 μl dans tampon phosphate K_2/K 0.1 M contenant 0.5% de sérum albumine bovine (BSA).

-gel filtration sur colonne PD 10 calibrée Pharmacia (Sephadex G25 medium), élution avec tampon phosphate K_2/K 0.1 M contenant 0.5% de BSA.

-collecte de 20 fractions de 1 ml.

-5 μl sont prélevés de chaque fraction et aussitôt comptés à l'aide d'un compteur gamma LKB.

-les fractions choisies sont conservées à 4°C en présence d'azide de sodium (0.25 mg/ml).



Nous avons utilisé les fractions 6 et 7.

3) Réactions immunocytochimiques

Des coupes sériées réalisées au cryostat, provenant de chaque animal, sont traitées afin de détecter l'E-24.11, les neurokinines (NK) et les enképhalines (ENK). Une réaction radioimmunocytochimique directe utilisant l'anticorps mAb 85A2 préalablement iodé est réalisée afin de détecter l'E-24.11. Quand aux NK et aux ENK, elles sont détectées par immunofluorescence indirecte.

a) Macroradioautographie et radioimmunocytochimie sur coupes au cryostat

Afin de détecter l'E-24.11 à l'aide de l'anticorps monoclonal iodé, des coupes à congélation, jusqu'alors stockées à -80°C , sont décongelées. Après un rinçage de 10 minutes dans du tampon Coons pH 7.4 (Annexe 2), les coupes sont préincubées 30 minutes à température ambiante dans du tampon Coons pH 7.4 contenant 20% de sérum de souris saines, puis rincées de nouveau 3 fois 3 minutes dans du tampon phosphate K_2/K 0.1 M pH 7.4.

Les coupes sont ensuite incubées 3 heures à température ambiante avec l'anti-E-24.11 iodé à raison de 300 000 cpm/coupe (activité spécifique 8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). L'anticorps est dilué dans du tampon phosphate K_2/K 0.1M contenant 0.2% de sérum BSA. Après 3 rinçages de 3 minutes dans le même tampon, les lames sont séchées puis recouvertes d'un film β - sensible (β max Amersham pour macroradioautographie) pendant 4 jours.

Le film de macroradioautographie est révélé dans du D19b pur (Kodak) 4 minutes 30 à 20°C , fixé dans du fixateur Unifix Kodak 5 minutes, puis séché avant d'être observé. Les coupes sont ensuite déshydratées, délipidées dans du toluène, réhydratées et séchées. Enfin, les lames sont recouvertes d'une émulsion liquide β - sensible (LM1 Amersham) pour microscopie photonique et placées en exposition 5 semaines à température ambiante dans des boîtes opaques en présence d'un dessiccant (silicagel, Prolabo). La révélation se fait également dans du D19b pur (2 minutes 30). La fixation dans du thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau (5 minutes).

b) Immunocytochimie sur coupes à congélation

Des coupes adjacentes provenant de chaque animal sont traitées afin de détecter soit les ENK, soit les NK.

Les ENK sont détectées suivant le protocole décrit ci-dessous:

Les coupes adjacentes choisies sont décongelées puis rincées pendant 10 minutes dans du tampon Coons pH 7.4. Elles sont ensuite incubées dans l'anticorps primaire anti-ENK (appelé IS 30) au 1/800 dans du tampon Coons contenant 0.25% de Triton X-100, une nuit à température ambiante. Après 3 rinçages de 3 minutes dans du tampon Coons pH 7.4, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin couplées à la FITC (Jackson immunoresearch, West Grove, PA) au 1/100 dans le tampon Coons pH 7.4 pendant 90 minutes à 20 °C. Les lames sont ensuite rincées dans le même tampon 3 fois 3 minutes, montées à l'Eukitt puis observées.

La technique d'immunocytochimie employée pour détecter les NK est identique. Seul l'anticorps primaire et la concentration à laquelle l'anticorps est utilisé changent. En effet, les NK sont détectées à l'aide de l'anti-NKA (IS 24) dilué au 1/300.

4) Contrôles

La spécificité de la fixation des anticorps détectés par immunofluorescence est vérifiée par:

- ommission de l'immunsérum primaire.
- remplacement de l'immunsérum primaire par du sérum non immun.
- adsorption de l'immunsérum par l'immunogène en excès, avant application sur les coupes.

Dans tous les cas, la réaction est négative.

5) Quantification de l'immunomarquage

La quantification de la réaction radioimmunocytochimique obtenue au niveau de l'EM pour l'E-24.11 s'est révélée nécessaire afin de comparer le groupe des femelles lactantes (nursing females) au groupe des femelles séparées (no pups 48H).

Cette analyse quantitative de l'immunoréactivité pour l'E-24.11 est réalisée sur les coupes à congélation (coupes cryostat) radioautographiées, grâce à un système d'analyse d'image de type SAMBA 2005 (Alcatel, TITN Answare, France).

Chaque coupe est analysée avec un microscope Leitz à l'objectif 20X, couplé à une caméra vidéo JVC KY 15 CL. Pour chaque coupe, la zone externe de l'EM est délimitée sur image vidéo. Ce système permet de mesurer la densité optique moyenne (DOM) pour chaque région d'EM délimitée. Les

valeurs, exprimées en DOM, correspondent au rapport de la densité optique sur la surface analysée. Le signal non spécifique ou "fond" est mesuré dans des régions de l'hypothalamus présentant très peu d'immunoréactivité pour l'E-24.11. Ce signal, mesuré pour chaque lame, est soustrait automatiquement de la DOM mesurée dans l'EM.

La DOM des noyaux entopédunculaires (régions connues pour leur richesse en E-24.11) est également mesurée afin de constituer un contrôle supplémentaire.

C- RADIOIMMUNOCYTOCHIMIE A L'ECHELLE ULTRASTRUCTURALE

1) Préparation des tissus

6 rats Wistar mâles sont décapités sans anesthésie préalable. Les cerveaux sont immédiatement disséqués et fixés par immersion selon Marcel *et al.*, (1990) dans un mélange fixateur contenant 4% de paraformaldéhyde, 0.2% d'acide picrique, 0.05% de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 0.1 M pH 7.4 (1h à température ambiante). Après fixation, les cerveaux sont délimités de façon à obtenir des blocs comprenant l'hypothalamus, l'EM et l'hypophyse. Les blocs ainsi obtenus sont coupés à l'aide d'un Vibratome (Oxford Instruments) en tranches de 80 à 100 μm d'épaisseur. Ces coupes épaisses sont collectées dans du tampon phosphate K_2/K 0.1 M froid.

2) Traitement des coupes épaisses

a) Immunocytochimie et inclusion

Les coupes au vibratome sont rincées dans du tampon phosphate 0.1 M contenant 0.2% de BSA, incubées avec l'anticorps mAb 85A2 iodé (voir protocole d'iodation, Annexe 1) à raison de 300 000 cpm/coupe pendant 3 h à température ambiante, puis rincées 2 fois 10 mn dans le tampon phosphate 0.1 M pH 7.4. Les tranches sont ensuite postfixées 30 mn par de l'acide osmique dilué à 1% dans le même tampon puis rincées, déshydratées et incluses dans l'Araldite.

b) Confection des coupes à l'ultramicrotome

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Ultracut, Reichert-Jung. Les coupes semi-fines de 1 μm d'épaisseur, réalisées au niveau de l'EM à partir de chaque coupe au vibratome incluse, permettent de s'orienter et d'évaluer la durée d'exposition des ultrafines. Les semi-fines

obtenues sont déposées sur des lames nettoyées à l'alcool chlorhydrique (mélange d'éthanol et d'acide chlorhydrique).

Parallèlement, des coupes ultrafines (80 à 90 nm d'épaisseur) sont réalisées à partir des mêmes blocs d'inclusion et sont déposées sur des lames recouvertes d'un film de celloïdine (2% dans l'acétate d'isoamyle). Pour assurer une épaisseur monocristalline uniforme de l'émulsion photographique qui sera déposée ultérieurement sur les lames, les coupes ultrafines sont déposées à 2.5 cm du bord inférieur des lames.

3) Radioautographie des coupes semi-fines

Les lames sur lesquelles sont déposées les coupes semi-fines sont recouvertes d'une émulsion photographique liquide (LM1 Amersham) par trempage. Cette opération se fait en chambre noire (lumière rouge), l'émulsion étant chauffée à 41°C au moyen d'un bain-marie. Après séchage une nuit, les lames sont rangées dans des boîtes opaques étanches en présence d'un dessicant (gel de silice, Prolabo). Après 5 à 7 semaines d'exposition, les radioautographies sont développées dans du D19b à 18°C pendant 2 min 30. Les lames sont ensuite fixées dans une solution de thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau et rincées 3 x 10 min dans l'eau distillée. Après séchage, les coupes sont colorées au bleu Azur 1/1000 puis observées au microscope.

4) Radioautographie des coupes ultrafines

Les lames celloïdées sur lesquelles sont déposées les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyl (2.5% dans du méthanol 50%) pendant 15 min, séchées une nuit à l'air ambiant puis contrastées au citrate de plomb (0.2 g pour 50 ml d'eau bidistillée) pendant 8 min en présence de pastilles d'hydroxyde de potassium car il existe un risque de précipitation du citrate de plomb en présence de gaz carbonique. Après séchage, les lames sont carbonées sous vide avant d'être recouvertes d'une émulsion photographique (EM1 Amersham) par trempage (technique dite du dipping). Toutes les manipulations avec l'émulsion se font en chambre noire. Les lames sont séchées une nuit en chambre noire avant d'être rangées et stockées 8 à 10 semaines en boîtes opaques étanches en présence d'un dessicant (anhydride phosphorique). La révélation photographique se fait dans du Microdol X (Kodak) pendant 2 min 30 sec, la fixation dans du thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau bidistillée pendant 5 min.

Les lames sont ensuite rincées dans l'eau bidistillée pendant 3×10 min puis placées dans une chambre humide. Les membranes de celloïdine sur lesquelles sont déposées les coupes ultrafines sont décollées sur de l'eau froide selon Larra et Droz, (1970). Des grilles de microscopie électronique (200 mesh) sont déposées sur les coupes. Le film de celloïdine et les grilles sont alors récupérés à l'aide d'une feuille de papier filtre et séchés à l'étuve 40°C. Enfin, la membrane de celloïdine est affinée pendant 1 min dans de l'acétate d'isoamyle puis les grilles sont observées avec un microscope électronique Zeiss 902.

5) Analyse des radioautographies

En microscopie électronique, la localisation de l'E-24.11 par l'anticorps monoclonal mAb 85A2 iodé se manifeste par un tortillon d'argent. En raison d'une résolution relativement limitée de la méthode radioautographique, l'analyse de la distribution des grains d'argent s'avère nécessaire afin de déterminer la localisation des sources radioactives dans le tissu. La distribution des grains est analysée selon une méthode préconisée par Blackett et Parry, (1977) puis reprise par Hamel et Beaudet, (1984). Des coupes ultrafines provenant des 6 animaux sont systématiquement observées et chaque site marqué est photographié à un grossissement de 12000.

La localisation de chaque grain photographié (grains dits réels) est analysée. Les grains sont alors répartis en différentes catégories selon les structures sous-jacentes. Les grains recouvrant une seule structure sont appelés grains exclusifs, ceux recouvrant plusieurs structures sont appelés grains partagés. Afin de vérifier que les grains observés dans notre expérience (grains réels) ne sont pas distribués de façon aléatoire, leur localisation est comparée à celle de grains dits hypothétiques. Cette population de grains hypothétiques est obtenue en plaçant sur les mêmes documents photographiques des séries de cercles ayant pour diamètre la taille moyenne d'un grain d'argent, ce qui permet également d'observer les structures situées sous les cercles. De la même façon, les grains hypothétiques sont répartis en différentes catégories selon les structures sous-jacentes.

Pour les deux populations, réelle et hypothétique, les grains partagés sont répartis dans des catégories n'incluant que deux structures. Les tortillons peu nombreux disposés en apposition sur 3 voire 4 structures sont répartis proportionnellement dans les 2 principales catégories (terminaison

nerveuse/terminaison nerveuse et terminaison nerveuse/tanycyte), en tenant compte de la fréquence de marquage de ces catégories. La comparaison entre la distribution réelle et la distribution hypothétique est statistiquement évaluée avec un test χ^2 .

D- DOUBLES MARQUAGES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Nous avons réalisé les doubles détections suivantes:

- E-24. 11 / tyrosine hydroxylase (TH)
- E-24. 11 / gonadolibérine (GnRH)
- E-24. 11 / corticolibérine (CRF)
- E-24. 11 / somatostatine (SOM)
- E-24. 11 / somatolibérine (GRF)
- E-24. 11 / thyrolibérine (TRH)

Toutes ces doubles détections sont réalisées de la même manière, l'E-24.11 est détectée à l'aide de l'anticorps mAb 85A2 iodé tandis que l'autre antigène recherché est mis en évidence par une méthode immunoenzymatique indirecte (peroxydase).

1) Préparation des tissus

20 rats Wistar mâles ont été utilisés. Après décapitation, les cerveaux sont fixés par immersion selon Marcel *et al.*, (1990) pendant 1 h puis délimités. La région comprenant l'EM est débitée en tranches de 80 à 100 μm à l'aide d'un Vibratome, tranches qui sont collectées dans du tampon phosphate 0.1 M pH 7.4 froid.

2) Doubles marquages immunocytochimiques et inclusion

Pour chaque double détection, des coupes au vibratome provenant de plusieurs animaux sont incubées dans un mélange d'anticorps composé de l'anti-E-24.11 iodé (200 000 cpm/coupe) et d'un autre immunsérum: anti-TH (Institut J. Boy S.A., Reims), ou anti-GnRH, ou anti-CRF, ou anti-SOM, ou anti-GRF, ou anti-TRH) pendant 15 h environ à 4°C.

Les caractéristiques et concentrations des immunsérums employés sont reprises dans le tableau ci-dessous:

Immunsérums	Espèce productrice	dilution	Spécificité (références)
Anti-TH	Lapin	1/1000	-Origine commerciale: Institut J. Boy. (France)
Anti-GnRH	Lapin	1/1000	-Barry et Dubois, 1973; 1974; 1975. -Barry <i>et al.</i> , 1973.
Anti-O-CRF	Lapin	1/1000	-Tramu <i>et al.</i> , 1984.
Anti-SOM	Lapin	1/1000	-Maubert <i>et al.</i> , 1992.
Anti-rat-GRF	Lapin	1/1000	-Ciofi, 1987, Thèse.
Anti-TRH	Lapin	1/1000	-Origine commerciale: Euro-diagnostics (Pays-bas)

L'incubation avec le mélange d'anticorps primaires est réalisée dans du tampon phosphate K₂/K 0.1 M pH 7.4 contenant 0.2% de BSA. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 10 min dans du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 puis incubées pendant 75 min avec un anticorps secondaire constitué de fragments Fab d'immunoglobulines G de chèvre dirigés contre les IgG de lapin, conjugués à la peroxydase et dilués au 1/100 dans du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Après cette étape, les coupes épaisses sont lavées 3 fois 10 min dans le même tampon. L'activité peroxydasique est ensuite révélée (2 à 3 min à froid) dans du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 contenant 0.05% de 3-3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) et 0.003% de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), selon la méthode de Graham et Karnovski, 1966.

Enfin, les coupes au vibratome sont postfixées 30 min avec du tétroxyde d'osmium (OsO₄) dilué à 1% dans du tampon phosphate 0.1 M, rincées, déshydratées et incluses dans l'Araldite. Comme pour la détection de l'E-24.11 seule, des coupes semi-fines d'1 µm d'épaisseur et des coupes ultrafines de 80 à 90 nm d'épaisseur sont réalisées avec un ultramicrotome à partir de chaque tranche vibratome incluse dans l'Araldite. Les coupes semi-fines et ultrafines ainsi obtenues sont ensuite respectivement traitées pour la radioautographie en microscopie optique et la radioautographie en microscopie électronique (cf Matériel et Méthodes, C-3, C-4).

3) Contrôles

La spécificité de la radioimmunocytochimie est testée en incubant pendant 15h à 4°C des tranches vibratome avec des immunoglobulines de souris saines iodées (200 000 cpm / coupe) ou avec de l'iode¹²⁵ libre (200 000 cpm / coupe). L'obtention et la procédure d'iodation des immunoglobulines de souris saines sont résumées en annexe 3. Après cette incubation, les tranches sont traitées comme précédemment décrit afin d'obtenir des coupes semi-fines qui sont radioautographiées.

4) Analyse des radioautographies

A l'échelle ultrastructurale, le marquage de l'E-24.11 se manifeste sous la forme d'un tortillon d'argent. La présence des autres antigènes recherchés, mis en évidence par une méthode immunoenzymatique indirecte, apparaît sous la forme d'un précipité de DAB, dense aux électrons. Compte tenu des limitations inhérentes à la technique radioautographique, il est difficile de déterminer laquelle des 2 membranes constituant une apposition est marquée par le tortillon d'argent. Cependant, afin d'interpréter tous les doubles marquages réalisés, il est crucial d'attribuer le marquage anti-E-24.11 à l'une ou l'autre des structures formant l'apposition.

Dans ce but, tous les champs microphotographiques doublement marqués, sont photographiés. L'analyse des microphotographies fait apparaître qu'un certain nombre de critères permettant parfois de savoir quelles sont les structures marquées peuvent être retenus.

Ces critères sont les suivants : 1-) Tout d'abord, lorsqu'une structure (TN le plus souvent) présente plusieurs grains d'argent, il est alors possible de lui attribuer le marquage radioautographique. 2-) Quand une structure peut être observée sur 2 coupes ultrafines adjacentes, il est particulièrement intéressant de voir si cette structure présente un marquage radioautographique sur les 2 coupes. Dans le cas où une même structure est marquée sur 2 ultrafines adjacentes, le signal radioautographique peut-être attribué à cette structure. 3-) Si un ou plusieurs tortillons d'argent sont visibles sur une apposition impliquant 2 TN marquées par l'immunocytochimie, donc de nature connue, la nature du système neuroendocrinien marqué (possédant l'E-24.11) est alors définie. 4-) Enfin, lorsque les grains d'argent sont disposés sur de simples membranes et non sur des appositions de membranes, ce qui se produit lors d'une moins

bonne conservation du tissu, l'origine du signal radioimmunocytochimique peut être déterminée.

Annexe 2: Composition du tampon Coons.

véronal sodique 2.06 g/l.

NaCl 8.5 g/l.

azide 0.125 g/l.

Le pH de la solution obtenue est ajusté à 7.6 par de l'HCl 1N.

Annexe 3: Obtention et iodation des immunoglobulines de souris saines

1. Obtention des immunoglobulines

- Prélèvement du sang de 6 souris mâles adultes sacrifiées par décapitation.
- Coagulation du sang une nuit à température ambiante.
- Centrifugation et récupération du sérum.
- Regroupement des sérums des 6 animaux; 1.2 ml de sérum de souris saines est obtenu.
- Précipitation des immunoglobulines : 1 volume (1.2 ml) de sérum physiologique et 2 volumes (2.4 ml) d'une solution saturée de sulfate d'ammonium sont additionnés au volume de sérum de souris saines. Le mélange ainsi obtenu est délicatement agité puis laissé au repos environ 20 minutes. Le tout est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 15 minutes. Le culot qui en résulte est constitué par les immunoglobulines.
- Purification des immunoglobulines : le culot est repris par 1 volume (1.2 ml) d'eau distillée et 1 volume de la solution de sulfate d'ammonium à saturation. Après remise en suspension complète, le mélange est centrifugé de nouveau à 4000 tours/mn. Cette opération de purification est répétée 2 fois.
- Enfin, le culot est repris une dernière fois par 2 ml d'eau distillée et dialysé 24 heures contre du tampon phosphate K/K₂ 0.01 M pH 7.4.
- Dans notre préparation, nous obtenons après dialyse, 2.5 ml de tampon phosphate K₂/K 0.01M pH 7.4 contenant les immunoglobulines de souris saines. Sachant que chez la souris saine, on trouve en moyenne 12 grammes d'immunoglobulines par litre de sérum, notre échantillon représente 14.4 mg. La solution finale après dialyse contient donc environ 5.7 mg d'immunoglobulines par ml.

2. Iodation des immunoglobulines

- 50 µg d'anticorps (5.7 mg/ml) c'est à dire 9 µl dans 50 µl de tampon phosphate K₂/K 0.1 M, pH 7.4.
- ajout de 4 µl d'iode 125 (0.4 mCi).
- ajout de 4 µl chloramine T (3 mg/ml).
- contact 1 min en agitation avant l'adjonction de 4 µl de métabisulfite de sodium (6 mg/ml).
- agitation puis addition de 20 µl d'iodure de sodium 1M.

-dilution à 500 μ l dans tampon phosphate K_2/K 0.1 M contenant 0.5% de BSA.

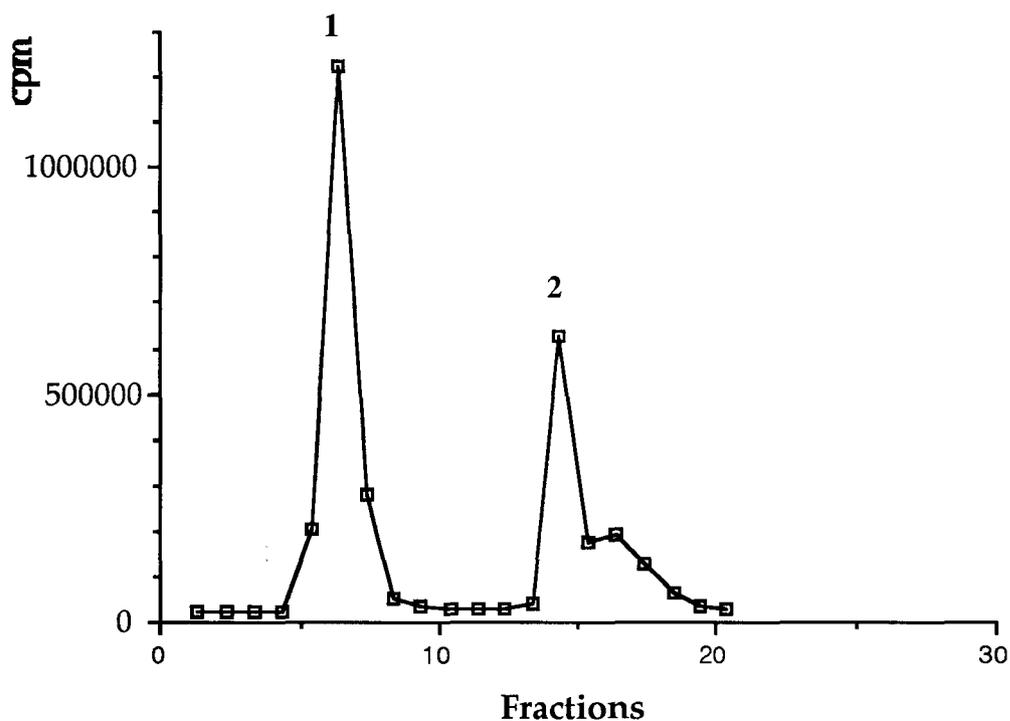
-gel filtration sur colonne PD 10 calibrée Pharmacia (Sephadex G25 medium), élution avec tampon phosphate K_2/K 0.1 M contenant 0.5% de BSA.

-collecte de 20 fractions de 1 ml.

-5 μ l sont prélevés de chaque fraction et aussitôt comptés à l'aide d'un compteur gamma LKB.

-les fractions choisies sont conservées à 4°C en présence d'azide de sodium (0.25 mg/ml).

Iodation des immunoglobulines de souris saines



1: immunoglobulines de souris saines iodées.

2: iodures.

La fraction 6 est la fraction qui a été utilisée.

E- MISE EN EVIDENCE DE SITES DE LIAISON

Le but est de mettre en évidence les sites de liaison potentiels des ENK au niveau de la zone externe de l'EM du Rat par des techniques radioautographiques. Le principe général implique le marquage sélectif des récepteurs opioïdes aux ENK par des radioligands (agonistes ou antagonistes) et la révélation de la liaison par contact des coupes avec une émulsion photographique.

Comme les ENK sont susceptibles d'agir par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes de type δ et de type μ (Simon, 1991); ce sont ces 2 types de récepteurs qui sont recherchés dans cette étude.

Généralement les récepteurs sont détectés sur des coupes au cryostat, mais cette méthodologie n'a pas été utilisée afin de rechercher les récepteurs opioïdes dans l'hypothalamus médiobasal. En effet, l'approche sur coupes à congélation, réalisée dans un travail préliminaire, donne des résultats non reproductibles et semble manquer de sensibilité pour la région étudiée. La détection des sites de liaison δ et μ a donc été tentée par une approche sur coupes semi-fines, qui semble beaucoup plus appropriée (Beauvillain *et al.*, 1992).

La méthode radioautographique employée comprend 2 grandes étapes. Tout d'abord, des coupes épaisses (coupes au vibratome) sont incubées avec le ligand radioactif (le marquage obtenu après traitement correspond à la liaison totale) ou incubées avec la même concentration de ligand radioactif, mais en présence d'un excès de compétiteur froid (le marquage obtenu après traitement correspond à la liaison non spécifique). Dans un second temps, les coupes sont postfixées pour assurer la rétention du ligand lié dans les prélèvements.

L'utilisation de coupes au vibratome d'une épaisseur de 100 μm est possible, car les ligands utilisés sont de petites molécules possédant un bon pouvoir de pénétration des tissus. Ces ligands ont été iodés et présentent des activités spécifiques élevées. L'isotope utilisé, de demi-vie courte, permet l'obtention de résultats après une durée d'exposition relativement faible, mais impose une utilisation des ligands radioactifs dans les 15 jours qui suivent l'iodation.

Cette technique d'incubation de coupes épaisses avec un ligand radioactif dans le but de mettre en évidence des sites de liaison sur coupes semi-fines est une approche peu usitée. Avant de poursuivre une étude, il faut

s'assurer que la morphologie du tissu est préservée. Dans certains cas une préfixation des tissus est possible (pour la mise en évidence des récepteurs μ par exemple) mais dans d'autres cas, elle n'est pas souhaitable (c'est le cas des récepteurs δ).

1) Liaison de la Deltorphin-I

La (125 I) (D-Ala²) Deltorphin-I (don du Dr J. M. Zajac, CNRS, Toulouse) est un ligand sélectif des récepteurs opioïdes de type δ (Dupin *et al.*, 1991).

L'iodation de la (D-Ala²) Deltorphin-I a été réalisée de façon à minimiser la production de dérivés diiodés. Cependant, la réaction d'iodation produit environ 60% de monoiodo-(D-Ala²) Deltorphin-I et 15% de diiodo-(D-Ala²) Deltorphin-I. Le dérivé monoiodé est ensuite purifié à 95% par chromatographie liquide haute performance (Seidah *et al.*, 1980). L'activité spécifique du produit obtenu est de 2000 Ci/mmol.

L'activité spécifique élevée de la (125 I) (D-Ala²) Deltorphin-I (2000 Ci/mmol) impose de travailler avec de faibles concentrations en ligand radioactif. Le travail de Dupin *et al.*, (1991) fixe cette concentration à 0.5 nM dans le milieu d'incubation. La liaison non spécifique est déterminée en présence de 1 μ M de levorphanol (Hoffmann-La Roche).

Une étude préliminaire, réalisée sur coupes au cryostat comprenant le striatum, une région connue pour sa richesse en récepteurs de type δ , a été menée dans le but de déterminer les conditions de préfixation idéales à la détection des sites de liaison de la Deltorphin-I. Les résultats de ce travail préalable ne nous ont pas permis de découvrir un mode de fixation permettant à la fois d'obtenir une bonne liaison du ligand et une conservation correcte du tissu. La liaison maximale a toujours été obtenue sur tissu frais. Cette dernière observation nous a amené à envisager la détection des sites de liaison δ sur coupes épaisses d'hypothalamus médiobasal en survie. Le maintien en survie de coupes épaisses effectuées au vibratome offre une alternative intéressante. En effet, le tissu étudié n'étant pas fixé, les conditions de fixation sont théoriquement idéales. De plus, il a été démontré (Mitchell *et al.*, 1988) et nous l'avons vérifié, que la survie du tissu cérébral n'altérerait pas l'ultrastructure.

a) Préparation des tissus

Six rats mâles Wistar sont sacrifiés par décapitation puis rapidement disséqués. Le cerveau de chaque animal est alors délimité de façon à obtenir

un bloc qui comporte l'hypothalamus, l'EM et l'hypophyse. Le bloc ainsi obtenu est coupé en tranches frontales de 100 μm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome, les coupes comprenant l'EM sont immédiatement placées en survie et périfusées dans un dispositif utilisé par les électrophysiologistes. La composition du milieu de survie utilisé est décrite en Annexe 4. Les tranches sont laissées ainsi en survie pendant 45 min avant d'entreprendre le marquage proprement dit. Ce délai semble être indispensable au tissu pour récupérer un équilibre normal.

b) Technique de liaison de la Deltorhin-I

Après ces 45 min de récupération dans le milieu de survie correctement oxygéné, les coupes provenant de 3 animaux sont périfusées avec 25 ml de milieu de survie contenant le ligand radioactif à la concentration requise (0.5 nM) pendant 20 min. La cuve où sont placées les coupes étant de très faible volume comparé aux 25 ml périfusés, le volume mort qu'elle représente n'est pas pris en compte. Suite à l'incubation, les coupes sont immédiatement rincées dans du tampon phosphate 0.05 M froid oxygéné en permanence puis postfixées dans du tampon phosphate 0.05 M froid contenant 4% de glutaraldéhyde pendant 10 min. Les coupes subissent alors un traitement histologique qui sera décrit au paragraphe 3.

La même expérience est réalisée avec des coupes au vibratome provenant de 3 autres rats mâles Wistar. Des niveaux de coupe équivalents sont périfusés avec du milieu de survie contenant 0.5 nM de ligand radioactif et 1 μM de levorphanol, le compétiteur froid en excès. Cette seconde expérience permet d'évaluer la liaison non spécifique.

Le contrôle de l'obtention d'une liaison dans ces conditions s'est fait par "comptage" de coupes au vibratome à l'aide d'un compteur gamma LKB. Des coupes incubées avec la ^{125}I Deltorhin-I donnent un nombre de cpm nettement supérieur au nombre de cpm obtenu avec des coupes incubées avec le ligand radioactif en présence de levorphanol. Par conséquent cette approche est appropriée pour conserver une liaison ligand-récepteur.

2) Liaison du FK-33824

Dans les conditions utilisées, le ligand est sélectif des récepteurs opioïdes de type μ (Roemer *et al.*, 1977; Moyse *et al.*, 1986; Beauvillain *et al.*, 1992). Ce ligand est iodé par la méthode à la chloramine T, détaillée en Annexe 5.

Des études antérieures ont montré que la mise en évidence des sites de liaison au (125 I) FK-33824 était réalisable après une légère fixation (Hamel et Beaudet, 1984; Beauvillain *et al.*, 1992). Cette préfixation permet la détection des sites de liaison sur coupes semi-fines et à l'échelle ultrastructurale, tout en assurant une conservation très satisfaisante du tissu nerveux.

La liaison non spécifique est évaluée en présence d'un compétiteur froid: la naloxone.

a) Préparation des tissus

Des rats mâles Wistar (n=6) sont décapités. Leurs cerveaux sont immédiatement disséqués, délimités et fixés par immersion 10 min dans le mélange fixateur préconisé par Hamel et Beaudet (1984) à 4° C. Ce mélange fixateur contient 0.75% de paraformaldéhyde, 0.1% de glutaraldéhyde et 1% d'acide tannique dans du tampon Sørensen 0.12 M pH 7.4. Après fixation, les cerveaux sont débités en coupes frontales de 100 μ m d'épaisseur à l'aide d'un vibratome. Toutes les coupes présentant l'EM sont conservées.

b) Technique de liaison du FK-33824

La moitié des coupes épaisses obtenues au moyen du vibratome est incubée 20 min dans du tampon Tris-HCl 0.05 M, 0.25 M sucrose, pH 7.4 contenant 1 nM de (125 I) FK-33824 à température ambiante. Le marquage qui en résulte après radioautographie correspond à la liaison totale. L'autre moitié des coupes épaisses est également incubée avec 1 nM de (125 I) FK-33824 en présence d'un compétiteur froid: la naloxone (1 μ M). Ces coupes permettent d'évaluer la liaison non spécifique.

Toutes les coupes sont ensuite rincées 3 x 10 min dans du tampon Tris 0.1 M froid (4°C) puis postfixées dans le même tampon contenant 4% de glutaraldéhyde pendant 10 min. Elles sont ensuite traitées pour l'histologie.

3) Traitement histologique des coupes

Dans la détection des sites de liaison δ et μ , les conditions de fixation des tissus et de liaison des ligands sont différentes, mais le traitement histologique des coupes au vibratome après incubation est identique. En effet, après postfixation au glutaraldéhyde 4%, les coupes au vibratome sont postfixées 30 min à température ambiante dans du tétr oxyde d'osmium à 2%, déshydratées dans des bains de méthanol de concentrations croissantes, puis incluses dans l'Araldite. Après polymérisation 24h à 56° C, les blocs

d'inclusion sont taillés et des coupes semi-fines de 2 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert-Jung). Ces coupes semi-fines sont recueillies sur des lames nettoyées dans de l'alcool chlorhydrique puis radioautographiées comme précédemment décrit (C-3). La durée d'exposition est de 5 semaines, après lesquelles les radioautographies sont développées dans du D19b à 18°C pendant 2 min 30 sec, fixées dans une solution de thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau distillée et rincées 3 x 10 min dans l'eau distillée. Les coupes sont colorées au Bleu Azur 1/1000 avant observation.

4) Analyse des radioautographies

Les coupes semi-fines sont observées au microscope photonique (Axiophot, Zeiss). Le marquage apparaît sous forme de grains d'argent diffus et occasionnellement quelques amas de grains sont visibles.

La zone externe de l'EM est photographiée à l'objectif 63 x 1.25 en immersion (pellicule Agfapan 25). Un tirage papier rigoureusement de la même taille est ensuite réalisé pour toutes les microphotographies. Les quantifications des liaisons totales et non spécifiques sont réalisées sur photographies. Les grains d'argent sont comptés manuellement, les résultats du comptage exprimés en nombre de grains par unité de surface pour chaque photographie. Bien entendu, il faut s'assurer que les microphotographies proviennent de nombreuses coupes au vibratome et de plusieurs animaux. La liaison spécifique correspond à la liaison totale à laquelle on soustrait la liaison non spécifique.

Annexe 4: Composition du milieu de survie selon Yamamoto, 1973

NaCl	124	
NaHNO ₃	26	
KCl	5	
KH ₂ PO ₄	1.24	en mM, à pH 7.2.
CaCl ₂	2.4	
MgSO ₄	2	
Glucose	10	

L'osmolarité est de 300 à 310 milliosmoles.

Annexe 5: Protocole d'iodation du FK-33824

1) Iodation

- 1 μ g de FK-33824 dilué dans 5 μ l d'HCl 0.1 N.
- neutralisation par 10 μ l de tampon NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.5.
- ajout de 10 μ l NaI ¹²⁵ (1mCi).
- ajout de 10 μ l de chloramine T (0.5 mg/ml) diluée dans du tampon phosphate Na/Na₂ 0.05 M pH 7.5.
- contact environ 25 secondes (impérativement moins de 30 secondes) en agitation, puis adjonction de 20 μ l de métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅, 0.5 mg/ml dilué dans du tampon phosphate Na/Na₂ 0.05 M pH 7.4).
- agitation 2 mn.
- dilution avec 1 ml de BSA à 10% dans l'eau distillée.

2) Pr puration

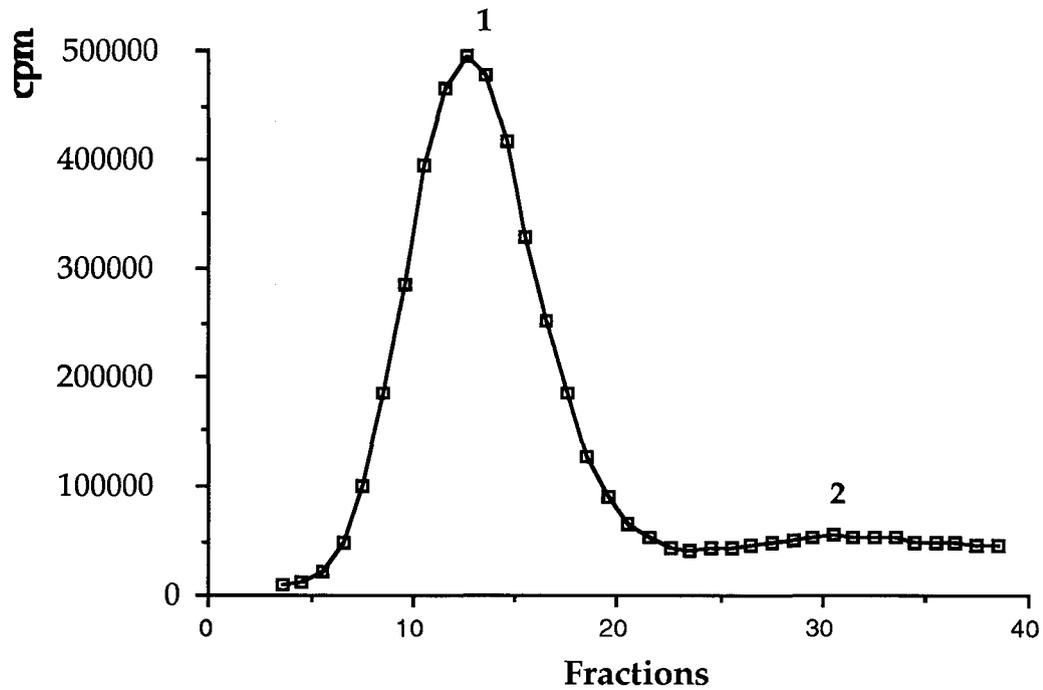
- récupération du mélange résultant de l'iodation (1.05 ml environ)   l'aide d'une seringue de 2 ml.
- la seringue est ensuite adaptée sur une colonne Sep-Pak.
- le mélange est injecté dans la Sep-Pak. La fraction résiduelle, qui sort à l'autre bout de la colonne est éliminée.
- l'élution de la Sep-Pak par 5   10 ml d'eau distillée permet d'éliminer l'iode résiduel.
- puis, 5 à 10 ml d'acétonitrile à 10% sont injectés dans la colonne de façon à éliminer la chloramine T et les peptides résiduels.
- enfin, 1 ml d'acétonitrile à 60% permet d'éluer le peptide sous ses formes mono- et diiod es.

3) Purification

- dilution du dernier éluat (1 ml d'acétonitrile à 60%) par 3 ml de tampon borate 0.0125 M NaCl 0.1 M pH 7.5.
- dépôt du mélange à la surface d'une colonne Sephadex DEAE-A25 (colonne de 10 cm de hauteur, 1.5 cm de diamètre, préalablement équilibrée avec le tampon d'élution: tampon borate 0.0125 M NaCl 0.1 M pH 7.5).
- gel filtration, élution du peptide.
- 40 fractions de 2 ml sont collectées.
- 5 μ l de milieu sont prélevés dans chaque fraction et comptés.

-les fractions choisies (peptide monoiodé) sont conservées au réfrigérateur.
La durée idéale de conservation est inférieure à 15 jours.

Iodation du FK-33824



- 1: FK-33824 monoiodé.
- 2: FK-33824 diiodé.

Les fractions 9, 10, 11 sont utilisables pour mettre en évidence les sites de liaison.

RESULTATS

A-DISTRIBUTION DE L'ENDOPEPTIDASE-24.11 DANS L'EMINENCE MEDIANE DU RAT

1) Macroradioautographie

L'observation des films de macroradioautographie permet dans un premier temps de vérifier l'efficacité de l'iodation. Ces résultats préliminaires sont obtenus en 2 jours. L'anticorps monoclonal utilisé donne un important marquage au niveau du caudate putamen et des noyaux entopédunculaires, régions connues pour leur richesse en E-24.11. L'EM montre également un marquage significatif (Fig. 2).

2) Coupes semi-fines

La radioautographie des coupes semi-fines (coupes d'1 μm d'épaisseur recouvertes d'une émulsion photographique liquide par trempage) constitue une étape préliminaire à l'étude ultrastructurale, car ces coupes de 1 μm d'épaisseur et les coupes ultrafines ont été réalisées à partir des mêmes blocs d'inclusion. Ces coupes semi-fines permettent de vérifier s'il existe du marquage pour un bloc d'inclusion donné et permettent de s'orienter lors de l'observation des coupes ultrafines au microscope électronique.

Au niveau de la zone externe de l'EM, un marquage net est observé sous la forme d'aggrégats de grains d'argent et de grains d'argent isolés (Fig. 3A). Dans certains cas, ces grains apparaissent disposés préférentiellement autour de structures. Compte tenu de la technique radioautographique et de la taille des éléments qui constituent l'EM, il est impossible de déterminer la nature des sites marqués. Le marquage non spécifique est très faible, comme on peut le constater en observant la lumière des capillaires.

3) Radioautographie à l'échelle ultrastructurale

L'analyse est menée dans la zone externe de l'EM qui est essentiellement constituée de terminaisons nerveuses (TN) et de prolongements épendymaires (E.p, tanocytes). Sur les radioautogrammes de microscopie électronique, le marquage obtenu à l'aide de l'anticorps mAb 85 A2 iodé se manifeste sous la forme de tortillons d'argent. Les champs marqués ont été

systématiquement photographiés permettant d'analyser la distribution de 1045 grains (grains réels).

Les résultats de l'analyse de la distribution des tortillons d'argent au sein de la zone externe de l'EM par la méthode de Blackett et Parry, (1977), modifiée par Hamel et Beudet, (1984) sont détaillés dans le Tableau 1.

Cette analyse montre que 81,9% des grains réels sont situés sur des appositions de membranes. Ces grains sont appelés grains partagés (Fig. 3B, 3C, 5). Généralement, les appositions marquées impliquent 2 structures distinctes. Cependant, quelques grains sont trouvés sur des appositions de membranes impliquant 3 éléments différents. Ces grains sont répartis proportionnellement dans les 2 principales catégories (TN/TN et TN/tanocyte) (voir Matériel et Méthodes, C-5).

Les 18,1% de grains réels restant sont vus à l'intérieur de terminaisons nerveuses ou de tanocytes, ils sont appelés grains exclusifs (Fig. 4B).

La distribution des grains réels est significativement différente ($P < 10^{-7}$, test χ^2) de la distribution aléatoire d'une population de 2881 grains hypothétiques, qui comporte 68,1% de grains exclusifs et seulement 31,9% de grains partagés.

Le rapport grains réels sur grains hypothétiques est un indicateur de l'enrichissement relatif des différents compartiments. C'est ainsi que l'enrichissement est de 2,57 pour les grains partagés contre 0,26 pour les grains exclusifs.

La majorité des grains partagés est située sur des appositions de membranes entre TN (54,1%) (Fig. 3B, 3C) mais une proportion notable de tortillons est partagée entre TN et tanocytes (27,1%) (Fig. 5C, 5D, 5E). L'enrichissement relatif pour toutes les catégories de grains partagés est similaire, de l'ordre de 2,6.

La très grande majorité des TN concernées par le marquage présentent des caractéristiques ultrastructurales identiques: granules de neurosécrétion d'environ 100 à 120 nm, vésicules claires de type synaptique (70% parmi les 54,1% de grains partagés entre TN). Dans d'autres cas, un des boutons terminaux impliqué dans l'apposition possède des caractéristiques ultrastructurales différentes. Ce qui est le plus fréquent est l'absence de granules de neurosécrétion et une abondance de vésicules de type synaptique. On peut également trouver des granules de sécrétion de taille supérieure (environ 150 nm). Ces caractéristiques différentes peuvent

signifier que plusieurs types de TN sont marqués mais peuvent également résulter de plans de section particuliers.

Certaines TN sont multimarquées et présentent au moins 2 grains d'argent sur des appositions impliquant leur membrane plasmique (Fig. 4A, 5A, 5B). De plus, il est possible d'observer plusieurs tortillons sur la membrane plasmique d'un même prolongement tanocytaire (Fig. 5E).

Quant aux grains exclusifs, la plupart sont détectés dans des TN (15,5%) (Fig. 4B), les autres sont observés dans des tanocytes (1,7%), des cellules endothéliales et des structures non identifiées (0,9%).

En conclusion, l'ensemble de cette étude démontre la présence d'E-24.11 sur les membranes de TN dans la zone externe de l'EM, ce qui représente un argument très favorable à l'existence d'une action locale par des peptides substrats de cette enzyme. Par ailleurs, la présence d'enzyme sur les membranes tanocytaires est probable.

Tableau 1. Distribution des tortillons d'argent dans la zone externe de l'EM en microscopie électronique.

	Réels # 1,045*	Hypothétiques 2,881*	Réels/Hypothétiques
Grains partagés	81.9%	31.9%	2.57
TN/TN	54.1%	21 %	2.57
TN-Tanocyte	27.1%	10.2%	2.65
Autres structures	0.7%	0.7%	1.00
Grains exclusifs	18.1%	68.1%	0.26
TN	15.5%	46.8%	0.33
Tanocyte	1.7%	20.2%	0.13
Autres structures	0.9%	1.1%	0.82
partagés/exclusifs	4.52	0.46	

Autres structures: cellules endothéliales, fibres ...

*: nombre de grains.

#: statistiquement différent de la distribution hypothétique. $p < 10^{-7}$. (test χ^2)

Figure 2. Observation des macroradioautogrammes réalisés à partir de coupes au cryostat de cerveau de Rat incubées avec l'anticorps mAb 85A2 iodé.

Après 2 jours d'exposition radioautographique, un intense immunomarquage révélant la présence de l'anti-E-24.11 iodé est observé dans différentes régions connues pour leur richesse en E-24.11, comme le caudate putamen (CP). Notons qu'une importante réaction est également observée dans l'éminence médiane (ME).

CX, cortex; HPC, commissure hypocampique; EP, noyau entopédunculaire; ChP, plexus choroïde.

Barre d'échelle: 3.5 mm.

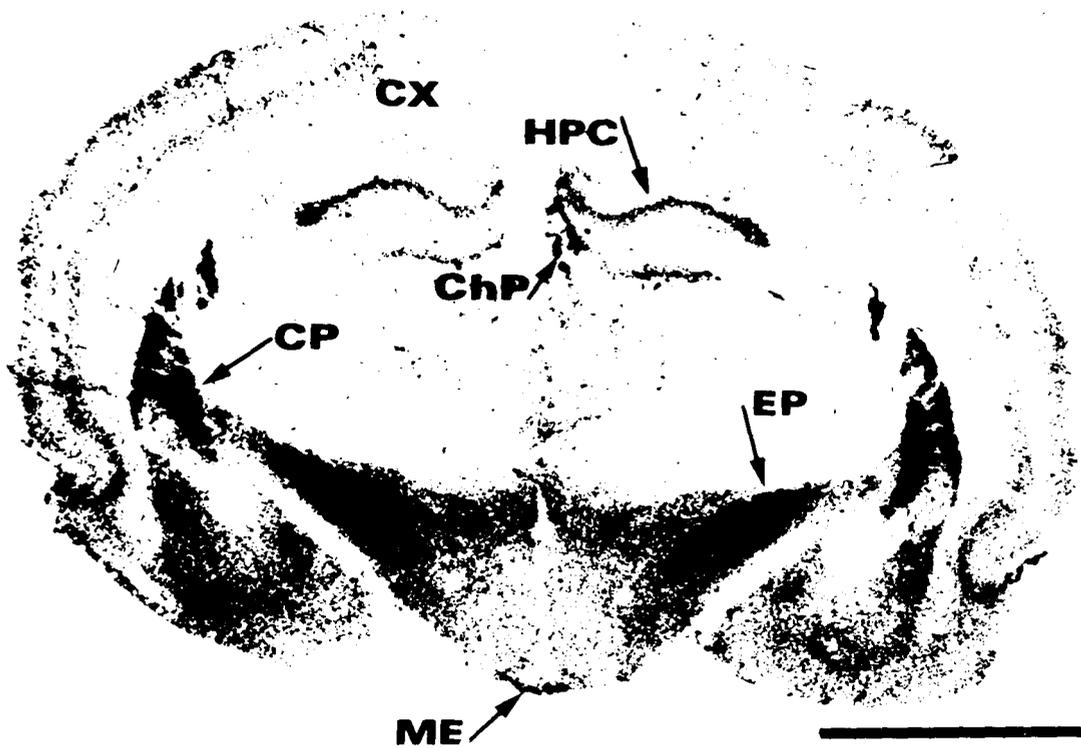


Figure 3.

(A) Radioautogramme d'une coupe semi-fine d'éminence médiane de Rat obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec l'anticorps mAb 85 A2 iodé.

Une densité relativement importante de grains d'argent est vue dans la zone externe de l'éminence médiane. Quelques amas de grains sont observés (flèches) mais il est impossible d'identifier les compartiments cellulaires marqués à cette échelle. Notons au passage que le signal non spécifique observé dans les capillaires est très faible.

Grossissement: x 1800.

(B et C) Détection radioimmunocytochimique de l'E-24.11 dans l'éminence médiane du Rat en microscopie électronique.

Sur les radioautogrammes de coupes ultrafines d'éminence médiane de Rat, le marquage anti-E-24.11 apparaît sous la forme de tortillons d'argent situés le plus souvent sur des appositions de membranes entre terminaisons nerveuses.

La plupart des tortillons sont observés sur des appositions de membranes entre terminaisons nerveuses de mêmes caractéristiques ultrastructurales, en l'occurrence des terminaisons possédant des granules de sécrétion de même taille (environ 100 à 120 nm) (B). Des appositions de membranes entre terminaisons nerveuses de caractéristiques ultrastructurales différentes peuvent également être marquées (C).

Barre d'échelle: 0.5 μ m.

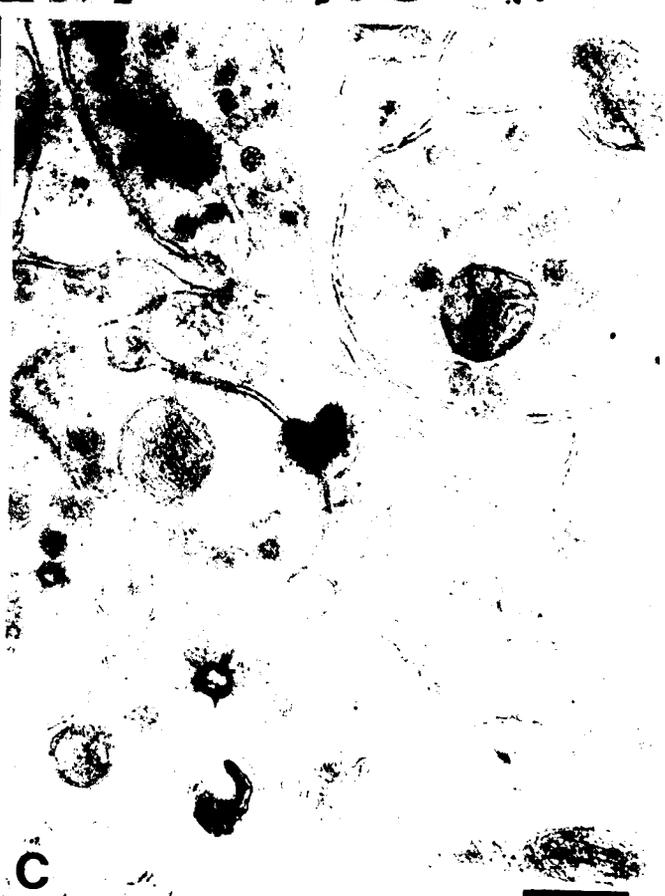
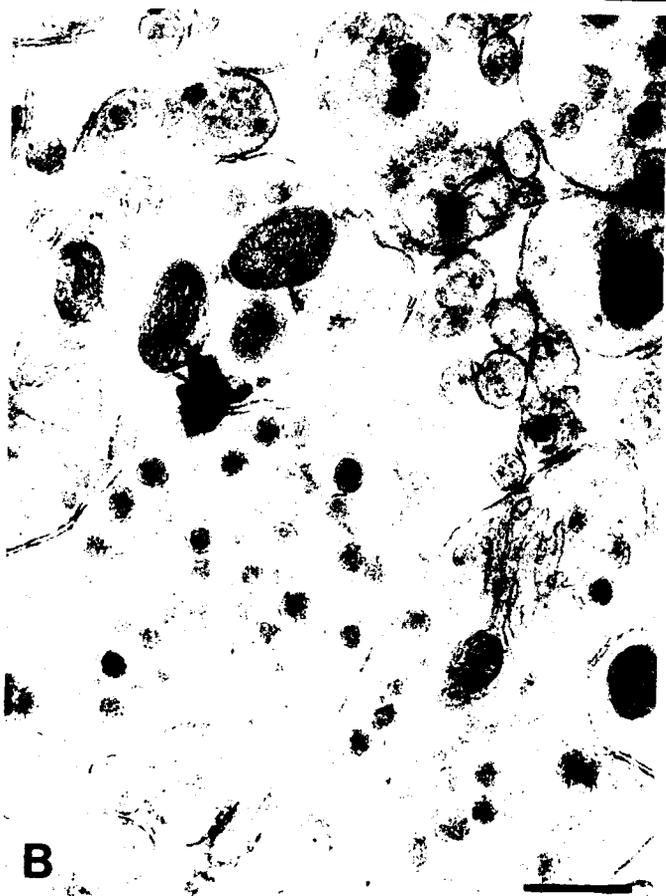


Figure 4. Détection radioimmunocytochimique de l'E-24.11 dans l'éminence médiane du Rat à l'échelle ultrastructurale.

(A) Plusieurs grains d'argent peuvent être vus sur une même terminaison nerveuse. Dans le cas présent, il s'agit d'une terminaison possédant uniquement de petites vésicules dans le plan de coupe étudié.

(B) Parfois, un tortillon est observé à l'intérieur d'un bouton terminal.

Barre d'échelle: 0.5 μm .

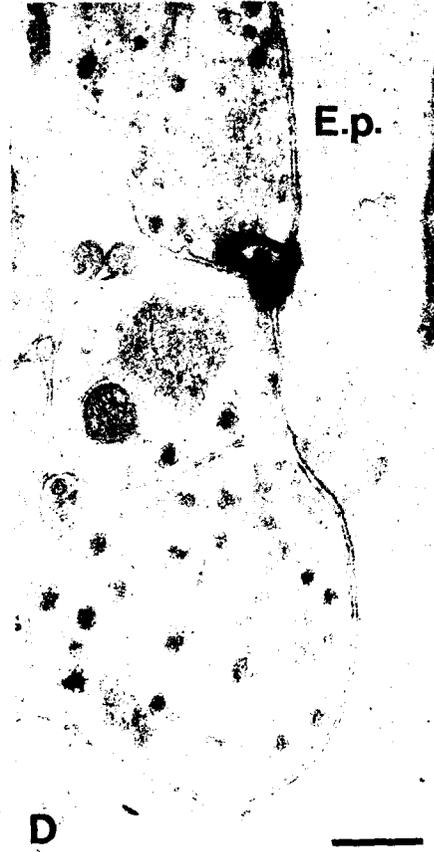


Figure 5. Radioautogrammes de coupes ultrafines d'éminence médiane de Rat marquées par l'anti-E-24.11 iodé.

(A et B) Des terminaisons nerveuses dont la membrane plasmique est marquée par plusieurs grains d'argent sont relativement fréquentes. (A) L'apposition de membranes marquées est une apposition entre 2 terminaisons nerveuses présentant des caractéristiques ultrastructurales différentes. (B) Des appositions de membranes entre boutons terminaux de mêmes caractéristiques sont également marquées.

(C, D et E) Des tortillons sont vus sur des appositions de membranes impliquant une terminaison nerveuse et un prolongement épendymaire ou tanycyte (E. p.). Certains tanycytes semblent multimarqués (E).

Barre d'échelle: 0.5 μm .



B- DOUBLES MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

1) Microscopie photonique

a) Coupes au vibratome

Dans un premier temps, l'intensité de l'immunomarquage obtenu pour la TH, le GnRH, le CRF, la SOM, le GRF et le TRH est évaluée sur coupes au vibratome avant inclusion. Cette première étape qui permet de faire une sélection des coupes au vibratome présentant une réaction immunoenzymatique positive est possible car les précipités de DAB sont clairement visibles après la postfixation à l'osmium. Seules les coupes épaisses présentant une réaction immunocytochimique intense sont incluses dans l'Araldite.

Avec l'anti-TH et l'anti-SOM, une très forte réaction est visible dans l'ensemble de la zone externe de l'EM. L'immunoréactivité détectée par l'anti-GnRH est essentiellement située dans les parties latérales de l'EM. Les marquages obtenus avec l'anti-CRF, l'anti-GRF et l'anti-TRH sont beaucoup moins intenses mais sont observés dans toute l'extension de la zone externe de l'EM.

b) Coupes semi-fines

L'observation des coupes semi-fines permet de déduire la durée d'exposition des coupes ultrafines, de vérifier qu'il existe un bon signal radioautographique pour un bloc d'inclusion donné et éventuellement de s'orienter lors de l'analyse des coupes ultrafines au microscope électronique. Sur les coupes semi-fines, il est très difficile de différencier les grains d'argent des précipités de DAB postfixés à l'osmium. De ce fait, il n'est pas possible d'analyser les doubles marquages à ce grossissement (Fig. 6A, 6B).

Afin de démontrer que la présence des grains d'argent ne reflète pas un signal non spécifique, des contrôles sont réalisés à l'échelle photonique sur coupes semi-fines. Des coupes semi-fines obtenues à partir de la surface de coupes au vibratome incubées avec de l'iode 125 libre ou avec des immunoglobulines de souris saines iodées sont analysées. Après radioautographie, seuls quelques grains sont vus sur ces coupes (Fig. 6C, 6D).

2) Microscopie électronique

La pénétration des anticorps dans le tissu est limitée car la détection de l'E-24.11 est incompatible avec l'utilisation du Triton, un agent détergent qui

facilite la pénétration des anticorps dans le tissu. Par conséquent, le marquage n'est présent que sur une épaisseur de 4 à 5 μm sous la surface des coupes au vibratome. En pratique, cela signifie que seules les parties périphériques des coupes sont utilisées et explique pourquoi la préservation des structures les plus proches de la surface des tranches est parfois mauvaise. Seules sont étudiées les coupes ultrafines présentant une morphologie et un contraste corrects (en réalité, plus de la moitié des coupes ultrafines traitées pour la microscopie électronique sont éliminées faute de possibilités d'observation correcte). L'analyse des doubles marquages est donc réalisée dans les régions doublement marquées de la zone externe de l'EM montrant une bonne conservation. Le plus souvent, ces régions sont situées à proximité des capillaires fenêtrés.

L'immunoréactivité pour la TH, le GnRH, le CRF, la SOM et le GRF, mise en évidence par une technique immunoenzymatique indirecte utilisant la peroxydase comme marqueur, apparaît sous forme de précipités de DAB qui remplissent toute la surface de la section des TN immunoréactives. Ces précipités de DAB sont denses aux électrons après postfixation à l'osmium et l'identification à l'échelle électronique des structures marquées ne pose donc aucun problème.

L'immunoréactivité pour le TRH ne nous a pas donné satisfaction. En effet, à l'échelle ultrastructurale, nous observons un marquage diffus. L'immunsérum semble marquer partiellement les tanocytes. Le double marquage E-24.11/thyrolibérine n'a pas pu être exploité.

L'E-24.11 est toujours détectée par radioimmunocytochimie directe et le marquage se présente sous la forme de tortillons d'argent. Tout comme dans l'étude de la distribution de l'E-24.11 dans l'EM du Rat, la plupart des grains d'argent sont situés sur des appositions de membranes entre TN et entre TN et tanocyte. La distribution des grains est en tout point semblable à la distribution observée antérieurement (voir Résultats, A). L'analyse des doubles détections permet de déterminer la nature des systèmes neuroendocriniens qui possèdent l'E-24.11 au niveau de leurs TN dans l'EM. L'analyse de nombreuses microphotographies de chaque double marquage, selon des critères précis développés dans la partie Matériel et

Méthodes (D-4), permet de connaître le ou les types de TN dont la membrane plasmique contient de l'E-24.11 (voir Tableau 2).

a) Double marquage endopeptidase-24.11/tyrosine hydroxylase

L'analyse de cette double détection a été réalisée sur 39 coupes ultrafines. De nombreuses TN immunoréactives pour la TH (n=291), souvent observées à proximité des capillaires fenêtrés, ont été photographiées. La majorité (n=171) de ces TN sont marquées par au moins un tortillon d'argent (Fig. 7). Parmi ces 171 boutons terminaux, 45 exhibent plusieurs grains d'argent sur des appositions impliquant leur membrane plasmique (Fig. 7A, 7B, 7C, 7D, 7E). Ces chiffres sont repris dans le tableau 2. Quelques grains sont observés sur des appositions de membranes entre 2 TN remplies par des précipités de DAB. Lorsque la conservation du tissu est moins bonne et que la cohésion n'est pas parfaite, il est possible d'observer des grains d'argent sur la membrane plasmique de TN marquées pour la TH (Fig. 8A structure 5). D'autre part, pour ce double marquage, des TN immunoréactives pour la TH sont marquées par l'anti-E-24.11 sur des coupes ultrafines adjacentes (Fig. 8A, 8B et 8C, 8D).

Des TN ne présentant pas de précipités de DAB mais marquées par l'anticorps mAb 85 A2 sont régulièrement observées.

Parmi les grains d'argent que nous avons observés sur des appositions entre TN (n=412), 61% sont situés sur des appositions impliquant une TN immunoréactive pour la TH. Les autres grains (39%) sont observés sur des appositions de membranes entre TN de nature non déterminée.

b) Double marquage endopeptidase-24.11/gonadolibérine

Un total de 44 coupes ultrafines provenant de différents animaux a été étudié et 122 boutons terminaux présentant des précipités de DAB ont été photographiés. Les boutons immunoréactifs pour le GnRH sont peu nombreux et sont le plus souvent localisés assez loin des capillaires fenêtrés. Aucune TN positive pour le GnRH n'est observée en contact avec l'espace péricapillaire.

Parmi les 122 TN, seules 34 présentent un grain d'argent sur leur membrane plasmique (Fig. 9C, 9D, 10C). Les autres, qui représentent donc la majorité (n=88), sont dépourvues du marquage caractéristique (Fig. 9A, 9B, 10A, 10B, 10D).

Des TN immunoréactives pour le GnRH marquées par plusieurs grains d'argent ne sont jamais observées, alors que des boutons de nature différente (autre que GnRH) et des tancytes multimarqués sont régulièrement observés (Fig. 9D).

c) Double marquage endopeptidase-24.11/corticolibérine

Un total de 40 coupes ultrafines de cette double détection ont été observées. Les champs présentant un double marquage, c'est à dire simultanément des grains d'argent et des précipités de DAB, ont été systématiquement photographiés. Ce travail a permis d'étudier attentivement 198 TN immunoréactives pour le CRF (voir tableau 2). Parmi ces 198 TN, une majorité (n=125) ne présente aucun grain d'argent sur des appositions impliquant leur membrane plasmique. Sur ce point précis, le marquage E-24.11/CRF ressemble au marquage E-24.11/GnRH. Cependant, certains boutons terminaux (n=10) immunoréactifs sont marqués par plusieurs grains d'argent, ce qui laisse supposer qu'au moins certaines TN à CRF possèdent l'E-24.11 (Fig. 11C, 12A). D'autres boutons immunoréactifs pour le CRF (n=63) sont marqués par un grain d'argent sur une de leurs appositions avec une autre structure ne présentant pas de précipité dense aux électrons (Fig. 11A, 11B, 12B, 12D).

Il n'a pas été possible de suivre des TN marquées sur des coupes ultrafines adjacentes pour ce double marquage. Cependant, dans certains cas, lorsque la conservation du tissu est moins bonne, des tortillons d'argent ont été observés sur la membrane plasmique de TN immunoréactives pour le CRF (Fig. 11D). Le marquage anti-E-24.11 a donc pu être attribué à ces TN à CRF. Quelques grains d'argent ont été observés sur des appositions de membranes entre 2 TN positives pour le CRF (Fig. 12C).

D'autre part, des TN de nature non déterminée (non CRF) marquées sont souvent observées (Fig. 11D).

d) Double marquage endopeptidase-24.11/somatostatine

L'analyse de ce double marquage a été menée sur 41 coupes ultrafines provenant de plusieurs coupes au vibratome et de différents animaux. Un total de 304 TN immunoréactives pour la SOM a été observé dans des régions de la zone externe de l'EM montrant simultanément un signal radioautographique anti-E-24.11. L'analyse de la distribution relative des 2 marquages (DAB et tortillons) conduit aux résultats exprimés dans le

tableau 2. Sur les 304 TN immunoréactives, 233 (76.65%) ne présentent aucun grain d'argent sur les appositions impliquant leur membrane plasmique (Fig. 13A, 13B, 13C, 13D, 14A, 14B, 14D, 14E) et 71 (23.35%) présentent un seul tortillon (Fig. 14C).

Des boutons terminaux remplis d'un précipité de DAB marqués par plusieurs grains d'argent ne sont jamais observés. Des TN multimarquées par l'anti-E-24.11 mais non immunoréactives pour la SOM sont couramment vues (Fig. 14A, 14B, 14D, 14E), parfois même à proximité de TN positives pour la SOM (Fig. 14A, 14D, 14E).

e) Double marquage endopeptidase-24.11/somatolibérine

Il a été nécessaire d'observer un plus grand nombre de coupes ultrafines (n=45) en raison d'une densité de TN immunoréactives pour le GRF relativement faible sur nos sections (ce qui était d'ailleurs déjà visible sur les coupes au vibratome).

A l'échelle de la microscopie électronique, les TN immunoréactives pour le GRF sont souvent observées à proximité des capillaires fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. Parmi les 120 TN positives pour le GRF, la majorité (n=99) ne présente aucun signal radioautographique anti-E-24.11 (Fig. 15B, 15C, 15D, 16A, 16B, 16D, 16E). Les autres boutons terminaux (n=21) sont marqués par un grain d'argent sur une de leurs appositions avec une structure ne présentant pas de précipités de DAB (Fig. 15A, 16C). Enfin, aucune TN immunoréactive pour le GRF marquée par plusieurs tortillons d'argent n'a été répertoriée alors que des boutons multimarqués de nature inconnue (non GRF) sont souvent observés (Fig. 16B, 16D).

f) Double marquage endopeptidase-24.11/thyrolibérine

Comme nous l'avons indiqué précédemment, cette double détection n'a pas été analysée car le marquage obtenu avec l'anti-TRH utilisé n'était pas satisfaisant. Des précipités de DAB ont notamment été observés dans les tanocytes.

En conclusion, les doubles détections réalisées ont permis de montrer que l'E-24.11 est insérée dans la membrane plasmique de nombreuses TN immunoréactives pour la TH et de certaines TN marquées par un anti-CRF.

Inversement, les résultats obtenus ne sont pas en faveur de la présence de cette enzyme sur les TN à GnRH, à SOM et à GRF de l'EM.

Tableau 2. Présence de grains d'argent sur les TN de l'EM.

	Nombre de TN observé	1 grain d'argent	2 grains d'argent	aucun grain d'argent
TN immunoréactives pour la TH	291	126 (43.3%)	45 (15.5%)	120 (41.2%)
TN immunoréactives pour le GnRH	122	34 (27.8%)	0	88 (72.2%)
TN immunoréactives pour le CRF	198	63 (31.8%)	10 (5%)	125 (63.2%)
TN immunoréactives pour la SOM	304	71 (23,35%)	0	233 (76,65%)
TN immunoréactives pour le GRF	120	21 (17,5%)	0	99 (82,5%)

Figure 6. Contrôles.

(A) Radioautogramme d'une coupe semi-fine (1 μm d'épaisseur) d'éminence médiane de Rat obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec l'anticorps (^{125}I) mAb 85 A2.

Le marquage est essentiellement constitué de grains d'argent diffus. Quelques amas de grains sont observés (flèches) mais, à ce grossissement, il est impossible de définir la nature des compartiments cellulaires marqués. Notons au passage le très faible signal non spécifique (fond) visible dans les capillaires.

NEP: E-24.11.

(B) Observation d'une coupe semi-fine (1 μm d'épaisseur) réalisée à partir d'une coupe au vibratome incubée avec un immunosérum anti-TH.

Le marquage anti-TH est visualisable grâce aux précipités de DAB. Sur les coupes semi-fines, il est très difficile de différencier les grains d'argent (A) des précipités de DAB (B). Il est par conséquent impossible d'analyser les possibilités de doubles marquages à ce grossissement.

(C) Radioautogramme d'une coupe semi-fine (1 μm d'épaisseur) d'éminence médiane de Rat obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec de l'iode 125 libre.

Dans ce cas, quelques très rares grains d'argent diffus sont observés.

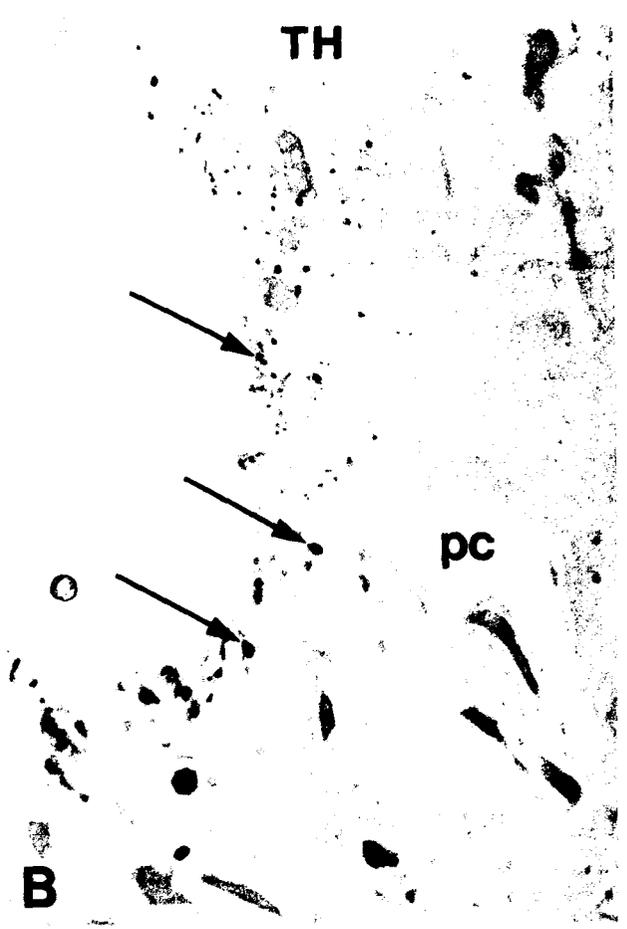
(D) Radioautogramme d'une coupe semi-fine (1 μm d'épaisseur) d'éminence médiane de Rat réalisée à partir d'une coupe épaisse incubée avec des immunoglobulines de souris saines iodées.

Un très faible signal non spécifique est observé au niveau des capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire (pc).

Grossissement pour toutes les microphotographies: x 1800.



CONTROL



C

D

Figure 7. Microphotographies en microscopie électronique de coupes ultrafines obtenues à partir de coupes au vibratome incubées simultanément avec un immunsérum anti-TH et l'anti-E-24.11.

Les précipités denses aux électrons indiquent la présence de TH et les tortillons d'argent signalent la présence d'E-24.11. La plupart des terminaisons nerveuses immunoréactives pour la TH sont marquées par au moins un grain d'argent.

(A, B, C, D et E) Boutons immunoréactifs pour la TH présentant plusieurs grains d'argent sur leur membrane plasmique.

(A et D) Des terminaisons nerveuses de nature inconnue (non TH) sont également multimarquées par plusieurs grains d'argent.

E.p., prolongement épendymaire; ps, espace péricapillaire.

Barre d'échelle: 0.5 μ m.



Figure 8. Deux paires de coupes ultrafines adjacentes (A, B et C, D) obtenues à partir de coupes au vibratome incubées dans un mélange d'anticorps constitué d'un anti-TH et de l'anti-E-24.11.

Dans les 2 exemples, de nombreuses structures (2, 4, 5, 11, 13, 14, 15) sont immunoréactives pour l'E-24.11 sur les 2 coupes adjacentes. Ceci est un bon critère de spécificité. Dans la plupart des cas, ces structures sont des terminaisons nerveuses immunoréactives pour la TH (2, 4, 5, 11, 13) mais des boutons terminaux non immunoréactifs pour la TH sont aussi marqués par des grains d'argent sur les 2 coupes (14, 15).

E. p., prolongement épendymaire; c, capillaire.

Barre d'échelle: 0.5 μm .

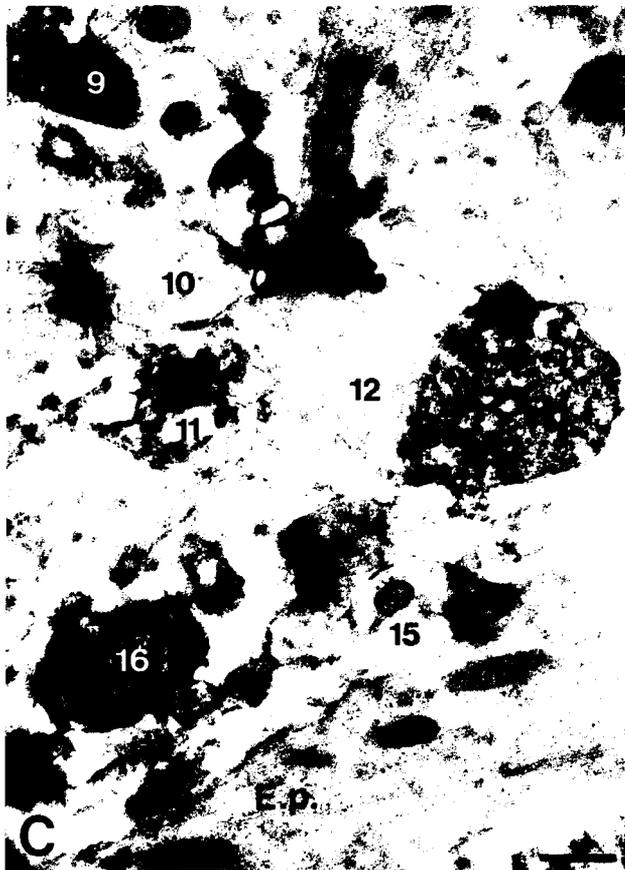
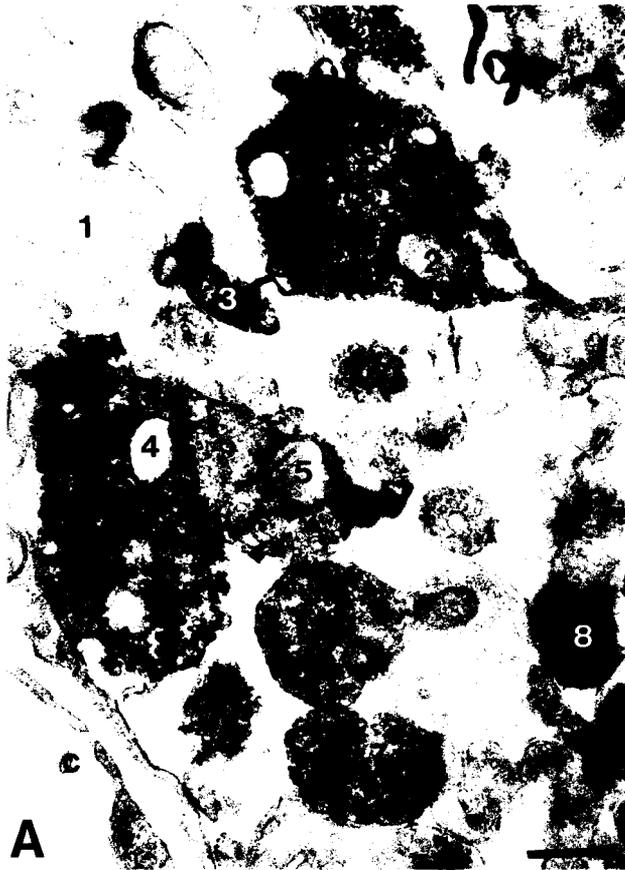


Figure 9. Microphotographies de coupes ultrafines obtenues à partir de coupes au vibratome simultanément incubées avec un immunsérum anti-GnRH et l'anticorps (125 I) mAb 85A2.

A cette échelle, les précipités denses aux électrons indiquent la présence de GnRH et les grains d'argent la présence d'E-24.11.

(A et B) Dans la majorité des cas, les terminaisons nerveuses immunoréactives pour le GnRH ne montrent aucun grain d'argent sur leur membrane plasmique.

(C et D) Un tortillon sur une apposition de membranes impliquant un bouton terminal immunoréactif pour le GnRH est occasionnellement observé.

(D) Des structures de nature inconnue marquées par plusieurs grains d'argent sont souvent observées.

E. p., processus épendymaire.

Barre d'échelle: 0.5 μ m.



Figure 10. Radioautogrammes de coupes ultrafines réalisées à partir de coupes épaisses incubées avec un anti-GnRH et l'anti-E-24.11.

(A, B et D) Dans la majorité des cas, les terminaisons nerveuses immunoréactives pour le GnRH ne sont pas marquées par l'anti-E-24.11 alors que dans le même champ microphotographique, des boutons terminaux d'une nature chimique différente possèdent un, voire plusieurs grains d'argent.

(C) Néanmoins, certaines appositions impliquant une terminaison nerveuse immunoréactive pour le GnRH sont marquées par un grain d'argent.

Barre d'échelle: 0.5 μ m.

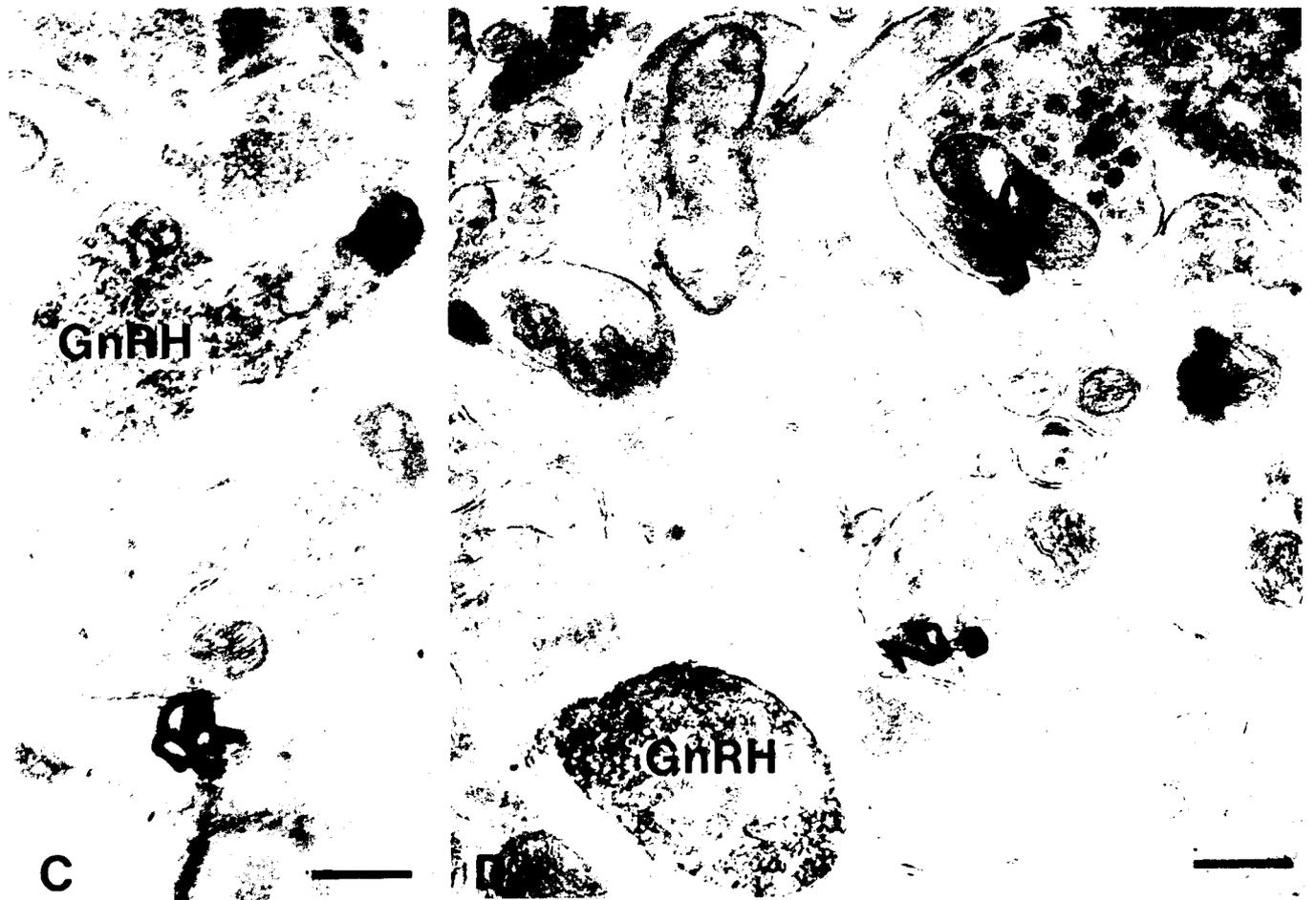
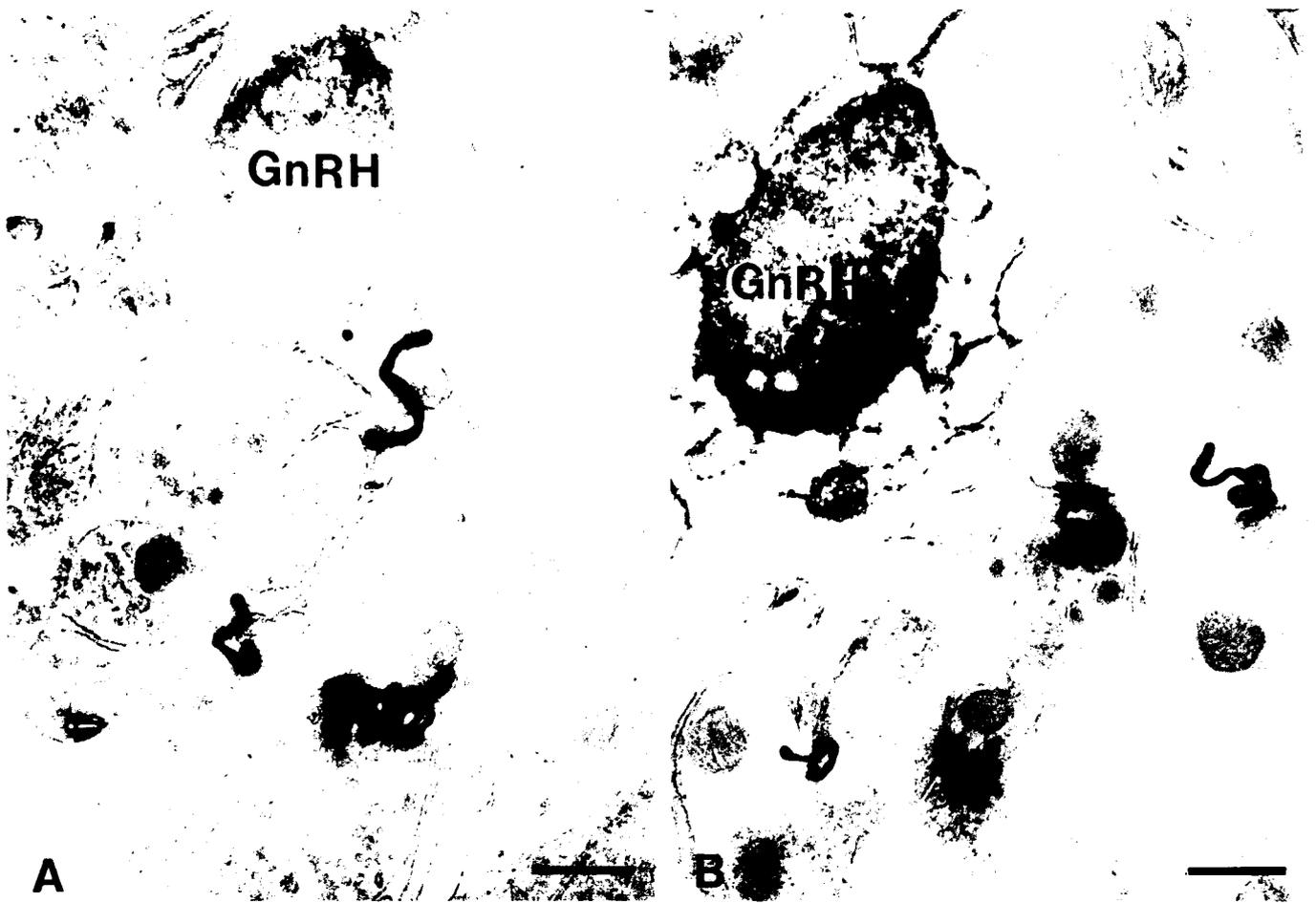


Figure 11. Radioautogrammes de coupes ultrafines issues de coupes épaisses incubées dans un cocktail d'anticorps constitué d'un anti-CRF et de l'anti-E-24.11.

(A et B) Une fraction importante (environ 1 tiers), des terminaisons nerveuses immunoréactives pour le CRF est marquée par un grain d'argent.

(C) Certains boutons terminaux immunoréactifs pour le CRF apparaissent multimarqués.

(D) Lorsque la conservation du tissu est moins bonne, il est possible d'observer des tortillons sur la membrane plasmique de terminaisons nerveuses immunoréactives pour le CRF.

E. p., prolongement épendymaire.

Barre d'échelle: 0.5 μm .



Figure 12. Radioautogrammes de coupes ultrafines obtenues à partir de coupes au vibratome incubées dans un mélange d'immunsérums constitué d'un anti-CRF et de l'anti-E-24.11.

(A) Bouton terminal immunoréactif pour le CRF présentant 2 grains d'argent sur des appositions impliquant sa membrane plasmique.

(B et D) Terminaisons nerveuses immunoréactives pour le CRF marquées par un tortillon.

(C) Grain d'argent partagé entre 2 terminaisons positives pour le CRF.

E. p., prolongement épendymaire.

Barre d'échelle: 0.5 μ m.

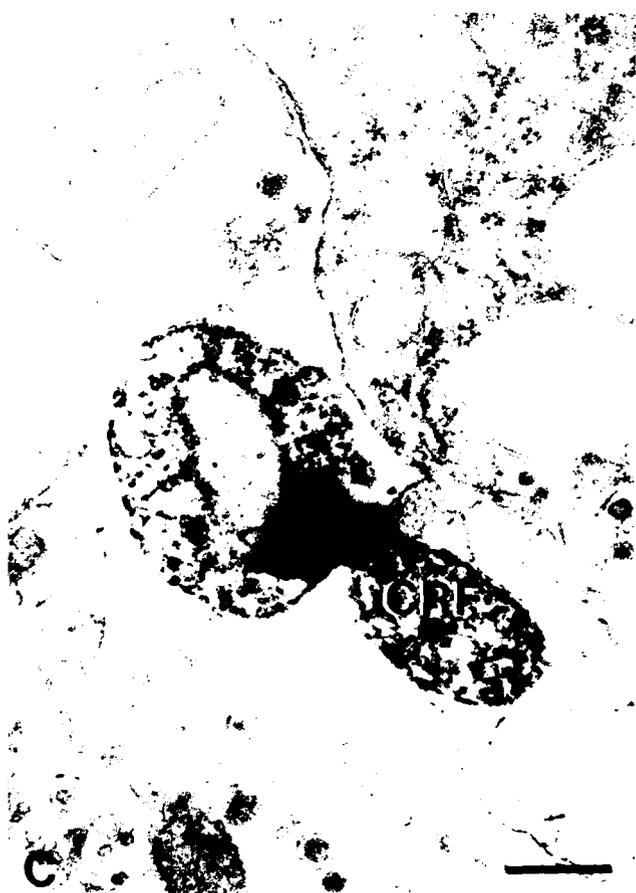


Figure 13. Microphotographies de coupes ultrafines obtenues à partir de coupes au vibratome incubées dans un mélange d'anticorps comprenant un anti-SOM et l'anti-E-24.11.

L'immunoréactivité pour la SOM apparaît sous la forme d'un précipité de DAB dense aux électrons. Le signal radioautographique (tortillons) correspond au marquage anti-E-24.11.

(A, B, C et D) La grande majorité de terminaisons nerveuses immunoréactives pour la SOM ne présente aucun grain d'argent sur les appositions de membranes impliquant leur membrane plasmique

E. p., prolongement épendymaire.

Barre d'échelle: 0.5 μm .

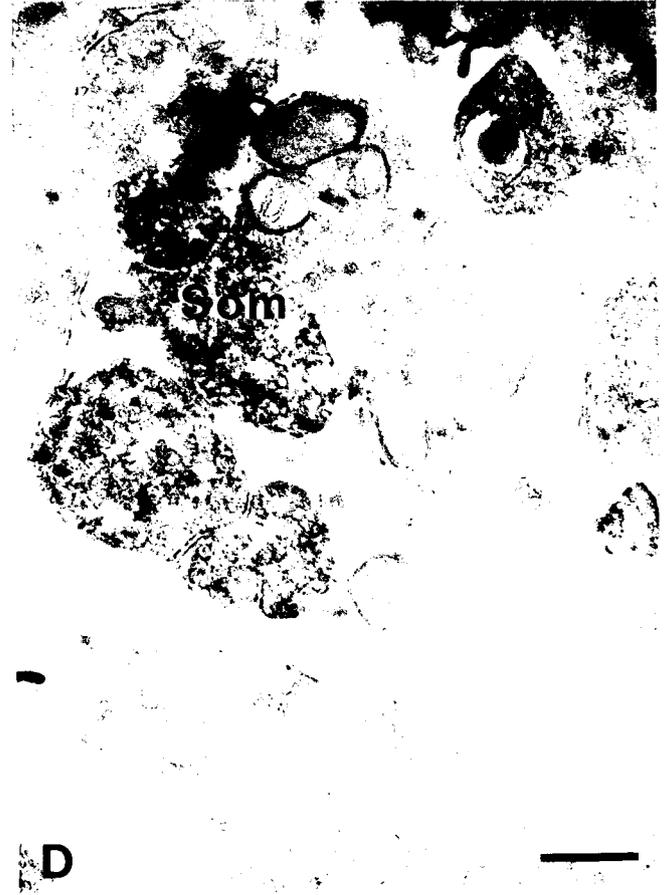
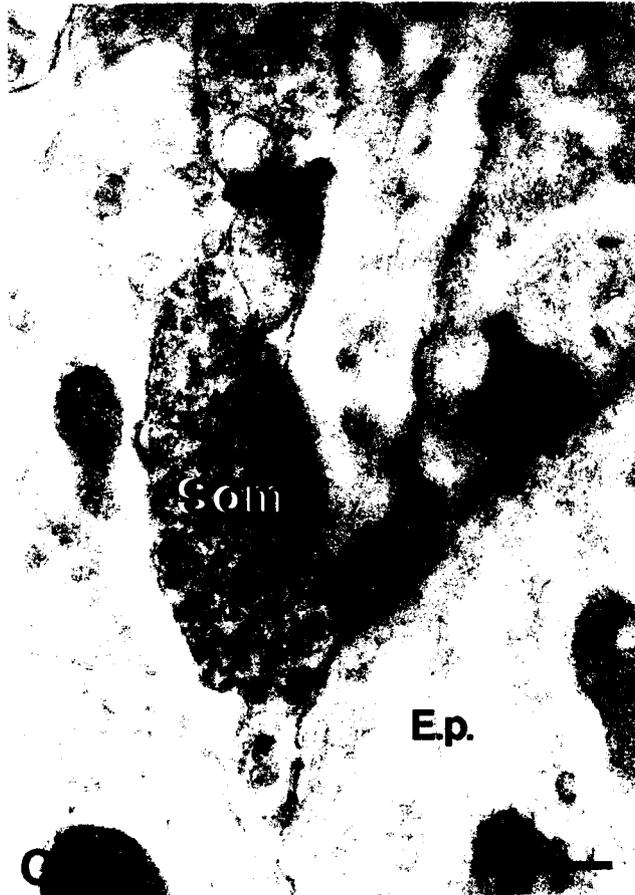


Figure 14. Radioautogrammes de coupes ultrafines issues de coupes au vibratome incubées simultanément avec l'anti-SOM et l'anti-E-24.11.

(A, B, D et E) Autres exemples de terminaisons nerveuses immunoréactives pour la SOM ne présentant aucun grain d'argent sur leur membrane plasmique. Dans le même champ, des boutons terminaux négatifs pour la SOM mais marqués par plusieurs tortillons sont souvent observés.

(C) Une terminaison nerveuse positive pour la SOM possède un grain d'argent.

Barre d'échelle: 0.5 μm .

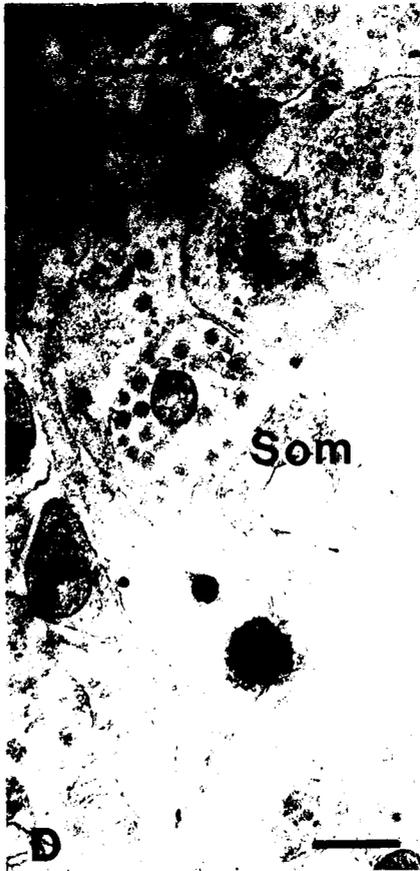


Figure 15. Microphotographies de coupes ultrafines obtenues à partir de coupes épaisses incubées dans un mélange d'anticorps constitué d'un anti-GRF et de l'anti-E-24.11.

(A) Certains grains d'argent sont situés sur une apposition entre une terminaison positive pour le GRF et une structure ne présentant pas de précipité de DAB.

(B, C et D) La majorité des terminaisons nerveuses immunoréactives pour le GRF ne présente aucun grain d'argent sur les appositions impliquant leur membrane plasmique.

Barre d'échelle: 0.5 μm .

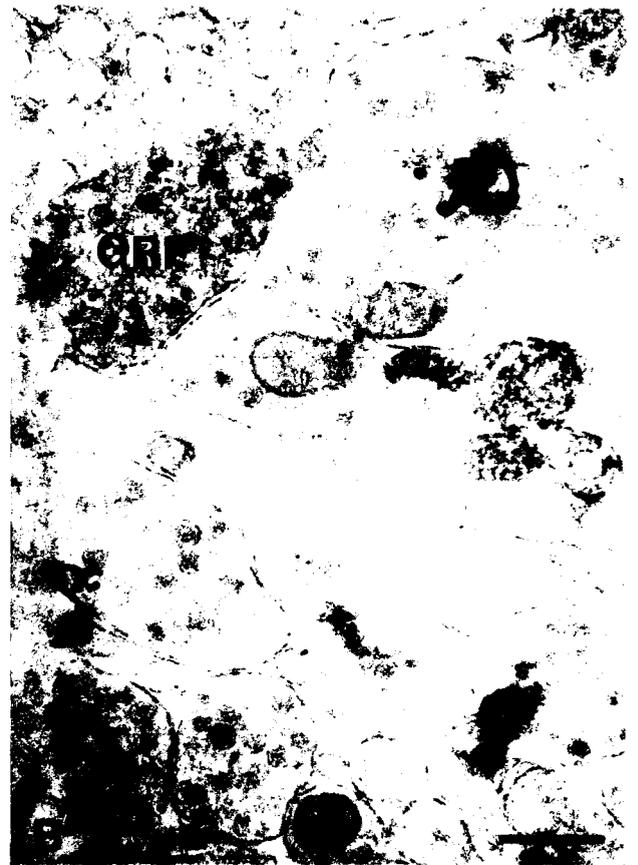


Figure 16. Radioautogrammes de coupes ultrafines issues de coupes au vibratome incubées simultanément avec un anti-GRF et l'anti-E-24.11 iodé.

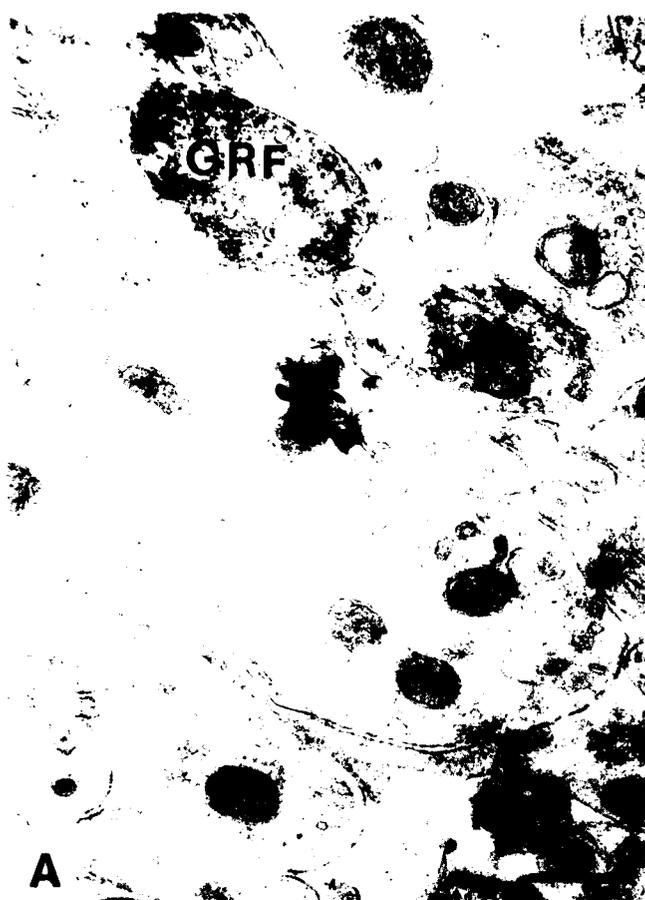
(A, B, D et E) Autres exemples de terminaisons nerveuses positives pour le GRF ne présentant aucun signal radioautographique sur les appositions de membranes impliquant leur membrane plasmique.

(B et D) Des boutons multimarqués, non immunoréactifs pour le GRF, sont régulièrement observés.

(C) Exemple de terminaison nerveuse immunoréactive pour le GRF marquée par 1 grain d'argent sur une de ses appositions avec une structure ne contenant pas de précipité de DAB.

E. p., prolongement épendymaire.

Barre d'échelle: 0.5 μm .



C- L'ENDOPEPTIDASE -24.11 PENDANT LA LACTATION

Il a été récemment montré qu'une augmentation de la synthèse des ENK dans le système tubéroinfundibulaire dopaminergique (TIDA) survient pendant la lactation (Fitzsimmons et Hoffman, 1989; Ciofi *et al.*, 1993; Merchenthaler, 1993). La lactation constitue donc une condition physiologique particulière faisant varier la quantité d'ENK dans la zone externe de l'EM. Dans cette partie de l'étude, nous détectons l'E-24.11 dans l'EM du Rat pour voir si, au cours de la lactation, l'expression de cette enzyme, impliquée dans l'inactivation biologique des ENK, varie avec celle des ENK.

Les ENK, les NK et l'E-24.11 sont donc détectées par immunocytochimie sur coupes au cryostat d'EM de rates lactantes (nursing females) et de rates séparées de leurs petits 48 h plus tôt (no pups 48H).

L'E-24.11 est une fois encore détectée par radioimmunocytochimie directe à l'aide de l'anticorps monoclonal mAb 85A2 iodé. Après radioautographie, le marquage se manifeste sous la forme de grains d'argent.

Les ENK et les NK sont détectées par immunocytochimie indirecte. Le marqueur de l'anticorps secondaire étant la FITC, le signal apparaît sous la forme d'une fluorescence verte.

1) Détection radioimmunocytochimique de l'endopeptidase-24.11

a) *Macroradioautographie*

Sur les films de macroradioautographie, le marquage obtenu au niveau de l'EM semble plus intense chez les femelles lactantes que chez les femelles séparées des petits (Fig. 17a, 17e), mais il n'a pas été possible de quantifier le signal radioautographique de la zone externe de l'EM à ce niveau de résolution. D'autre part, le marquage très intense des noyaux entopédunculaires, connus pour leur richesse en E-24.11, confirme la qualité et l'efficacité de l'iodation de l'anticorps utilisé.

b) *Radioimmunocytochimie sur coupes au cryostat*

L'immunoréactivité pour l'E-24.11, qui apparaît sous la forme de grains d'argent, est plus forte dans l'EM des femelles lactantes que dans l'EM des femelles séparées de leur portée depuis 48h. De plus, une variation très nette de l'immunoréactivité est visible dans les régions latérales de la zone externe (Fig. 17b, 17f).

La quantification de la réaction radioimmunocytochimique anti-E-24.11 au moyen d'un analyseur d'image s'avère nécessaire afin de comparer le groupe des femelles lactantes au groupe des femelles séparées de leurs petits et de donner un ordre de grandeur à la variation observée sur les lames.

L'analyse quantitative de lames représentatives des 2 groupes de femelles révèle une baisse significative (de moitié) de la densité optique moyenne (DOM) de la réaction chez les femelles séparées ($P < 0,05$ Mann-Whitney U-test). Cette analyse quantitative est détaillée dans le tableau 3. L'analyse quantitative de l'immunoréactivité pour l'E-24.11 au niveau des noyaux entopédunculaires ne révèle aucune différence entre les femelles lactantes et les femelles séparées (voir tableau 3). Cette quantification de la réaction au niveau des noyaux entopédunculaires constitue un contrôle supplémentaire. En effet, l'absence de différences significatives entre les femelles lactantes et les femelles séparées dans cette région montre que la variation observée dans l'EM est due à l'état physiologique des rates et non pas aux conditions techniques.

2) Détection immunocytochimique des neuropeptides

a) Détection des enképhalines

Chez les femelles lactantes, un intense marquage est obtenu pour les ENK au niveau de la zone externe de l'EM (Fig. 17c). Une baisse très importante de cette immunoréactivité survient après le retrait des petits (Fig. 17g). L'étude immunocytochimique étant effectuée en fluorescence (FITC), la quantification n'a pas été possible mais une estimation a été réalisée car les différences sont très nettes. Les variations observées sont symbolisées dans le tableau 3.

b) Détection des neurokinines

L'immunoréactivité observée pour les NK est rigoureusement identique chez les femelles lactantes et les femelles séparées de leur portée. Les NK sont quasiment absentes de la zone palissadique de l'EM (Fig. 17d, 17h).

Tableau 3. Variation relative de l'immunoréactivité pour l'E-24.11 et les ENK dans la zone externe de l'EM et dans une région contrôle (EP) chez des rates lactantes.

		Femelles lactantes (n=4)	Femelles séparées (n=4)
EM	E-24.11*	9.43 ± 1.44	4.34 ± 0.52
	ENK	+++	+
EP	E-24.11	30.00 ± 8.12	26.68 ± 5.65

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des densités optiques moyennes (DOM) déterminées pour les 4 animaux constituant chaque groupe expérimental. La DOM du fond a été systématiquement soustraite de ces valeurs.

Le marquage radioautographique anti-E-24.11 a été quantifié sur 20 coupes au cryostat par animal. Un total de 160 coupes à congélation a donc été analysé.

EP: entopeduncular nucleus.

* valeurs significativement différentes ($p < 0.05$ suivant le Mann-Whitney U test).

Figure 17. Détection de l'E-24.11 (NEP) (a, b, e, f), des ENK (c, g) et des neurokinines (NK) (d, h) sur des coupes frontales d'éminence médiane de rates lactantes (a-d) et de rates séparées de leurs petits (e-h).

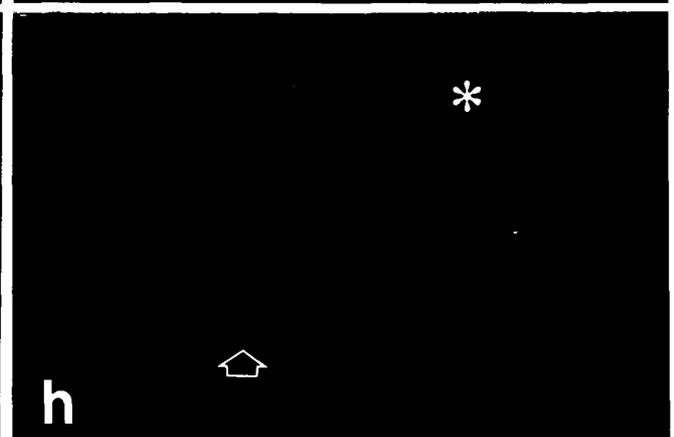
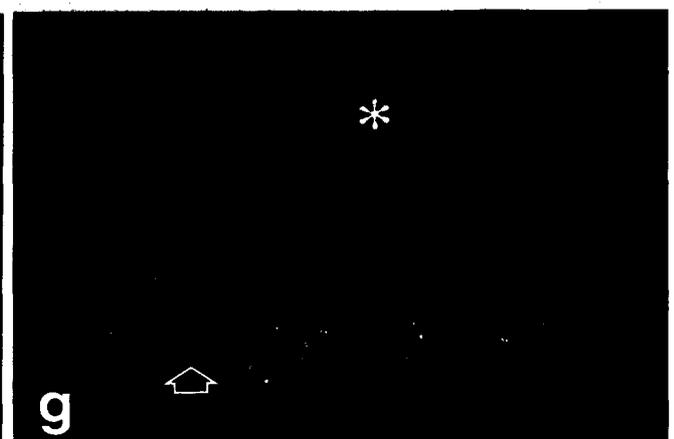
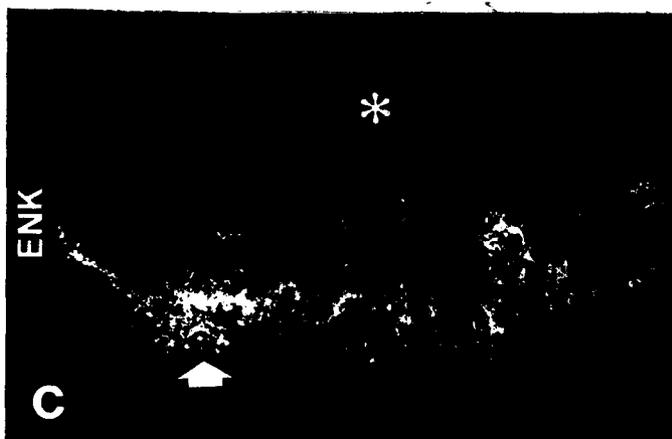
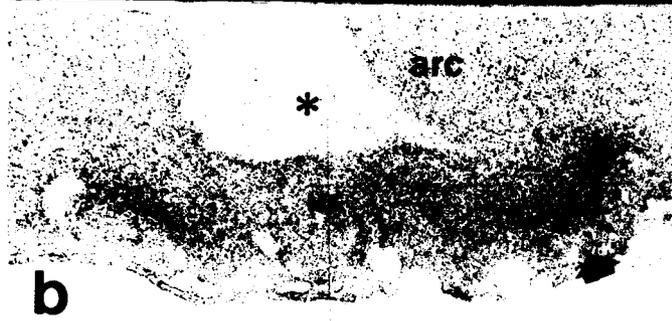
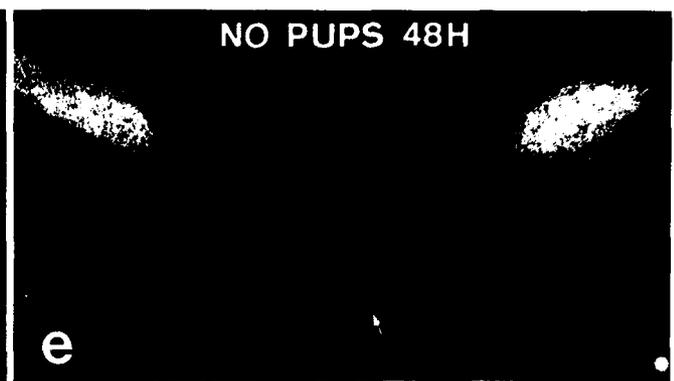
Sur les macroradioautogrammes (a, e), il est difficile d'apprécier une différence de marquage. Par contre, sur coupes, on peut constater un marquage par l'anti-E-24.11 beaucoup plus net, notamment dans les parties latérales, chez les femelles lactantes (b) que chez les femelles séparées de leurs petits (f).

Parallèlement, on constate que l'anti-ENK donne également une réaction plus forte chez ces mêmes femelles lactantes (c).

L'immunoréactivité obtenue avec l'anti-NK est quasiment absente de l'EM dans les 2 groupes.

* troisième ventricule

Grossissement: a, e, 10x; b-d, f-h, 200x.



D- MISE EN EVIDENCE DES RECEPTEURS AUX ENKEPHALINES

Les ENK sont susceptibles de se lier aux récepteurs opioïdes de type δ mais aussi de type μ (Simon, 1991). Ces 2 types de récepteurs ont donc été recherchés dans l'EM du Rat au moyen de ligands radioactifs hautement spécifiques.

1) Récepteurs opioïdes de type δ

Sur les coupes semi-fines réalisées à partir des coupes au vibratome incubées avec la (^{125}I) (D Ala²) Deltorphin-I, le signal radioautographique observé est constitué d'une densité très faible de grains d'argent. Ces grains d'argent sont répartis uniformément dans toute l'extension de l'EM (Fig. 18A).

Sur les coupes semi-fines obtenues à partir des coupes épaisses incubées avec le ligand iodé en présence de levorphanol, le signal est semblable. Seuls quelques grains sont vus et leur répartition dans le tissu est homogène (Fig. 18B).

Le nombre de grains d'argent compté (par cm^2) sur les photographies de coupes incubées en présence du compétiteur froid (levorphanol) est égal au nombre de grains évalué sur les microphotographies des coupes incubées avec le ligand seul. Le signal observé est donc non spécifique.

2) Récepteurs opioïdes de type μ

Sur les semi-fines issues des coupes au vibratome incubées avec le (^{125}I) FK-33824, le marquage est réparti sur l'ensemble de l'EM. Au niveau de la zone externe plus précisément, une densité modérée de grains est le plus souvent observée, parfois quelques amas de grains sont visibles (Fig. 19A).

Le signal radioautographique apparaît relativement hétérogène. Les variations de densité de sites de liaison et les amas de grains ne peuvent pas être associés à des compartiments cellulaires car ceux-ci ne sont pas discriminables à l'échelle photonique. Cependant, cette distribution hétérogène du signal suggère que le marquage pourrait être localisé au niveau de certaines TN ou de tanocytes, qui sont les principales structures constituant la zone externe de l'EM.

Aucune variation importante n'a été observée d'un animal à l'autre.

Les coupes semi-fines obtenues à partir de coupes épaisses incubées en présence de (^{125}I) FK-33824 et de naloxone en excès, présentent un signal

beaucoup plus faible distribué de façon plus homogène que sur les coupes incubées en présence du ligand seul (Fig. 19B).

Le nombre de grains compté (par cm^2) sur les microphotographies de coupes semi-fines incubées avec le ligand saturé par la naloxone permet d'évaluer la liaison non spécifique qui est de 15 grains par cm^2 . Les grains d'argent dénombrés sur les microphotographies de coupes semi-fines incubées en présence de FK-33824 iodé permettent de connaître la liaison totale qui, dans notre étude, est de 44 grains par cm^2 .

La liaison spécifique est calculée en déduisant la liaison non spécifique de la liaison totale. La liaison non spécifique est généralement exprimée en pourcentage. Dans notre expérimentation, les grains d'argent détectés sur les microphotographies de coupes incubées en présence de naloxone représentent 34% de ceux comptés sur coupes incubées avec le (^{125}I) FK-33824 seul. La liaison spécifique correspond par conséquent à 66% de la liaison totale. Autrement dit, 66% des grains observés sont directement liés à la présence de sites de liaison de type μ .

Figure 18. Radioautogrammes de coupes semi-fines (2 μm d'épaisseur) de la zone externe de l'éminence médiane de Rat.

(A) Microphotographie d'une coupe semi-fine obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec la (^{125}I) (D Ala²) Deltorphin-I seule.

Le signal radioautographique observé est constitué d'une densité très faible de grains d'argent. Ces grains sont répartis uniformément dans tout le tissu.

(B) Microphotographie d'une coupe semi-fine obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec la (^{125}I) (D Ala²) Deltorphin-I en présence de levorphanol.

Le signal radioautographique observé est similaire, seuls quelques grains distribués de façon homogène dans le tissu sont observés.

Grossissement: x 1800.

Deltaorphin-I, Total

A

Levorphanol

B



Figure 19. Radioautogrammes de coupes semi-fines (2 μm d'épaisseur) de la zone externe de l'éminence médiane de Rat.

(A) Microphotographie d'une coupe semi-fine obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec le ^{125}I FK-33824 seul.

Le signal radioautographique apparaît relativement hétérogène. Une densité modérée de grains est observée et quelques amas de grains sont visibles. Il n'est pas possible de déterminer la nature des structures marquées à cette échelle.

(B) Microphotographie d'une coupe semi-fine obtenue à partir d'une coupe au vibratome incubée avec le (^{125}I) FK-33824 en présence de naloxone.

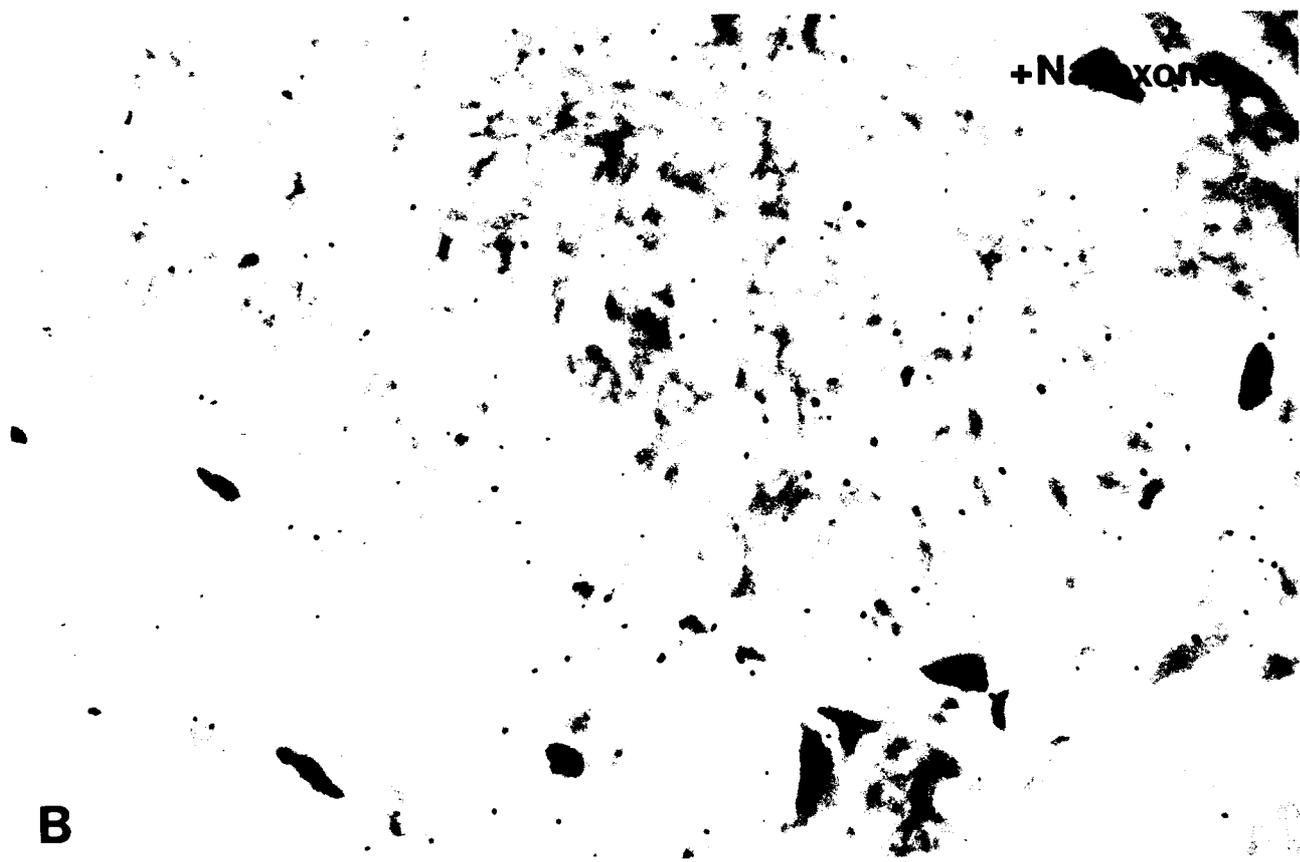
Le signal radioautographique observé est beaucoup moins intense et semble distribué de façon plus homogène.

Grossissement: x 1800.



A

FX-101



B

+Naloxone

DISCUSSION

DISCUSSION

Plus de 30 peptides ont été identifiés dans le système nerveux central. Alors que la distribution d'une grande partie de ces peptides est aujourd'hui bien connue, très peu de données sont disponibles concernant les mécanismes d'inactivation de ces peptides. Il serait surprenant que chaque neuropeptide possède son propre mécanisme d'inactivation (Krieger, 1983). Cependant, l'existence de neuropeptidases d'inactivation impliquées dans l'hydrolyse des neuropeptides endogènes après leur libération est indéniable (Schwartz, 1983).

Deux modes d'inactivation peuvent être envisagés 1- une dégradation extracellulaire comme dans le cas de l'Acétylcholine (Whittaker *et al.*, 1972) ou 2- une hydrolyse intracellulaire suite à une recapture du peptide comme dans le cas du GABA (Turner et Whittle, 1983). Bien que l'existence de mécanismes de recapture ne puisse pas totalement être exclue, le consensus actuel s'oriente plutôt vers une inactivation extracellulaire des peptides (Segawa *et al.*, 1977; Iversen *et al.*, 1978; Krieger, 1983). Les peptides endogènes seraient donc dégradés par des peptidases membranaires (exopeptidases et endopeptidases) disposées stratégiquement à la surface cellulaire.

Deux concepts se sont rapidement opposés dans l'étude des enzymes impliquées dans l'inactivation des neuropeptides. En effet, différentes revues traitant du métabolisme des neuropeptides (Schwartz *et al.*, 1981; Hersch, 1982; Schwartz, 1983; Wilk, 1983) impliquent l'existence de spécificités orientées des peptidases alors que d'autres travaux davantage axés sur l'enzymologie, les considèrent plutôt ubiquitaires (Matsas *et al.*, 1983; Turner *et al.*, 1985).

A ce jour, aucune neuropeptidase d'inactivation strictement spécifique n'a été découverte. Par conséquent, le rôle physiologique de ces enzymes doit être vu à la lumière de leur localisation, donc de leur environnement en neuropeptides (Turner *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 1986) et de l'affinité pour ces neuropeptides.

-Spécificité de l'endopeptidase-24.11

Les ENK sont essentiellement inactivées par une endopeptidase (l'E-24.11) et par une aminopeptidase (l'aminopeptidase M, E.C.3.4.24.11, APM).

L'inhibition de ces 2 enzymes, respectivement par le thiorphan et par la bestatine, ou par un inhibiteur mixte : le kélatorphan, protège la totalité des ENK endogènes (voir Schwartz *et al.*, 1986).

Contrairement à l'E-24.11, l'APM est une peptidase de dégradation générale, potentiellement capable d'hydrolyser tous les peptides dont la partie N-terminale n'est pas protégée (Turner *et al.*, 1985).

In vitro, l'E-24.11 est capable de cliver divers neuropeptides tels que la substance P, les ENK, la neurotensine, l'angiotensine, la cholécystokinine et le facteur natriurétique atrial (Turner *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 1986).

Compte tenu de la distribution particulièrement large de l'E-24.11 dans l'organisme (Ronco *et al.*, 1988), certains auteurs considèrent que cette enzyme joue un rôle général dans l'inactivation biologique des peptides endogènes à la surface des cellules (Matsas *et al.*, 1983; Turner *et al.*, 1985). Cette hypothèse attribuant à l'E-24.11 un rôle ubiquitaire, est en contradiction avec les travaux sur l'affinité de l'E-24.11 pour ses différents substrats potentiels. L'E-24.11 possède en fait une spécificité fortement orientée. L'affinité de l'enzyme, exprimée par la constante de clivage, est très élevée pour la substance P et les ENK, et très faible pour l'angiotensine, la cholécystokinine et la neurotensine (Turner *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 1986) (voir Généralités, Tableau A).

L'affinité de l'E-24.11 pour la substance P est particulièrement élevée, et même supérieure à l'affinité de l'enzyme pour les ENK. L'E-24.11 serait impliquée dans l'inactivation physiologique de la substance P du système nerveux central, notamment dans la substance noire (Mauborgne *et al.*, 1987; Littlewood *et al.*, 1988; Barnes *et al.*, 1993). Ce n'est pas en raison de son rôle dans la dégradation de la substance P *in vivo* que l'E-24.11 a été particulièrement étudiée, mais plutôt parce que cette enzyme est impliquée dans l'inactivation biologique des ENK pour lesquelles elle présente également une très forte affinité (Matsas *et al.*, 1985; Mc Kelvy et Blumberg, 1986; Schwartz, 1988).

Dans le système nerveux central, l'E-24.11 joue un rôle primordial dans l'inactivation des ENK et de l'heptapeptide (Met⁵-enképhaline-Arg-Phe) (Schwartz *et al.*, 1981; Schwartz, 1983; Schwartz *et al.*, 1985; Lynch et Snyder, 1986; Mc Kelvy et Blumberg, 1986; Schwartz *et al.*, 1988). Trois voies d'expérimentation ont permis de mettre en évidence ce rôle d'enképhalinase 1-) l'inhibition de l'E-24.11 entraîne une augmentation de

la quantité d'ENK libérée par des tranches de cerveau en survie. Cette augmentation est certainement due à la protection dont bénéficient alors les ENK (Patey *et al.*, 1981; Alstein *et al.*, 1983; Bourgoïn *et al.*, 1986) 2-) les inhibiteurs de l'E-24.11 ont un rôle analgésique majeur chez les Rongeurs (Roques *et al.*, 1980; Chipkin *et al.*, 1982; Greenberg et O'Keefe, 1982; Kayser et Guilbaud, 1983; Ruprecht *et al.*, 1983, Mendelshon *et al.*, 1985; Costentin *et al.*, 1986; Lecomte *et al.*, 1986), mais aussi chez l'Homme (Floras *et al.*, 1983). 3-) chez des animaux traités avec des inhibiteurs de l'E-24.11, le taux du tripeptide Tyr-Gly-Gly, un composé résultant du métabolisme extracellulaire des peptides opioïdes libérés par les neurones à proenkephaline A, est considérablement réduit (Llorens-Cortes *et al.*, 1985a; 1985b; Giros *et al.*, 1986). De plus, la distribution de l'E-24.11 dans le cerveau, bien qu'hétérogène, est bien corrélée avec celle des ENK, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur de l'implication de l'E-24.11 dans l'inactivation des ENK (Malfroy *et al.*, 1979; Llorens-Cortes *et al.*, 1982; Pollard *et al.*, 1989).

L'E-24.11 serait également impliquée dans la dégradation de la neurotensine mais, pour ce neuropeptide, la situation est moins évidente. Quelques études sont en faveur d'une intervention de cette enzyme dans la dégradation de la neurotensine *in vivo* (Coquerel *et al.*, 1986; 1988; Kitabgi *et al.*, 1992). Par exemple, Kitabgi *et al.* (1992) ont montré que la quantité de neurotensine récupérée dans le liquide de périfusion d'hypothalamus de souris placés en survie est plus importante en présence de thiorphan. Ces auteurs considèrent la hausse de neurotensine comme un argument en faveur de l'implication de l'E-24.11 dans la dégradation de la neurotensine. Cependant, cette variation de la concentration de la neurotensine dans le milieu de survie peut être interprétée autrement. En effet, il est possible que la neurotensine augmente suite à l'action, au sein de l'hypothalamus, des ENK ou de la substance P qui sont de bien meilleurs substrats de l'E-24.11. Les conclusions de Kitabgi *et al.* (1992) sont en contradiction avec les observations de Turner *et al.* (1985) qui montrent que la dégradation de la neurotensine dans une préparation membranaire riche en E-24.11 est très peu sensible à une inhibition par le phosphoramidon ou le thiorphan. Par ailleurs, la constante de spécificité de l'E-24.11 pour la neurotensine est faible et même inférieure à la constante de spécificité pour la cholécystokinine (Turner *et al.*, 1985). La cholécystokinine n'étant pas clivée

in vivo (Zuzel *et al.*, 1985), une action significative de l'E-24.11 dans l'inactivation de la neurotensine paraît peu probable. D'autre part, ce neuropeptide est dégradé par différentes métalloenzymes avec beaucoup plus d'efficacité (Checler *et al.*, 1983; 1984; 1985; Kitabgi *et al.*, 1992).

Par conséquent, il semble que l'E-24.11 soit capable d'intervenir dans le métabolisme de la neurotensine, mais de façon tout à fait mineure. Dans le système nerveux central, l'E-24.11 est donc essentiellement impliquée dans l'inactivation biologique de la substance P et des ENK.

La substance P est quasiment absente de la zone externe de l'EM. La localisation ultrastructurale de l'E-24.11 nous permet donc de discuter du rôle éventuel des ENK dans cette région. Il est particulièrement intéressant de constater que, parmi les peptides opioïdes, l'E-24.11 ne clive que les dérivés de la proenképhaline, plus exactement la met- et la leu-ENK (Schwartz *et al.*, 1985). Cette propriété de l'E-24.11 nous permet de discuter du rôle éventuel des ENK dans l'EM où les substrats majeurs de l'enzyme semblent être les ENK.

-Considérations méthodologiques

Les méthodologies essentielles employées dans notre étude sont basées sur la détection immunocytochimique. Il faut rappeler que l'E-24.11 est détectée à l'aide de l'anticorps monoclonal mAb 85 A2 dont la sélectivité et la sensibilité ont été clairement établies (Pollard *et al.*, 1987a; 1987b; Ronco *et al.*, 1986; 1988). Cet anticorps reconnaît de façon sélective l'E-24.11 dans le cerveau et dans les organes périphériques alors que d'autres ectoenzymes, abondantes dans les mêmes tissus, ressemblent à l'E-24.11 (Swerts *et al.*, 1979; Almenoff *et al.*, 1981; Llorens-Cortes et Schwartz, 1981; Fulcher *et al.*, 1982; Malfroy et Schwartz, 1982). La spécificité de l'anticorps a été démontrée par différentes approches: 1-) par immunoprécipitation, l'anticorps se lie à une seule protéine de 90 kda, poids moléculaire de l'E-24.11 du Rat 2-) l'activité E-24.11 de fractions membranaires est supprimée lors de l'addition de l'anticorps mAb 85A2 à la préparation 3-) l'anticorps utilisé immunoprécipite les sites de liaison H³ thiorphan d'une préparation membranaire de striatum de Rat. De plus, des études montrent un parallélisme évident entre les régions marquées par l'anticorps mAb 85A2,

le H³ thiorphan et les régions possédant une activité E-24.11 (Pollard *et al.*, 1987a; 1987b; Ronco *et al.*, 1986; 1988). Par conséquent, l'anticorps mAb 85A2 est spécifique de l'E-24.11 et peut donc servir de marqueur afin d'établir la localisation ultrastructurale de l'E-24.11 dans l'EM.

L'étude de la distribution de l'E-24.11 dans l'EM à l'échelle ultrastructurale nécessite tout d'abord une bonne conservation morphologique des tissus. En général, une conservation morphologique optimale est obtenue par perfusion des animaux avec le liquide fixateur. Néanmoins, dans notre étude, une fixation par immersion donne de meilleurs résultats dans le cas de l'EM qui est une région particulièrement fragile. D'autre part, l'étude de Marcel *et al.* (1990) établit la composition d'un mélange fixateur permettant à la fois d'obtenir une bonne détection immunocytochimique de l'E-24.11 à l'aide de l'anticorps mAb 85A2 et une conservation ultrastructurale convenable du tissu nerveux. Le mélange fixateur contient très peu de glutaraldéhyde et donne une immunoréactivité égale à celle obtenue sur tissu frais. Fort de cette étude, nous détectons donc l'E-24.11 dans l'EM après une fixation par immersion pendant 1 h à température ambiante dans ce mélange fixateur. Ce mode de fixation nous a permis d'obtenir une conservation ultrastructurale satisfaisante rendant possible une analyse des résultats dans l'EM.

Une bonne interprétation des résultats repose également sur une coloration satisfaisante et un bon contraste des coupes ultrafines. Les risques de décollement des membranes de celloïdine, notamment lors de la double coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, sont minimisés en travaillant avec des bains glacés. A noter enfin que le dépôt de carbone, que l'on effectue après cette coloration, doit être très léger de façon à ne pas gêner le décollement des membranes de celloïdine lors de la récupération des coupes ultrafines après exposition radioautographique.

L'E-24.11 a été mise en évidence par radioimmunocytochimie. A l'échelle ultrastructurale, le marquage se manifeste sous la forme de tortillons d'argent d'une taille relativement importante (de l'ordre de 0.4 à 0.5 μm) par rapport aux structures sous-jacentes. Dans cette étude, l'E-24.11 est essentiellement détectée sur des appositions de membranes. Une telle localisation de l'E-24.11 est en accord avec d'autres études ultrastructurales

réalisées dans le neostriatum du Rat (Marcel *et al.*, 1990) et dans le globus pallidus et la substance noire du Porc (Barnes *et al.*, 1988b; 1992; 1993). Cependant, compte tenu des limites inhérentes à la technique radioautographique, il n'est pas possible de déterminer laquelle des 2 membranes constituant une apposition marquée possède réellement l'enzyme. Ce relatif manque de précision avec l'anticorps iodé et le fait que tout marquage radioautographique peut présenter un léger bruit de fond justifient l'étude statistique réalisée selon la méthode de Blackett et Parry, 1977, modifiée par Hamel et Beaudet, 1984.

Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus dans une autre région (le neostriatum) avec la même méthode radioimmunocytochimique (Marcel *et al.*, 1990), il apparaît que le pourcentage de grains réels partagés est légèrement inférieur dans notre étude (82% contre 90% dans le neostriatum) bien que l'enrichissement soit beaucoup plus important du fait d'un pourcentage en grains hypothétiques partagés nettement plus faible (32% contre 75% dans le neostriatum). Cette observation est peut être due au fait que les structures observées dans l'EM sont essentiellement des TN qui sont plus grandes que les petits éléments dendritiques rencontrés dans le neostriatum.

La localisation membranaire de l'E-24.11 est également en accord avec des études de fractionnement cellulaire menées chez le Rat (De la Beaume *et al.*, 1981) et avec des études immunocytochimiques en microscopie photonique menées dans le globus pallidus du Porc (Barnes *et al.*, 1988). Cependant, cette localisation membranaire est en désaccord avec les travaux de Back et Gorenstein (1989; 1990) qui, utilisant une approche histochimique, détectent l'E-24.11 à l'intérieur des neurones. Nous avons tenté de détecter l'E-24.11 à l'aide de cette technique histochimique, mais n'avons pas réussi à reproduire ces résultats. Deux hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la localisation membranaire de l'E-24.11: 1-la quantité d'enzyme intracellulaire serait trop faible pour permettre une détection immunocytochimique ou, plus probablement, 2-l'enzyme intracellulaire présenterait une conformation différente de l'E-24.11 insérée dans la membrane.

En théorie, la mise en évidence de l'E-24.11 par la technique immunocytochimique peroxydase anti-peroxydase (PAP) utilisée par Marcel *et al.* (1990) et par Barnes *et al.* (1992), aurait permis de mieux définir la

localisation de l'E-24.11. En pratique, l'utilisation de la technique au PAP pour détecter l'E-24.11 dans l'EM s'est avérée inadaptée. En effet, lors d'essais, nous avons obtenu une mauvaise conservation du tissu. C'est peut-être l'organisation particulière de l'EM qui la rend fragile et donc très sensible aux traitements histologiques avant inclusion. D'autre part, la détection de l'enzyme par radioimmunocytochimie s'avère beaucoup plus sensible et la distribution obtenue est tout à fait comparable à celle observée lors de l'utilisation de ligands radioactifs tels que le H³ HACBO-Gly ou le ³H thiorphan (inhibiteurs spécifiques de l'E-24.11) (Pert, 1978; Schwartz *et al.*, 1985; Waksman *et al.*, 1986a; 1986b). Avec le même anticorps, la technique au PAP ne permet de mettre en évidence l'E-24.11 que dans des régions du système nerveux central particulièrement riches en enzyme. Ce manque de sensibilité de la technique immunocytochimique classique par rapport à une détection radioimmunocytochimique est également rapportée pour les ENK (Mc Lean *et al.*, 1985).

Afin de résoudre les problèmes de conservation, nous avons aussi tenté de détecter l'E-24.11 directement sur coupes ultrafines après inclusion grâce à une technique à l'or colloïdal. Ceci a été testé sans succès sur coupes d'une résine hydrophobe (Araldite) mais aussi sur coupes de résines hydrophiles (Lowicryl et Low viscosity Resin White). Il ne paraît donc pas possible de mettre en évidence l'E-24.11 sur résines après inclusion à l'aide de l'anticorps mAb 85A2. Le site antigénique reconnu par cet anticorps est probablement modifié après inclusion.

Par contre, une technique immunocytochimique indirecte à l'or colloïdal nous a permis de détecter l'E-24.11 sur des coupes ultrafines à congélation, mais en raison d'une mauvaise conservation morphologique de l'EM, cette approche a été également abandonnée.

Etant donné que les paramètres physico-chimiques employés, en particulier la fixation du tissu utilisée, sont compatibles avec une détection immunocytochimique de neuropeptides et de neurotransmetteurs, une autre partie de notre étude a eu pour but de déterminer la nature chimique des structures immunoréactives pour l'E-24.11. Pour cela, nous avons réalisé des doubles marquages immunocytochimiques rendus possibles par la détection radioimmunocytochimique de l'E-24.11. Les autres antigènes détectés dans notre étude sont mis en évidence par une méthode immunoenzymatique indirecte; le marquage apparaît sous la forme d'un

précipité de DAB remplissant les structures exprimant l'antigène recherché. Tout au long de l'étude, qui comprend plusieurs séries de doubles marquages, le nombre de tortillons observés sur les radioautographies de microscopie électronique est similaire après 8 à 12 semaines d'exposition. L'absence de radiomarquage sur une structure donnée n'est donc pas due à une durée d'exposition insuffisante.

Lors de l'analyse des doubles marquages, une moins bonne conservation de l'ultrastructure est observée, probablement due à la révélation de l'activité peroxydasique par la DAB qui est une réaction fortement exothermique. Néanmoins, la révélation de l'activité peroxydasique à froid, sur table réfrigérante, permet de conserver une structure correcte (voir Méthodes).

Après avoir déterminé la grande probabilité d'une action locale des ENK dans l'EM, il semblait intéressant de savoir par quel type de récepteur, μ ou δ , les ENK pouvaient éventuellement agir. Par conséquent, à la suite des approches immunocytochimiques, nous avons essayé de déterminer, grâce à des ligands spécifiques, si les récepteurs μ et/ou δ étaient présents dans l'EM. Jusqu'à maintenant, les travaux effectués chez le Rat dans cette région, sur coupes congelées fraîches, n'ont guère été significatifs (Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987; Desjardins *et al.*, 1990). Nous avons donc abordé l'étude sur coupes semi-fines obtenues à partir de coupes au vibratome (Beauvillain *et al.*, 1992).

La détection des sites de liaison μ s'est faite à l'aide du FK-33824 iodé parce que de nombreux travaux ont montré qu'il était possible d'obtenir des résultats même après fixation (Hamel et Beaudet, 1984; Moyse *et al.*, 1986; Beauvillain *et al.*, 1992). La préfixation du tissu par le mélange fixateur selon Hamel et Beaudet (1984) pendant 10 min permet d'obtenir une conservation morphologique du tissu satisfaisante.

Des essais préliminaires sur coupes au cryostat n'ont pas permis de trouver un mode de fixation alliant une bonne détection des sites de liaison δ par la Deltorphin-I iodée et une bonne conservation morphologique du tissu nerveux. Les meilleures conditions de liaison ont toujours été obtenues sur tissu frais. Nous avons donc tenté la détection des sites de liaison δ par la Deltorphin-I iodée sur coupes au vibratome placées en survie. Nous avons montré que la liaison totale (évaluée en comptant le nombre de cpm de coupes au vibratome incubées avec le ligand iodé) était nettement supérieure à la liaison non spécifique (évaluée en comptant le nombre de

cpm de coupes au vibratome incubées avec le ligand iodé en présence du compétiteur froid). Il y a donc bien liaison de la Deltorphin-I dans les conditions de survie utilisées. Par conséquent, cette technique permet d'obtenir une excellente conservation du tissu et offre de bonnes conditions de liaison au ligand.

-Localisation neuronale et gliale de l'E-24.11

Dans le système nerveux central, la distribution de l'E-24.11 est très large et fortement hétérogène (Pollard *et al.*, 1989). Ceci a été signalé dans des études biochimiques mettant en évidence l'activité de la peptidase dans différentes régions (Malfroy *et al.*, 1978; Sullivan *et al.*, 1978; Malfroy *et al.*, 1979; Llorens-Cortes *et al.*, 1982). La grande hétérogénéité de distribution de l'E-24.11 permet d'envisager une expression sélective de l'enzyme par certaines populations neuronales (Pollard *et al.*, 1989). De plus, des études de fractionnement cellulaire ont montré que l'activité E-24.11 est très enrichie dans les fractions de membranes synaptiques contenant notamment des récepteurs opioïdes (Alstein et Vogel, 1980; De la Beaume *et al.*, 1981) et que l'administration locale d'acide kainique dans le striatum du Rat induit une baisse de l'activité de l'E-24.11 (Llorens-Cortes *et al.*, 1979). Ces travaux laissent supposer une localisation neuronale de l'E-24.11. Dans notre étude, la présence de tortillons sur de nombreuses appositions entre TN démontre clairement une localisation neuronale de l'E-24.11.

Des tortillons sont également partagés entre TN et tanocytes. Compte tenu des limites inhérentes à la technique radioautographique, il n'est pas possible de déterminer laquelle des 2 membranes d'une apposition marquée possède réellement l'enzyme. Par conséquent, l'E-24.11 pourrait également être insérée dans la membrane plasmique des tanocytes. Dans quelques cas, plusieurs grains d'argent sont détectés sur un même prolongement épendymaire ce qui nous permet d'envisager la présence effective de l'E-24.11 sur les tanocytes. De plus, le fait que l'enrichissement soit similaire pour tous les types d'appositions, et non pas inférieur lorsqu'un tanocyte est impliqué dans l'apposition, supporte également l'hypothèse d'une localisation tanocytaire de l'enzyme. Néanmoins, seule la détection des ARN messagers de l'E-24.11 par hybridation *in situ* peut démontrer de façon indéniable si les tanocytes synthétisent cette enzyme. A noter qu'une étude

de l'expression de l'ARN messenger codant l'E-24.11 a déjà été publiée, mais ne concerne pas l'EM (Wilcox *et al.*, 1989). Une localisation gliale de l'E-24.11 dans l'EM doit être considérée sérieusement car la présence de cette enzyme a été démontrée sur les astrocytes (Horsthemke *et al.*, 1983; Lentzen et Palenker, 1983; Lentzen *et al.*, 1983) et les épendymocytes (Gros *et al.*, 1985). De plus, d'autres ectoenzymes telles que l'angiotensine converting enzyme (ACE) ou l'acétylcholinestérase (AchE) sont présentes sur des éléments neuronaux mais aussi gliaux (Koshiya *et al.*, 1984; Pickel *et al.*, 1986; Henderson et Greenfield, 1984).

Si la présence de l'E-24.11 sur les tanocytes s'avère exacte, on peut envisager que les ENK ont une action sur ces structures dans le but de modifier leur forme et/ou de moduler leur fonction de transport de substances du liquide céphalorachidien vers les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. La présence de nombreux contacts dits synaptoides entre TN à ENK et prolongements épendymaires au sein de l'EM (Beauvillain *et al.*, 1984) est un argument supplémentaire en faveur de l'existence d'une telle action.

Les résultats de cette étude ultrastructurale démontrent donc que l'E-24.11 est essentiellement associée aux membranes plasmiques de TN de l'EM mais qu'une localisation tanocytaire est très probable. La présence de l'E-24.11 indique que des peptides dégradés par cette enzyme ont des actions locales dans la zone externe de l'EM. Ces peptides peuvent moduler les sécrétions neurohormonales dans les capillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire. Compte tenu de la spécificité de l'E-24.11 et des substrats potentiels présents dans cette région, les meilleurs candidats à l'hydrolyse par l'E-24.11 apparaissent être les ENK.

L'analyse quantitative du taux d'E-24.11 de l'EM dans certaines conditions physiologiques a permis de montrer des variations concomitantes du taux d'E-24.11 et du taux d'ENK. Ceci nous paraît être un argument supplémentaire montrant que dans l'EM, l'E-24.11 a pour rôle essentiel d'hydrolyser les ENK.

En conclusion, l'existence d'une action locale paraissant évidente, l'étape suivante du travail a donc été de déterminer quels pouvaient être les systèmes neuroendocriniens concernés. Ces actions locales seraient de type

paracrine et/ou autocrine car l'EM est totalement dépourvue de synapses. Afin de préciser quelles sont les fonctions neuroendocrines cibles d'une action locale dans cette région, des doubles marquages immunocytochimiques ont été réalisés. Ces doubles détections immunocytochimiques, analysées en microscopie électronique, permettent de savoir si les TN des différents systèmes neuroendocriniens possèdent l'E-24.11 insérée dans leur membrane plasmique et de déterminer ainsi quels sont les systèmes susceptibles d'être régulés dans l'EM. Les résultats obtenus sont discutés en fonction de la littérature suggérant l'existence d'une action des ENK dans l'EM.

-Les ENK et la fonction gonadotrope

D'après la littérature, les ENK pourraient agir sur la libération du GnRH par les TN de l'EM (Rotsztein *et al.*, 1978; Drouva *et al.*, 1981; Arita et Kimura, 1988). Selon ces travaux, les ENK agiraient directement sur les TN à GnRH, ou indirectement, par l'intermédiaire de la DA. Afin de déterminer si cette influence est directement exercée sur les TN à GnRH, ou indirectement via une action sur les boutons à DA, ou bien sur les 2 types de TN, 2 doubles marquages ont été analysés prioritairement dans le but de savoir si les TN à GnRH et à tyrosine hydroxylase (TH) présentaient l'E-24.11 insérée dans leur membrane plasmique.

L'observation de ces doubles détections sur coupes semi-fines étant impossible, l'étude a été menée à l'échelle ultrastructurale. A cette échelle, il nous a fallu rechercher les critères permettant de déterminer si le marquage radioautographique anti-E-24.11 appartenait bien aux TN mises en évidence par la méthode immunoenzymatique indirecte. La méthode employée et les critères retenus sont décrits dans la partie Matériel et Méthodes (D, 4).

L'application de ces critères est en faveur d'une localisation de l'E-24.11 sur les TN immunoréactives pour la TH. Inversement, les mêmes critères ne sont pas vérifiés pour les TN à GnRH.

Dans l'EM, les boutons terminaux immunoréactifs pour la TH correspondent pour la plupart aux neurones TIDA localisés dans la partie dorsale du noyau arqué (Meister *et al.*, 1989). L'antisérum utilisé visualise également quelques rares fibres adrénergiques et noradrénergiques provenant de la medulla oblongata (Meister *et al.*, 1989). Par conséquent, nos

résultats sont plutôt en faveur d'une action des ENK sur des TN à DA. Les ENK de l'EM n'auraient pas d'action directe sur les TN à GnRH.

L'existence d'une action des ENK sur les neurones TIDA est confortée par des observations faites *in vivo* montrant que les ENK modulent la libération de DA par les neurones TIDA de rates (Gudelski et Porter, 1979) et par le fait que l'administration périphérique d'ENK induit la libération de PRL (Bruni *et al.*, 1977; Ferland *et al.*, 1977). De plus, une étude menée sur des fragments d'EM *in vitro* (Arita et Kimura, 1988), suggère que les ENK agissent directement sur les TN à DA en inhibant la synthèse de DA.

Cependant, d'autres observations chez le rat mâle suggèrent que les opioïdes et notamment les ENK agissent directement sur les TN à GnRH (Drouva *et al.*, 1981; Rotsztein *et al.*, 1978; 1982). Nos résultats ne sont pas en faveur de l'existence d'une telle modulation, mais supportent davantage l'hypothèse d'une action indirecte des ENK sur la sécrétion du GnRH.

D'après Rotsztein *et al.* 1982, il existe des récepteurs opioïdes sur les TN à GnRH de l'EM. Les sites de liaison opioïdes ont été mis en évidence à l'aide de naloxone tritiée, qui marque les différents types de récepteurs opioïdes. Il peut donc s'agir de récepteurs médiant l'action de la β -END ou de la DYN. Ce travail n'est donc pas forcément contradictoire avec nos conclusions.

Compte tenu des travaux soutenant l'existence d'une action des ENK sur les TN à DA et de la présence d'E-24.11 sur ces TN, le contrôle de la sécrétion du GnRH par les ENK au sein de l'EM s'exerce donc probablement par l'intermédiaire des TN dopaminergiques.

Différentes études nous permettent d'envisager que dans l'EM, des peptides opioïdes peuvent agir sur la sécrétion du GnRH via une action sur les neurones dopaminergiques (Rasmussen, 1988). Généralement, les auteurs considèrent que cette action est exercée par les endorphines. Cependant, il faut savoir que contrairement aux ENK, les endorphines sont quasiment absentes des TN de la zone externe de l'EM (Bloch *et al.*, 1978; Jacobowitz *et al.*, 1978; Hisano *et al.*, 1982; Kiss *et al.*, 1985; Ibata *et al.*, 1985).

En fait, seules quelques structures contenant des endorphines sont visibles dans la région interne de l'EM (Ishikawa *et al.*, 1982). La majorité des corps cellulaires à POMC sont localisés dans le noyau arqué et projettent vers différentes régions hypothalamiques et extrahypothalamiques (Eskay, 1979; O'Donohue *et al.*, 1979; Pelletier, 1980; O'Donohue, 1982). Par conséquent,

une régulation locale de la sécrétion du GnRH par les endorphines au niveau de la zone externe de l'EM paraît très peu probable.

L'intervention de dérivés de la POMC originaires de la pars tuberalis ou de l'adénohypophyse ne peut cependant pas être exclue. Des variations du taux de β -END dans le sang porte hypophysaire au cours du cycle ont été rapportées (Sarkar et Yen, 1985). Plus exactement, la concentration de β -END diminue avant le pic de GnRH qui se produit dans l'après-midi du proestrus (Sarkar et Yen, 1985). On peut imaginer que la β -END libérée par l'adénohypophyse "remonte" afin de réguler certaines sécrétions hypothalamiques au niveau de l'EM.

Par contre, l'existence d'une influence des endorphines directement sur les corps cellulaires à GnRH et à DA est confortée par des travaux morphologiques. Des contacts entre des corps cellulaires à GnRH et des neurones contenant des dérivés de la POMC ont été observés dans l'aire préoptique du Rat (Leranth *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1989) et dans le noyau arqué du Singe (Thind et Goldsmith, 1988). De plus, des neurones à POMC se projettent sur des corps cellulaires à DA dans l'hypothalamus du Rat (Horwath *et al.*, 1992).

En faisant la synthèse de ces travaux et de nos résultats, nous pouvons supposer qu'il existe un double contrôle opioïde de la sécrétion du GnRH dans l'hypothalamus. 1-) un effet direct par la β -END au niveau des sites de synthèse (péricaryons) 2-) un effet indirect des ENK au niveau de la zone de libération (éminence médiane).

Le travail de Weesner et Malven réalisé en 1990 chez le Mouton soutient cette hypothèse. En effet, ces auteurs ont montré que des injections locales d'un anti-met-ENK dans l'hypothalamus médiobasal, en particulier dans la région de l'EM, stimulent nettement la libération de LH alors que des injections d'anti- β -END dans la même région n'influencent pas la sécrétion des hormones gonadotropes. Inversement, des injections d'un anti- β -END dans l'aire préoptique altèrent la concentration sérique de LH alors que l'administration d'un anti-met-ENK est sans effet.

Ces résultats semblent donc écarter l'action de la β -END au niveau de la zone de libération du GnRH alors qu'au contraire, l'action des ENK semble primordiale. Cependant, un rôle éventuel de dérivés issus du troisième précurseur de peptides opioïdes, la prodynorphine, est tout à fait envisageable car des TN à dynorphines existent dans la zone palissadique de

l'EM. Des TN à dynorphines ont d'ailleurs été observées en microscopie photonique dans les mêmes régions que les boutons à GnRH (Meister *et al.*, 1989; Ciofi *et al.*, 1991) et la fréquence des appositions entre TN à GnRH et TN à dynorphines vues en microscopie électronique est en faveur d'une interaction entre ces 2 types de TN (Ciofi *et al.*, 1991).

-Les ENK et la fonction somatotrope

En règle générale, les peptides opioïdes ont une action stimulatrice sur la sécrétion de GH (Kokka *et al.*, 1972; Ferland *et al.*, 1977; Dupont *et al.*, 1977; Rivier *et al.*, 1977). La plupart des auteurs attribuent cette action opioïde centrale à la β -END (Dupont *et al.*, 1977; Rivier *et al.*, 1977).

Les études s'intéressant au contrôle de la sécrétion de l'hormone de croissance au niveau de l'EM sont très peu nombreuses. Seuls, Drouva *et al.* en 1981 et Rotsztein *et al.* en 1982 ont suggéré que les opioïdes pouvaient agir directement sur les TN à SOM de l'EM par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes. Ces résultats permettent d'envisager l'existence d'un contrôle opioïde de la libération de la GH au sein de l'EM. Il s'agirait d'une régulation opioïde inhibitrice appliquée sur les TN à SOM.

Deux doubles détections immunocytochimiques réalisées et analysées en microscopie électronique (E-24.11/GRF et E-24.11/SOM), nous permettent de discuter du rôle éventuel des ENK dans le contrôle de la sécrétion de l'hormone de croissance. L'analyse des doubles marquages réalisés n'est pas favorable à l'existence d'une action directe des ENK sur les TN à GRF et à SOM de l'EM.

En 1978, Negro-Vilar *et al.*, ont montré que la DA était capable de stimuler la libération de SOM à partir d'EM *in vitro*. Nous pouvons donc envisager qu'une inhibition opiacée exercée sur les TN dopaminergiques de l'EM peut entraîner une baisse de la sécrétion de SOM, donc une augmentation de la libération de GH. Par conséquent, une intervention des ENK dans le contrôle de la libération de la GH au niveau de l'EM est possible.

L'existence d'une action des ENK s'exerçant sur les corps cellulaires à SOM et à GRF ne peut pas être exclue. De même, l'intervention de peptides opioïdes dérivés de la prodynorphine et/ou de la POMC au niveau des péricaryons est possible.

Dans l'EM, la régulation opioïde directe suggérée par Drouva *et al.* en 1981 et Rotsztein *et al.* en 1982, serait donc exercée par des dérivés de la POMC ou de la prodynorphine. L'intervention de la β -END est souvent proposée (Dupont *et al.*, 1977; Rivier *et al.*, 1977). Cependant, là encore, en raison de l'absence presque totale de β -END dans la zone externe de l'EM (Bloch *et al.*, 1978; Jacobowitz *et al.*, 1978; Hisano *et al.*, 1982; Kiss *et al.*, 1985; Iyata *et al.*, 1985), une action locale de la β -END est peu probable. L'existence d'une action de peptides dérivés de la prodynorphine, bien que non documentée, est concevable.

-Les ENK et la fonction corticotrope

La morphine et les ENK sont capables d'induire une activité de l'axe corticotrope en agissant au niveau de l'hypothalamus (Buckingham, 1982). Des opioïdes endogènes, notamment les ENK, seraient impliqués dans le contrôle physiologique de la sécrétion du CRF (Buckingham, 1982). Le site d'action exact n'est pas connu, mais une action directe des ENK sur les TN à CRF de l'EM est à priori possible. C'est cette hypothèse que nous avons testée en réalisant le double marquage E-24.11/CRF.

L'analyse de cette double détection selon nos critères d'attribution du marquage radioautographique montre que la majorité (63%) des TN immunoréactives pour le CRF ne possède pas l'E-24.11 insérée dans leur membrane plasmique. Ce pourcentage élevé de TN à CRF n'exprimant pas l'enzyme laisse supposer que les TN à CRF de l'EM ne sont pas l'objet d'une action enképhalinergique. Cependant, dans certains cas, nous avons pu attribuer le marquage anti-E-24.11 à des TN immunoréactives pour le CRF (voir Résultats, B2c).

L'E-24.11 serait donc présente sur certaines TN à CRF dont la proportion exacte ne peut pas être déterminée. Une sous-population de TN à CRF susceptible d'être cible d'une action enképhalinergique semble exister. L'observation d'une sous-population de TN à CRF dans l'EM est nullement surprenante. En effet, dans le NPV, certaines cellules à CRF peuvent contenir de la vasopressine, de la neurotensine, des ENK (Tramu *et al.*, 1983; Piekut et Joseph, 1986; Ceccatelli *et al.*, 1989).

Dans l'hypothalamus du Rat, des corps cellulaires à CRF du NPV sont innervés par des neurones à POMC (Liposits *et al.*, 1988). Des dérivés de la

POMC réguleraient ces neurones à CRF au niveau des sites de synthèse. A notre connaissance, il n'a jamais été montré de contacts entre TN enképhalinerigiques et corps cellulaires à CRF.

L'analyse des doubles détections réalisées en microscopie électronique permet de préciser et de discuter du rôle éventuel des ENK dans la zone externe de l'EM. Les résultats obtenus constituent des arguments morphologiques en faveur de différentes notions. 1-) les ENK de l'EM agiraient sur les TN dopaminergiques mais pas sur les TN à GnRH. L'action des ENK sur la sécrétion du GnRH se ferait donc par l'intermédiaire des TN à DA. 2-) les ENK n'auraient pas d'action directe sur les TN à GRF et à SOM. 3-) certaines TN à CRF seraient la cible d'une action enképhalinerigique.

A la vue de nos résultats un problème semble se poser. Selon nos observations, le marquage obtenu avec l'anti-E-24.11 est essentiellement observé sur les TN à DA.

En fait, cela représente 61% des grains (voir résultats, B2a). Or, il apparaît peu vraisemblable, à la vue de nos comptages, que les 39% restant correspondent au marquage observé sur les TN à CRF. Par conséquent, il faut considérer que nous n'avons pas su localiser une partie de l'E-24.11.

Nous pouvons bien sûr penser qu'un pourcentage significatif de grains d'argent est situé sur des membranes de TN à TRH, puisque nous n'avons pas pu aborder ce double marquage. Cependant, on ne doit pas écarter la possibilité que notre méthodologie et notre analyse ne soient pas suffisamment fines pour déceler de très faibles quantités de TN possédant l'enzyme.

Il se peut aussi que la pénétration de l'anti-E-24.11 soit supérieure à celle de l'anti-TH (ou de l'anticorps secondaire servant à le révéler: fragments Fab couplés à la peroxydase). Dans ce cas, on peut imaginer que certaines TN de nature non précisée sont en fait des TN dopaminergiques.

Un autre point important concernant les TN dopaminergiques doit être abordé. En effet, un peu moins de 60% des TN immunoréactives pour la TH sont marquées par un ou plusieurs tortillons d'argent alors que dans la littérature, il n'est jamais fait mention de sous populations de TN

dopaminergiques. Le fait de ne pas détecter d'E-24.11 sur toutes les TN à DA peut résulter d'un problème d'incidence de plan de coupe. Il en résulterait une sous estimation du nombre de TN à DA possédant l'E-24.11.

-Paracrinie et/ou autocrinie

A ce niveau de l'étude, une question s'impose: Quel est le type de régulation exercé par les ENK dans l'EM? S'agit-il d'une action paracrine ou autocrine?

Il peut exister 2 populations de TN enképhalinerigiques dans l'EM externe. Une population originaire du noyau arqué, qui correspond à des neurones dopaminergiques (Meister *et al.*, 1989; Merchenthaler, 1993) et une population originaire du NPV correspondant à des neurones à CRF (Merchenthaler *et al.*, 1986).

Paradoxalement, nos résultats de microscopie électronique nous permettent d'envisager l'existence d'actions locales des ENK sur les TN à dopamine et corticolibérine. Si les ENK agissent sur la TN qui vient de les libérer, l'action est dite autocrine. Si elles agissent sur une TN voisine, l'action est dite paracrine.

D'après Merchenthaler (1992), chez le rat mâle, la plupart des TN à ENK sont originaires de la partie parvicellulaire du NPV et correspondent en fait aux neurones à CRF. La présence d'ENK dans des corps cellulaires à CRF avait été démontrée quelques années auparavant (Hökfelt *et al.*, 1983; Ceccatelli *et al.*, 1989; Pretel et Piekut, 1990) ainsi que la colocalisation du CRF et des ENK dans certaines TN de l'EM (Hisano *et al.*, 1986).

Ces données, conjuguées aux résultats que nous avons obtenus permettent d'envisager l'existence d'une action paracrine entre les TN à CRF/ENK et les boutons à DA. Autrement dit, les ENK contenues dans les TN à CRF de l'EM inhiberaient la libération de la DA dans cette région.

Environ 20% des neurones à CRF contiennent des ENK (Ceccatelli *et al.*, 1989). Il existe donc une sous-population de neurones à CRF exprimant les ENK. Cette notion de sous-population de neurones à CRF apparaît également dans notre étude, l'E-24.11 n'étant exprimée que par une partie des TN immunoréactives pour le CRF. Nous émettons alors l'hypothèse que la présence d'E-24.11 sur certaines TN à CRF trahit en fait l'existence d'un feed-back négatif des ENK sur les TN à CRF contenant et libérant les

ENK dans la zone externe de l'EM. Ce rétro-contrôle est une action de nature autocrine.

Les actions locales des ENK dans l'EM que nous venons d'évoquer sont reprises dans le schéma 1.

Cependant il existe aussi des arguments en faveur d'une expression des ENK dans les cellules dopaminergiques (Meister *et al.*, 1989) mais, chez le mâle et la femelle normale, cette expression est difficile à mettre en évidence. Par contre chez la femelle lactante, il ne fait aucun doute qu'il existe une forte expression d'ENK dans le système TIDA (White et Mc Kelvy., 1986; Fitzsimmons et Hoffman, 1989; Ottinger *et al.*, 1992; Merchenthaler, 1992; Merchenthaler, 1993; Ciofi *et al.*, 1993). Ces éléments ne nous permettent donc pas d'écarter l'existence d'une action autocrine exercée par les ENK du système TIDA, chez le mâle et la femelle normale. En fait, il est possible que les 2 phénomènes de régulation (paracrine et/ou autocrine) existent dans l'EM pour les ENK.

-Corrélation E-24.11 / ENK

Après la mise en évidence d'une augmentation de l'expression des ENK dans le système TIDA pendant la lactation, (White et Mc Kelvy, 1986; Fitzsimmons et Hoffman, 1989; Ottinger *et al.*, 1992; Merchenthaler, 1992; Merchenthaler, 1993; Ciofi *et al.*, 1993), il semblait intéressant de déterminer si l'expression de l'E-24.11 variait avec celle des ENK.

La détection de l'E-24.11 par radioimmunocytochimie semi-quantitative a permis de comparer la distribution de cette enzyme dans l'EM de rates allaitantes (nursing females) au jour 10 postpartum (pp 10) et de rates séparées de leur portée à pp 8 (no pups 48 H). Parallèlement, les ENK et les neurokinines (NK) ont été aussi détectées.

Cette étude est la première montrant une variation concomitante de l'immunoréactivité pour l'E-24.11 et de l'immunoréactivité pour l'un des peptides que cette enzyme est capable de cliver.

Nos résultats montrent une réaction anti-ENK très intense dans la zone externe de l'EM des femelles allaitantes alors que le retrait des petits provoque une chute considérable de l'immunoréactivité anti-ENK. L'analyse quantitative du marquage radioautographique (anti-E-24.11) observé dans la zone palissadique montre que le retrait des petits est suivi

d'une réduction de moitié du signal. D'autre part, les NK sont indétectables dans la zone externe de l'EM, qu'il s'agisse de rates lactantes ou de rates séparées de leur portée. On peut donc penser que dans l'EM, pendant la lactation, l'E-24.11 est essentiellement impliquée dans l'inactivation biologique des ENK.

Ce travail montre que dans l'EM, l'E-24.11 a pour rôle essentiel d'hydrolyser les ENK et constitue un argument supplémentaire permettant de considérer la présence d'E-24.11 dans cette région comme un bon indicateur d'une action des ENK. L'augmentation simultanée des taux d'ENK et d'E-24.11 dans la zone externe de l'EM suggère que les systèmes cibles d'une action enképhalinergique répondent à une quantité accrue d'ENK par une augmentation de la quantité d'enzyme. Cette augmentation de la concentration en E-24.11 permet une dégradation plus importante des ENK.

Ce travail ne permet pas de préciser la localisation exacte de l'E-24.11 dans l'EM de la femelle lactante. Cependant, les résultats obtenus chez le mâle en microscopie électronique permettent de penser que l'enzyme est vraisemblablement localisée sur les TN à DA et à CRF et peut être aussi sur les tanocytes. Le taux particulièrement élevé d'ENK présent dans les neurones TIDA pendant la lactation suggère néanmoins que c'est surtout l'expression de l'E-24.11 de ce même système qui varie pendant cet état physiologique. L'abondance de TN à DA et à ENK dans les parties latérales de l'EM (Meister *et al.*, 1989) et la distribution également latérale de l'E-24.11 que nous observons pendant la lactation sont des arguments morphologiques en faveur de cette hypothèse.

Les taux d'E-24.11 et d'ENK de l'EM chutent après le retrait de petits, lorsque la concentration de PRL circulante est retombée au niveau basal (Neill, 1988; Ben-Jonathan *et al.*, 1989). Ceci suggère une implication possible de l'E-24.11 et des ENK dans la régulation de la sécrétion de PRL induite par la tétée et/ou dans la modification de l'activité neurosécrétoire de l'hypothalamus pendant la lactation.

D'après la littérature, pendant la lactation, la libération de DA (le principal PIF) dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire est nettement réduite

(Moore, 1987). De plus, la sécrétion des hormones hypophysaires gonadotropes est totalement supprimée (Smith et Reinhart, 1993).

En conséquence, on peut envisager que pendant la lactation, l'augmentation des ENK a pour but d'inhiber la libération de la DA, ce qui favorise la sécrétion de PRL et diminue la sécrétion du GnRH.

Il est légitime de penser que ce sont les ENK contenues dans le système TIDA (ENK dont l'expression varie), qui exercent une action locale pendant la lactation. On peut très bien imaginer que les ENK libérées par les TN dopaminergiques agissent directement sur ces mêmes TN à DA afin d'inhiber la sécrétion. Dans ce cas, l'action locale envisagée est de type autocrine. Cette action autocrine contribuerait au maintien d'une concentration élevée de PRL circulante et d'une concentration basse de GnRH (schéma 1). Sur les documents présentés, la réaction anti-E-24.11 est très intense dans les parties latérales de l'EM (voir Fig. 17b). Or, les régions latérales de l'EM sont des sites de projection privilégiés des neurones gonadolibérinergiques (Silverman, 1988). Les TN dopaminergiques et enképhalinergiques sont également abondantes dans ces régions. Toutes ces observations morphologiques sont donc compatibles avec l'hypothèse d'une action locale des ENK sur la libération du GnRH via une action sur les terminaisons dopaminergiques de l'EM.

L'intérêt d'une action autocrine est double. D'une part, on peut supposer que l'action locale est encore plus rapide, ne nécessitant pas de diffusion intersticielle des ENK. D'autre part, on peut imaginer que la libération des ENK dans l'espace extracellulaire est directement liée à la sécrétion de la DA. Pour tester cette seconde hypothèse, il serait intéressant de savoir si les ENK observées dans le système TIDA pendant la lactation sont colocalisées avec la DA dans les mêmes granules de neurosécrétion. En effet, de cette façon, la libération des ENK (donc leur action inhibitrice) dépendrait directement de la libération de la DA. Malheureusement, il est actuellement difficile, pour des raisons techniques, de réaliser un double marquage DA/ENK en microscopie électronique.

La lactation est un état physiologique particulier pendant lequel le taux d'ENK présent dans la zone externe de l'EM est particulièrement élevé. Le taux d'ENK chute après le retrait des petits. Par conséquent, les petits semblent constituer un stimulus qui induit ou tout au moins entretient

une expression intense des ENK dans les neurones du système TIDA. La chute de l'immunoréactivité pour les ENK observée lors du retrait des petits aurait pour conséquence la levée de l'inhibition enképhalinergique des TN à DA et contribuerait au retour à une concentration basale de PRL circulante.

Notre étude, chez la rate lactante, doit être mise en parallèle avec d'autres travaux qui montrent que la période de lactation est accompagnée de modifications de l'activité de l'hypothalamus (Lightman, 1992). Ces changements dans l'activité se traduisent par des modifications structurelles (Tweedle et Hatton, 1987; Théodosis et Poulain, 1987; 1989; Hatton et Yang, 1990) et par des variations considérables dans l'expression des messagers chimiques présents dans les systèmes neuroendocriniens (Théodosis et Poulain, 1987; Gozes *et al.*, 1989; Pelletier et Tong, 1992; Ceccatelli et Erikson, 1993; Mahata *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1993; Smith, 1993; Wang *et al.*, 1993). Le meilleur exemple est l'apparition d'ENK, de neurotensine et de neuropeptide Y dans les neurones TIDA chez la Souris (Ciofi *et al.*, 1993).

L'expérimentation menée chez la femelle lactante nous a donc permis de préciser différents points. 1-La variation concomitante du taux d'enzyme et du taux d'ENK montre qu'il existe une relation fonctionnelle entre l'E-24.11 et les ENK dans l'EM. 2-les ENK ont une action locale dans l'EM pendant la lactation. 3-les ENK pourraient être impliquées dans la régulation de la sécrétion de la DA au niveau de la zone externe de l'EM, participant ainsi à l'inhibition de la sécrétion du GnRH et à l'augmentation de la sécrétion de PRL que l'on observe pendant la lactation.

-Les récepteurs aux ENK

Le fait que les ENK aient un rôle local au sein de la zone externe de l'EM implique l'existence de récepteurs opioïdes dans cette structure. Pour des raisons méthodologiques, la détection, en microscopie électronique, des récepteurs au moyen de ligands spécifiques ne peut pas être couplée à la caractérisation immunocytochimique de TN. Cependant, il était important de savoir sur quel(s) type(s) de récepteurs pouvaient agir les ENK de l'EM. Les ENK se lient préférentiellement aux récepteurs opioïdes de type δ et μ

(Simon, 1991). Nous avons donc recherché, à l'aide de ligands hautement spécifiques, si ces 2 types de récepteurs étaient présents dans la zone externe de l'EM du Rat.

Dans un premier temps, nous avons envisagé l'existence éventuelle de sites de liaison δ dont les ligands endogènes majeurs sont les ENK. La nouvelle approche, qui consiste à incuber des coupes au vibratome maintenues en survie avec la D-Ala² Deltorphin-I, n'a pas permis de mettre en évidence de sites de liaison δ dans la zone externe de l'EM.

L'absence de marquage ne semble pas due à un problème d'ordre méthodologique. En effet, dans la partie Matériel et Méthodes, nous avons montré que l'approche sur coupes en survie offrait de bonnes conditions de liaison au ligand.

La distribution générale dans le SNC des récepteurs δ a beaucoup été étudiée par des techniques de liaison et, dans l'hypothalamus, ces travaux ont montré une densité de sites de liaison faible (Goodman *et al.*, 1980; Wolozin *et al.*, 1982; Lynch *et al.*, 1985; Mansour *et al.*, 1986; Mc Lean *et al.*, 1986; Tempel et Zukin, 1987) ou modérée (Duka *et al.*, 1981). Dans une étude beaucoup plus précise, centrée sur l'hypothalamus, Desjardins *et al.* (1990) ont cependant constaté l'existence de sites de liaison δ dans des régions de l'hypothalamus impliquées dans des fonctions neuroendocrines et notamment dans le noyau arqué. Malheureusement, ces auteurs n'ont pas mentionnés l'EM dans leurs résultats.

Le récepteur δ a été cloné en 1992 (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992) et peu d'études par hybridation *in situ* sont à ce jour disponibles (Mansour *et al.*, 1993; Lemoine *et al.*, 1994). Cependant, d'après Mansour *et al.* (1993), le noyau ventromédian est la seule région de l'hypothalamus qui exprime l'ARNm du récepteur δ . Ces premiers résultats d'hybridation *in situ*, qui ne détectent pas d'ARNm dans des neurones se projetant dans l'EM, sont plutôt en faveur d'une absence de récepteurs δ dans la zone externe de l'EM. Néanmoins, il ne faut pas tirer de conclusions hâtives, car ce travail est une étude préliminaire.

Le fait de ne pas détecter de sites de liaison δ dans l'EM ne permet pas d'affirmer qu'il n'existe pas de récepteurs de ce type dans cette région. En effet, par définition, les techniques de liaison ne mettent en évidence que les structures capables de lier les ligands utilisés. On peut très bien imaginer que des récepteurs δ sont présents dans la zone palissadique de l'EM mais sous

une forme qui n'interagit pas avec la Deltorphin-I dans nos conditions d'expérimentation. On peut également penser que l'expression des récepteurs varie selon l'état physiologique de l'animal. Il se peut que le récepteur δ ne soit pas ou peu exprimé chez le rat mâle normal mais soit exprimé dans d'autres conditions physiologiques.

Dans un second temps, nous avons recherché la présence éventuelle de sites de liaison μ qui fixent plusieurs ligands endogènes dont la β -END et les ENK. Notre étude sur coupes semi-fines a permis de mettre en évidence une densité relativement importante de sites de liaison μ dans la zone externe de l'EM.

Le travail de Desjardins *et al.* (1990) montre que le récepteur μ est abondant dans l'hypothalamus du Rat et notamment dans de nombreuses régions neuroendocrines de l'hypothalamus (NPV, aire préoptique, noyau arqué, ...). Notre étude apporte donc un complément d'information important: la présence de sites de liaison μ dans la zone externe de l'EM du Rat. La présence de récepteurs opioïdes dans l'EM est un argument morphologique supplémentaire en faveur d'une action locale des peptides opioïdes dans cette région et est compatible avec le fait que ces peptides puissent être des ENK.

Le clonage du récepteur μ en 1993 (Chen *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1993) a rendu possible les premières études par hybridation *in situ* (Delfs *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994). Bien que ces études ne soient pas focalisées sur l'hypothalamus, elles apportent quelques précisions quant à la présence de l'ARNm du récepteur μ dans cette région. Ainsi, il a été montré que certaines régions hypophysiotropes de l'hypothalamus expriment l'ARNm du récepteur μ (aire préoptique, noyau arqué). Ces régions sont peut être à l'origine des récepteurs μ que nous détectons.

La densité de sites de liaison que nous observons dans la zone externe de l'EM est modérée, comparée à celle observée dans le neostriatum (Hamel et Beaudet, 1984; 1987). Les actions locales des ENK dans l'EM (contrôle de la libération du GnRH par l'EM chez le rat mâle et participation au contrôle de la sécrétion de PRL pendant la lactation), pourraient être médiées par ces récepteurs de type μ .

Il existe une importante population de TN à DYN dans l'EM (Meister *et al.*, 1989). Cependant, une action de dérivés de la proDYN sur les récepteurs de

type μ est peu probable compte tenu de la faible affinité des récepteurs μ pour ces dérivés. Il est plus vraisemblable d'envisager une action de dérivés de la proDYN médiée par des récepteurs de type κ quoique la présence effective de sites de liaison κ dans la zone externe de l'EM n'ait pas été établie. Par contre, il a été démontré par hybridation *in situ* que l'ARNm de ce récepteur est abondant dans de nombreuses régions hypophysiotropes de l'hypothalamus (Minami *et al.*, 1993; Mansour *et al.*, 1994b).

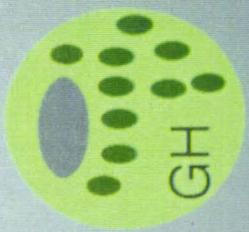
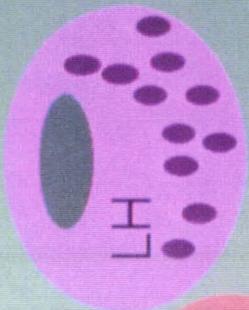
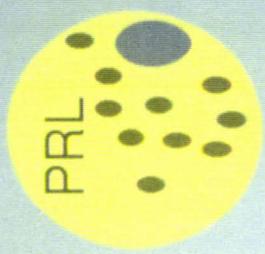
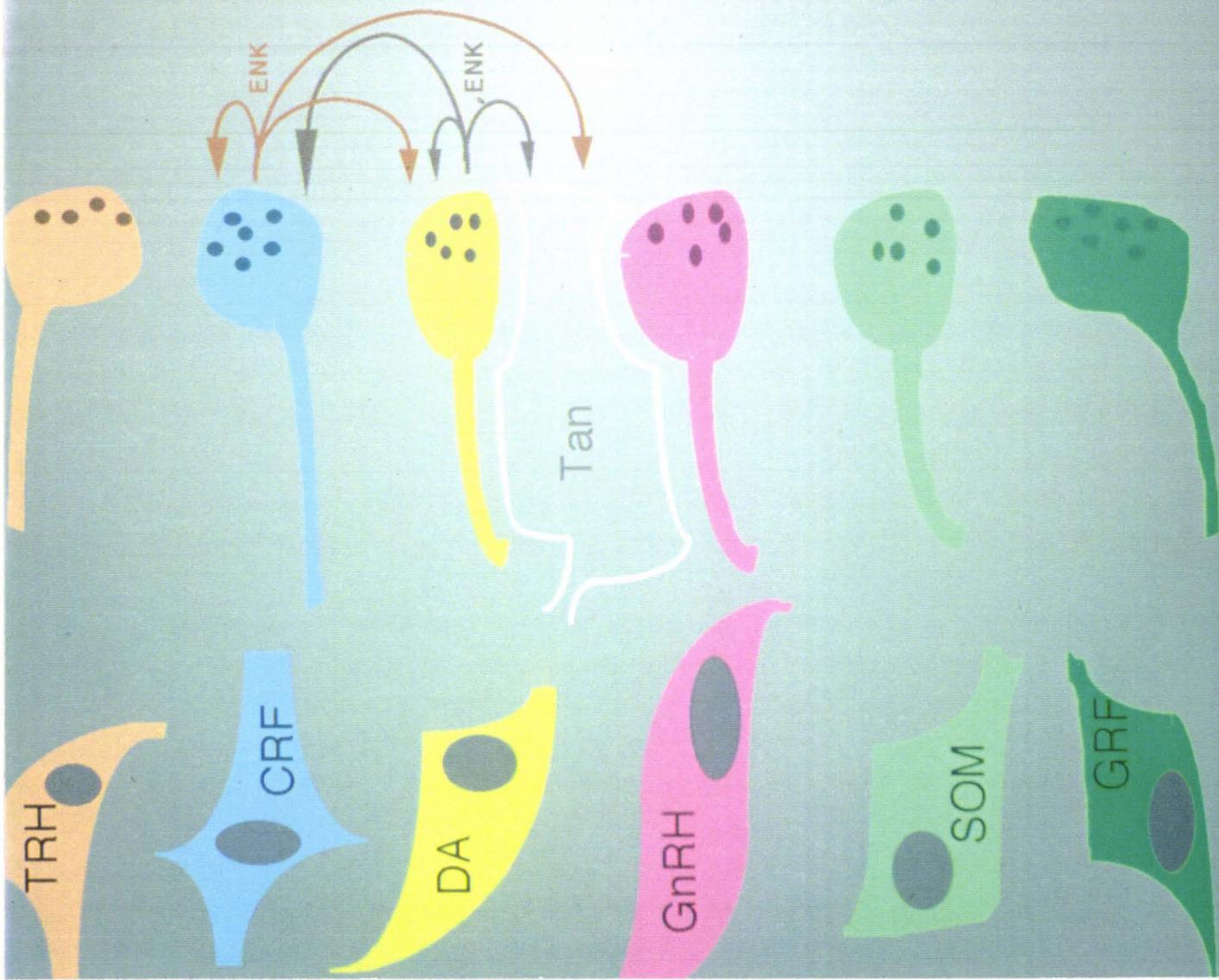
L'EM étant dépourvue de synapses, les récepteurs μ détectés sont des récepteurs non-synaptiques. Notons, que dans le neostriatum également, la majorité des récepteurs de type μ ont été détectés hors synapses (Hamel et Beaudet, 1984; 1987). La zone externe de l'EM possède donc des récepteurs opioïdes mais à l'échelle photonique, il est impossible de préciser la nature des compartiments cellulaires marqués. Seule une étude ultrastructurale, comme celle qui a été réalisée chez le Cobaye (Beauvillain *et al.*, 1992), permettrait de connaître la distribution des sites de liaison μ dans cette région.

Tout au long de notre étude, la mise en évidence de l'E-24.11 nous a permis d'explorer et discuter le rôle des ENK dans la zone externe de l'EM. Nos observations morphologiques sont significatives, mais ne remplacent pas la localisation ultrastructurale des récepteurs opioïdes. Leur détection en microscopie électronique au moyen de ligands spécifiques marqués est particulièrement délicate et pose de nombreux problèmes méthodologiques. Il est impossible d'affirmer que la distribution de l'E-24.11 dans l'EM recouvre ou présente un parallélisme avec la distribution des récepteurs opioïdes, car aucun travail ultrastructural traitant de la localisation des récepteurs opioïdes dans l'EM du Rat n'est actuellement disponible. Néanmoins, notons que la distribution de l'E-24.11 présente des similitudes avec celle des récepteurs μ dans l'EM du Cobaye (Beauvillain *et al.*, 1992). Chez le Cobaye, les sites de liaison μ sont également détectés à l'aide du FK-33824 iodé. Tout comme l'E-24.11 chez le Rat, les sites de liaison μ sont localisés sur certaines TN et sur les tanocytes.

Grâce à des techniques de liaison, une densité relativement importante de sites de liaison μ a été mise en évidence dans l'EM externe. Inversement, nous n'avons pas détecté de sites de liaison δ . Ce travail apporte donc un argument morphologique supplémentaire en faveur d'une action locale des

ENK dans l'EM, cette action locale se faisant au moins en partie par l'intermédiaire des récepteurs μ .

Schéma 1. Actions locales des enképhalines dans la zone externe de l'éminence médiane du Rat.



CONCLUSION

CONCLUSION

L'analyse ultrastructurale de la distribution de l'E-24.11 dans la zone externe de l'éminence médiane du Rat montre que cette enzyme est associée essentiellement aux membranes plasmiques des terminaisons nerveuses, mais aussi à celles des tanocytes.

La présence de l'E-24.11 indique que des peptides dégradés par cette enzyme ont des actions locales dans la zone externe de l'éminence médiane. Compte tenu de la spécificité de l'E-24.11 et des substrats potentiels dans cette région, **les meilleurs candidats à l'hydrolyse par l'E-24.11 paraissent être les enképhalines.** Ceci suggère donc que les enképhalines présentes dans l'éminence médiane modulent les sécrétions hormonales hypophysaires dans les capillaires du plexus porte hypothalamo-hypophysaire.

Après avoir apporté des arguments morphologiques en faveur de l'existence d'une action locale des enképhalines dans la zone externe de l'éminence médiane, l'étape suivante a consisté à déterminer quels pouvaient être les systèmes neuroendocriniens concernés. Des doubles marquages immunocytochimiques en microscopie électronique ont permis de montrer que l'E-24.11 était insérée dans la membrane plasmique de la majorité des terminaisons nerveuses dopaminergiques et de certains boutons terminaux à CRF. Par contre, les terminaisons nerveuses à GnRH, à SOM et à GRF ne semblent pas posséder l'enzyme.

Ces résultats suggèrent:

1-) que les enképhalines de l'éminence médiane peuvent agir sur les terminaisons dopaminergiques mais pas sur les terminaisons à GnRH.

2-) que les enképhalines n'ont pas d'action directe sur les boutons à SOM et à GRF.

3-) que certaines terminaisons nerveuses à CRF sont la cible d'une action enképhalinergique.

Compte tenu de ces résultats, on peut penser que l'action des enképhalines sur la sécrétion du GnRH se fait par l'intermédiaire des terminaisons nerveuses à dopamine. De même, une action indirecte des enképhalines, via la dopamine, sur les boutons terminaux à SOM est possible.

Nos observations ont permis de constater qu'il existait une variation concomitante des enképhalines et de l'E-24.11 dans l'éminence médiane pendant la lactation: le taux d'E-24.11 augmente parallèlement à l'augmentation des enképhalines.

Ces résultats impliquent:

1-) qu'il existe une relation fonctionnelle entre l'E-24.11 et les enképhalines dans l'éminence médiane. A noter que cette observation constitue un argument supplémentaire montrant que dans cette région, l'E-24.11 a pour rôle essentiel d'hydrolyser les enképhalines.

2-) que les ENK ont une action locale au sein de l'EM pendant la lactation.

Pendant la lactation, les enképhalines pourraient être impliquées dans la régulation de la sécrétion de dopamine au niveau de la zone externe de l'éminence médiane. Il en résulterait une augmentation de la libération de PRL.

A la suite de ce travail, il est apparu intéressant de savoir sur quels types de récepteurs pouvaient agir les ENK. Grâce à l'utilisation de ligands spécifiques, une densité importante de sites de liaison μ a été mise en évidence. Par contre aucun site de liaison δ n'a été détecté. Par conséquent, **l'action locale des enképhalines dans la zone externe de l'éminence médiane se ferait, au moins en partie, par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes de type μ .**

Lorsque nous avons commencé cette étude, il y a 4 ans, la détection de l'E-24.11 était une excellente alternative à la mise en évidence des récepteurs opioïdes afin d'explorer le rôle des enképhalines dans l'éminence médiane du Rat. Cette approche nous a permis effectivement de montrer que les enképhalines avaient une action locale dans cette région et de préciser quelles fonctions neuroendocrines étaient vraisemblablement régulées ou modulées par les enképhalines.

Si l'on désirait poursuivre l'étude avec cette approche, il serait particulièrement intéressant de détecter les ARNm de l'E-24.11 dans l'hypothalamus du rat mâle mais aussi de la femelle lactante. Ceci permettrait de déterminer définitivement la nature des systèmes

neuroendocriniens exprimant l'enzyme et de préciser si les tanocytes sont capables ou non de synthétiser l'E-24.11.

Le clonage récent des principaux types de récepteurs opioïdes ouvre de nouvelles perspectives. Par hybridation *in situ* et surtout par l'utilisation d'anticorps anti-récepteurs, il sera vraisemblablement possible d'apporter des précisions à nos observations. Cependant, il faut noter qu'actuellement, cette dernière approche reste très problématique et peu de résultats sont probants.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Adachi T, Hisano S and Daikoku S. (1985). Intragranular colocalization of immunoreactive methionine-enkephalin and oxytocin within the nerve terminals in the posterior pituitary. **J. Histochem. Cytochem.** 33 : 891-899.

Almenoff J and Orłowski M. (1984). Biochemical and immunological properties of a membrane-bound brain metalloendopeptidase: Comparison with thermolysin-like kidney neutral metalloendopeptidase. **J. Neurochem.** 42: 151-157.

Almenoff J, Wilk S and Orłowski M. (1981). Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: Apparent identity to enkephalinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 102: 206-214.

Alstein M, Bachar E, Vogel Z and Blumberg S. (1983). Protection of enkephalins from enzymatic degradation utilizing selective metal-chelating inhibitors. **Eur. J. Pharmac.** 91: 353-361.

Altstein M and Vogel Z. (1980). On the inactivation of enkephalin by enkephalinase. In: **Neurotransmitters and their receptors.** (ed. Littauer V, Z.), pp 497-507. John Wiley, New-York.

Arita J and Kimura F. (1988). Enkephalin inhibits dopamine synthesis in vitro in the median eminence portion of rat hypothalamic slices. **Endocrinology.** 123: 694-699.

Arvidsson U, Riedl M, Lee JH, Nakano AH, Doda R, Chakrabarti S, Loh HH, Law PY, Yu L, Wessendorf MW and Elde R. (1994). Cellular localization of a μ -opioid receptor (MOR) in rat brain and spinal cord. **Society for Neuroscience Abstract.** 24 th annual meeting. Miami Beach, Florida. 611.3.

Atweh SF and Kuhar MJ. (1977). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. III. The telencephalon. **Brain Res.** 134 : 393-405.

Back SA and Gorenstein C. (1989). Histochemical visualization of neutral endopeptidase-24. 11 (enkephalinase) activity in rat brain : cellular localization and codistribution with enkephalins in the Globus Pallidus. **J. Neurosci.** 9 (12) : 4439-4455.

Back SA and Gorenstein C. (1990). Fluorescent histochemical localization of neutral endopeptidase-24. 11 (enkephalinase) in rat brainstem. **J. Comp. Neurol.** 296: 130-158.

Barnes K, Matsas R, Hooper NM, Turner AJ and Kenny AJ. (1988a). Endopeptidase -24. 11 is trisomally ordered in pig brain and, in contrast to

aminopeptidase N and peptidyl dipeptidase A ("angiotensin converting enzyme"), is a marker for a set of striatal efferent fibers. **Neuroscience**. 27: 799-817.

Barnes K, Turner AJ and Kenny AJ. (1988b). Electron microscopic immunocytochemistry of pig brain shows that endopeptidase-24.11 is localized in neuronal membranes. **Neurosci. Lett**. 94: 64-69.

Barnes K, Turner AJ and Kenny AJ. (1992). Membrane localization of endopeptidase-24. 11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry. **J. Neurochem**. 58: 2088-2096.

Barnes K, Turner AJ and Kenny AJ. (1993). An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows colocalization of endopeptidase-24.11 with substance P. **Neuroscience**. 53: 1073-1082.

Barraclough CA and Sawyer CH. (1975). Inhibition of the release of pituitary ovulatory hormone in the rat by morphine. **Endocrinology**. 123: 694-699.

Barraclough CA and Wise PM. (1982). The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. **Endocr. Rev**. 3: 91-119.

Barry J et Dubois MP. (1973). Etude en immunofluorescence des structures hypothalamiques à compétence gonadotrope. **Annls. Endocrinol**. 34: 735-742.

Barry J and Dubois MP. (1974). Immunofluorescence study of the preoptico-infundibular LRF neurosecretory pathway of the guinea pig during the oestrus cycle. **Neuroendocrinology**. 15: 200-208.

Barry J and Dubois MP. (1975). Immunofluorescence study of LRF-producing neurons in the cat and the dog. **Neuroendocrinology**. 18: 290-298.

Barry J, Dubois MP and Poulain P. (1973). LRF producing cells of the mammalian hypothalamus. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat**. 146: 351-366.

Barry J et Léonardelli J. (1968). Etude comparée des neurones et des fibres monoaminergiques de la région tubéro-infundibulaire chez le cobaye mâle normal et castré. **C. R. Acad. Sci.(Paris)**. 266: 15.

Beauvillain JC, Moyses E, Dutriez I, Mitchell V, Poulain P and Mazzuca M. (1992). Localization of μ opioid receptors on the membranes of nerve endings and tanycytes in the guinea-pig median eminence by electron microscopic radioautography. **Neuroscience**. 49: 925-936.

Beauvillain JC, Tramu G and Croix D. (1980). Electron microscopic localization of enkephalin in the median eminence and the adenohypophysis of the guinea-pig. **Neuroscience**. 5: 1705-1716.

Beauvillain JC, Tramu G and Garaud JC. (1984). Coexistence of substances related to enkephalin and somatostatin in granules of the guinea-pig median eminence: demonstration by use of colloidal gold immunocytochemical methods. **Brain Res**. 301: 389-393.

Ben-Jonathan N. (1985). Dopamine : a PRL-inhibiting hormone. **Endocr. Rev.** 6 : 564-589.

Ben-Jonathan N, Arbogast LA and Hyde JF. (1989). Neuroendocrine regulation of prolactin release, **Progress Neurobiol.** 33: 399-447.

Blackett NM and Parry DM. (1977). A simplified method of "hypothetical grain" analysis of electron microscope autoradiographs. **J. Histochem. Neurochem.** 25: 206-214.

Bloch B, Bugnon C, Fellman D and Lenys D. (1978). Immunocytochemical evidence that the same neurons in the human infundibular nucleus are stained with anti-endorphins and antisera of other related peptides. **Neurosci. Lett.** 10: 147-152.

Bourgoin S, Le Bars D, Artaud F, Clot AM, Bouboutou R, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Hamon M and Cesselin F. (1986). Effects of ketorphan and other peptidase inhibitors on the *in vitro* and *in vivo* release of the methionine enkephalin-like material from the rat spinal cord. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 238: 360-366.

Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR, Birdsall NJM and Hulme EC. (1976). C fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. **Nature**. 260: 793.

Bruni JF, Van Vugt D, Marshall S and Meites J. (1977). Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. **Life sci.** 21: 461-466.

Buckingham JC. (1982). Secretion of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor in response to morphine and opioid peptides. **Neuroendocrinology**. 35: 111-116.

Buckingham JC and Cooper TA. (1986). Pharmacological characterization of opioid receptors influencing the secretion of corticotrophin releasing factor in the rat. **Neuroendocrinology**. 44: 36-40.

Carette B. (1981). Effects of iontophoretic application of enkephalins and naloxone on tuberoinfundibular and adjacent neurons in the guinea-pig. **Neuroendocrinology**. 1: 283-291.

Carette B and Poulain P. (1978). Inhibitory action of iontophoretically applied methionine-enkephalin and leucine-enkephalin on tuberal hypothalamic neurons. **Neurosci. Lett.** 7: 137-140.

Ceccatelli S and Eriksson M. (1993). The effect of lactation on nitric oxide synthase gene expression. **Brain Res.** 625: 177-179.

Ceccatelli S, Eriksson M and Hökfelt T. (1989). Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. **Neuroendocrinology**. 49: 309-323.

Chang KJ and Cuatrecasas P. (1979). Multiple opiate receptors enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. **J. Biol. Chem.** 254 : 2610-2618.

Checler F, Emson PC, Vincent JP and Kitabgi P. (1984). Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 21.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline -endopeptidase. **J. Neurochem.** 43 : 1295-1301.

Checler F, Vincent JP and Kitabgi P. (1983). Degradation of neurotensin by rat brain synaptic membranes : involvement of a thermolysin-like metalloendopeptidase (enkephalinase), angiotensin-converting enzyme, and other unidentified peptidases. **J. Neurochem.** 41 : 375-384.

Checler F, Vincent JP and Kitabgi P. (1985). Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg8-Arg9 peptide bond by a metalloendopeptidase. **J. Neurochem.** 45 : 1509-1513.

Chen WP, Witkin JW and Silverman AJ. (1989). β -endorphin and gonadotropin releasing hormone synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurosecretory cells in the male rat. **J. Comp. Neurol.** 286 : 85-95.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Herley JA and Yu L. (1993). Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. **Mol. Pharmacol.** 44 : 8-12.

Chipkin RE, Latranyi MB and Iorio LC. (1982). Potentiation of stress-induced analgesia (SIA) by thiorphan and its block by naloxone. **Life Sci.** 31: 1189-1192.

Cicero TJ, Badger TM, Willcox CE, Bell RD and Meyer ER. (1977). Morphine decreases luteinizing hormone by an action on the hypothalamic-pituitary axis. *J. Pharmac. exp. Ther.* 203: 548-555.

Ciofi P. (1987). La cholécystokinine dans le système nerveux central: immunohistochimie, colocalisation avec divers neuropeptides dans l'hypothalamus de quelques mammifères dont l'homme. **Thèse.**

Ciofi P, Croix D, Beauvillain JC, Tramu G, Mazzuca M. (1991). Sexually dimorphic expression of dynorphins and neurokinins in the rat median eminence. 21th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 10-15 November 1991, New Orleans, Louis. *Soc. Neurosci. Abs.* 17: 713.

Ciofi P, Crowley WR, Pillez A, Schmued LL, Tramu G and Mazzuca M. (1993). Plasticity in expression of immunoreactivity for neuropeptide Y, enkephalins and neurotensin in the hypothalamic tubero-infundibular dopaminergic system during lactation in mice. *J. Neuroendocrinol.* 5: 599-602.

Clough RW, Hoffman GE and Sladek CD. (1990). Synergistic interaction between opioid receptor blockage and alpha-adrenergic stimulation on luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion in vitro. *Neuroendocrinology.* 51: 131-138.

Cocchi D, Santogostino A, Gil-Ad I, Ferri S, M and Iler EE. (1977). Leu-enkephalin stimulated growth hormone and prolactin release in the rat : comparison with the effect of morphine. *Life Sci.* 20: 2041-2046.

Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L and Herbert E. (1982). Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature.* 295: 663.

Coquerel A, Dubuc I, Kitabgi P and Costentin J. (1988). Potentiation by thiorphan and bestatin of the naloxone-insensitive analgesic effects of neurotensin and neuromedian N. *Neurochem. Int.* 12 : 361-366.

Coquerel A, Dubuc I, Menard JF, Kitabgi P and Costentin J. (1986). Naloxone-insensitive potentiation of neurotensin hypothermic effect by the enkephalinase inhibitor thiorphan. *Brain Res.* 398 : 386-389.

Costentin J, Vlaiculescu A, Chaillet P, Ben Nathan L, Aveaux D and Schwartz JC. (1986). Dissociated effects of inhibitors of enkephalin metabolizing peptidases or naloxone on various nociceptive responses. *Eur. J. Pharmac.* 123: 37-44.

Cox BM. (1982). Endogenous opioid peptides : a guide to structures and terminology. *Life Sci.* 31 : 1645-1658.

Cox BM, Goldstein A and Li CH. (1976). Opioid activity of a peptide, β -lipotropin-(60-91), derived from β -lipotropin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 73: 1821.

Cusan L, Dupont A, Kledzik GS, Labrie F, Coy DH and Schally AV. (1977). Potent prolactin and growth hormone releasing activity of more analogues of met-enkephalin. **Nature.** 268: 544-547.

De la Baume S, Patey G and Schwartz JC. (1981). Subcellular distribution of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (enkephalinase) in rat brain. **Neuroscience.** 6 : 315-321.

Delfs JM, Kong H, Miestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T and Chesselet MF. (1994). Expression of μ -opioid receptor mRNA in rat brain : An in situ hybridization study at the single cell level. **J. Comp. Neurol.** 345 : 46-58.

Desjardins GC, Brauer JR and Beaudet A. (1990). Distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the hypothalamus of the rat. **Brain Res.** 536: 114-123.

Deyo SN, Swift RM and Miller RJ. (1979). Morphine and endorphins modulate dopamine turnover in rat median eminence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 : 3006-3009.

Drouva SV, Epelbaum J, Tapia-Arancibia L, Laplante E and Kordon C. (1981). Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology.** 32: 163-167.

Duka TH, Schubert P, Wuster M, Stoiber R and Herz A. (1981). A selective distribution pattern of different opiate receptors in certain areas of rat brain as revealed by in vitro autoradiography. **Neurosci. Lett.** 21 : 119-124.

Dupin S, Tafani JAM, Mazarguil H and Zajac JM. (1991). ^{125}I D-Ala² Deltorphin-I: a high affinity, delta-selective opioid receptor ligand. **Peptides.** 12: 825-830.

Dupont A, Cusan L, Caron M, Labrie F and Li CH. (1977). β -endorphin : stimulation of growth hormone release in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74: 358-359.

Dupont A, Cusan L, Ferland L, Lemay A and Labrie F. (1979). Evidence for a role of endorphin in the control of prolactin secretion, In: **Central nervous system effects of hypothalamic Hormones and Other peptides.** Collu R, Barbeau A, Ducharme JR, Rochefort J, editors. pp 283-300.

Enjalbert A, Ruberg M, Arancibia S, Priam M and Kordon C. (1979). Endogenous opiates block dopamine inhibition of PRL secretion *in vitro*. **Nature**. 280 : 595-597.

Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K and Edwards RH. (1992). Cloning of a δ opioid receptor by functional expression. **Science**. 258 : 1952-1955.

Eskay RL, Brownstein MJ and Long RT. (1979). α -melanocyte-stimulating hormone: reduction in adult rat brain after MSG treatment of neonates. **Science**. 205: 827-829.

Fallon JH and Ciofi P. (1990). Dynorphin-containing neurons. In : **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. Björklund A, Hökfelt T & MJ Kuhar (eds), Elsevier, Amsterdam. 9: 1-130.

Ferland L, Fuxe K, Eneroth P, Gustafsson J and Skett P. (1977). Effects of methionine-enkephalin on prolactin release and catecholamine levels and turnover in the median eminence. **Eur. J. Pharmacol.** 43: 89-90.

Ferland L, Kledzik GS, Cusan L and Labrie F. (1978). Evidence for a role of endorphins in stress-and suckling-induced prolactin release in the rat. **Mol. Cell. Endocrinol.** 12: 267.

Ferland L, Labrie F, Arimura A and Schally AV. (1977). Stimulated release of hypothalamic growth hormone releasing activity by morphine and pentobarbital. **Mol. Cell. Endocrinol.** 6: 247-252.

Ferland L, Labrie F, Coy DH, Arimura A and Schally AV. (1976). **Mol. Cell. Endocrinology.** 4: 79-88.

Fischli W, Goldstein A, Hunkapiller M, Hood L. (1982). Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 79: 5435.

Fitzsimmons MD and Hoffman GE. (1989). Changes in hypothalamic Met-enkephalin immunoreactivity in the lactating rat. **Soc. Neurosci. Abs.** 15: 702.

Fitzsimmons MD, Olschowka JA, Wiegand SJ and Hoffman GE. (1992). Interaction of opioid peptide-containing terminals with dopaminergic perikarya in the rat hypothalamus. **Brain res.** 581: 10-18.

Floras P, Bidabé AM, Caille JM, Simmonet G, Lecomte JM and Sabathié M. (1983). Double-blind study of effects of enkephalinase inhibitor on adverse reactions to myelography. **Am. J. Neuroradiol.** 4: 653-655.

Fowler CJ and Fraser GL. (1994). μ -, δ -, κ -opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. **Neurochem.** 24 : 401-426.

Fulcher IS, Matsas R, Turner AJ and Kenny AJ. (1982). Kidney neutral endopeptidase and the hydrolysis of enkephalin by synaptic membranes show similar sensitivity to inhibitors. **Biochem. J.** 203: 519-522.

Gafford JT, Skidgel RA, Erdos EG and Hersh LB. (1983). Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. **Biochemistry.** 22: 3265-3271.

Gambacciani M, Yen SSC and Rasmussen DD. (1986a). GnRH release from the mediobasal hypothalamus : in vitro regulation by oxytocin. **Neuroendocrinology.** 42: 181.

Gambacciani M, Yen SSC and Rasmussen DD. (1986b). GnRH release from the mediobasal hypothalamus : in vitro inhibition by corticotropin-releasing factor. **Neuroendocrinology.** 43: 533.

George R. (1971). Hypothalamus : anterior pituitary gland. In: **Narcotic Drugs : Biochemical pharmacology.** Clouet DH, editor, pp 233-296.

George R and Way EL. (1959). The role of the hypothalamus in pituitary-adrenal activation by morphine. **J. Pharmac. exp. Ther.** 125: 111-115.

Gibson A, Ginsburg M, Hall M and Hart SL. (1979). The effect of intracerebroventricular administration of methionine-enkephalin on the stress-induced secretion of corticosterone in mice. **Br. J. Pharmacol.** 66 : 164-166.

Gilbert PE and Martin WR. (1976). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 198: 66-82.

Giros B, Gros C, Solhonne B and Schwartz JC. (1986). Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (met⁵) enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies. **Molec. Pharmac.** 29: 281-287.

Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M and Hood L. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76: 6666-6670.

Goodman RR, Snyder SH, Kuhar MJ and Young III WS. (1980). Differentiation of δ and μ opiate receptor localization by light microscopic autoradiography. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 77 : 6239-6243.

Gorenstein C and Snyder SH. (1980). Enkephalinases. **Proc. Roy. Soc. London Ser. B.** 210: 123-132.

Gosnell BA, Grace M and Levine AS. (1987). Effects of beta-chlornaltrexamine on food intake, body weight and opioid-induced feeding. **Life Sci.** 40 : 1459-1467.

Gozes I, Avidor R, Biegon A and Baldino F. (1989). Lactation elevates vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid in rat suprachiasmatic nucleus. **Endocrinology.** 124: 181-186.

Graham RC and Karnovsky MJ. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. **J. Histochem. Cytochem.** 14: 291-302.

Grandison L and Guidotti A. (1977). Regulation of prolactin release by endogenous opiates. **Nature.** 270: 357-359.

Greenberg R and O'Keefe EH. (1982). Thiorphan potentiation of stress-induced analgesia in the mouse. **Life Sci.** 31: 1185-1188.

Gros C, Giros B, Llorens-Cortes C, Malfroy B, Pollard H, Pachot I, Schwartz JC and Mazie JC. (1985). "Enkephalinase" and "aminopeptidase M", as enkephalin-inactivating peptidases and their inhibition. **Tran. Biochem Soc.** 13: 1185-1188.

Gubler U, Seeburg P, Hoffman BJ, Gage LP and Underfriend S. (1982). Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin containing peptides. **Nature.** (Lond.). 295 : 206-208.

Gudelsky GA. (1981). Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. **Psychoneuroendocrinology.** 6: 3-16.

Gudelsky GA and Porter JC. (1979). Morphine and opioid peptide-induced inhibition of the release of dopamine from tuberoinfundibular neurons. **Life Sci.** 25: 1697-1702.

Hamel E and Beaudet A. (1984). Localization of opioid binding sites in rat brain by electron microscopic radioautography. **J. Electron. Microsc. Tech.** 1: 317-329.

Hamel E and Beaudet A. (1987). Opioid receptors in rat neostriatum: radioautographic distribution at the electron microscopic level. **Brain Res.** 401: 239-257.

Haskins JT, Gudelsky GA, Moss RL and Porter JC. (1981). Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus : effects on dopamine concentrations in hypophysial portal plasma and serum prolactin concentrations. **Endocrinology.** 108: 767-771.

Hatton GI and Yang QZ. (1990). Activation of excitatory amino acid inputs to supraoptic neurons. Induced increases in dye-coupling in lactating, but not virgin or male rats. **Brain Res.** 513: 264-269.

Henderson Z, Greenfield ZA. (1984). Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in substantia nigra: a comparison between rat and guinea pig. **J. Comp. Neurol.** 230: 278-286.

Herkenham M and Pert CB. (1980). *In vitro* autoradiography of opiate receptors suggests loci of "opiate" pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77 : 5532-5536.

Herkenham M and Pert CB. (1982). Light microscopic localization of brain opiate receptors : a general radioautoradiographic method which preserves tissue quality. **J. Neurosci.** 2 : 1129-1149.

Hersch LB. (1982). Degradation of enkephalins: the search for an enkephalinase. **Molec. Cell. Biochem.** 47: 35-43.

Hisano S, Daikoku S, Yanaihara N and Shibasaki T. (1986). Intragranular colocalization of CRF and met-enk-8 in nerve terminals in the rat median eminence. **Brain Res.** 370 : 321-326.

Hisano S, Kawano H, Nishiyama T and Daikoku S. (1982). Immunoreactive ACTH/ β -endorphin neurons in the tubero-infundibular hypothalamus of rats. **Cell Tissue Res.** 224: 303-314.

Hökfelt T, Elde R, Fuxe K, Johansson O, Ljungdahl A, Goldstein M, Luft M, Efendic S, Nilsson G, Terenius L, Ganten D, Jeffcoate SL, Renfeld J, Said S, Perez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran L and Palacios R. (1978). Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. In: **The hypothalamus.** Reichlin S, Baldessarini RJ, Martin JB, Eds. Raven Press, New York. pp 69-136.

Hökfelt T, Fahrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V, Werner S, Hulting AL, Terenius L and Chang KJ. (1983). The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron : Possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin and growth hormone secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80 : 895-898.

Holaday JW and Loh HH. (1979). Endorphin-opiate interactions with neuroendocrines system. In: **Advances in biochemical psychopharmacology.** 20 : 227-258.

- Horikawa S, Takai T Toyosato M, Takahashi H and Noda M. (1983). Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. **Nature**. 306 : 611-614.
- Horsthemke B, Hamprecht B and Bauer K. (1983). Heterogenous distribution of enkephalin-degrading peptidases between neuronal and glial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 115: 423-429.
- Horwath TL, Naftolin F and Leranth C. (1992). β -endorphin innervation of dopamine neurons in the Rat hypothalamus : a light and electron microscopic double immunostaining study. **Endocrinology**. 131: 1547-1555.
- Howells RD, Kilpatrick DL, Bhatt R, Monahan JJ, Poonian M and Udenfriend S. (1984). Molecular cloning and sequence determination of rat preproenkephalin cDNA : sensitive probe for studying transcriptional changes in rat tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 81 : 7651-7655.
- Hughes J, Smith TM, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA and Morris HR. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**. 258: 577-579.
- Ibata Y, Kawakami F, Okamura H, Obata-Tsuto L, Morimoto N and Zimmerman EA. (1985). Light and electron microscopic immunocytochemistry of β -endorphin/ β -LPH-like immunoreactive neurons in the arcuate nucleus and surrounding areas of the rat hypothalamus. **Brain Res**. 341: 233-242.
- Ieiri T, Chen HT, Campbell GA and Meites J. (1980). Effects of naloxone and morphine on the prooestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat. **Endocrinology**. 106: 1568-1570.
- Ishikawa K, Katakai K, Tanaka S, Haga S, Mochida H and Itoh K. (1982). Pro-opiomelanocortin-containing neurons in rat median eminence. **Neuroendocrinology**. 56: 178-184.
- Iversen LL, Iversen SD, Bloom F, Douglas C, Brown M and Vale W. (1978). Calcium dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain *in vitro*. **Nature**. (London) 273, 161-163.
- Jacob J. (1979). Fonctions endocriniennes et neuroendocriniennes des morphines endogènes. **J. Physio. Paris**. 75: 447-461.
- Jacobowitz DM, O'Donohue TL. (1978). Alpha-melanocyte-stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 75: 6300-6304.

Jomary C, Gairin JE, Cros J and Meunier JC. (1988). Autoradiographic localization of supraspinal κ -opioid receptors with [125I-Tyr1-D-Pro10]dynorphin A-(1-11). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 627-631.

Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S and Numa S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature.* 298 : 245-249.

Kalra SP, Kalra PS. (1983). Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr. Rev.* 4: 311-351.

Kalra SP, Kalra PS, Sahu A, Allen LG and Crowley WR. (1987). The steroid-neuropeptide connection in the control of LHRH secretion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 219 : 65-83.

Kamberi IA, Mical RS and Porter JC. (1970). Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indolamines on LH release. *Endocrinology.* 87: 1.

Kayser V and Guilbaud G. (1983). The analgesic effects of morphine, but not those of the enkephalinase inhibitor thiorphan, are enhanced in arthritic rats. *Brain Res.* 267: 131-138.

Kerr MA and Kenny AJ. (1974a). The molecular weight and properties of a neutral metalloendopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* 137: 489-495.

Kerr MA and Kenny AJ. (1974b). The purification and specificities of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. J.* 137: 477-488.

Khachaturian H, Lewis ME, Tsou K and Watson SJ. (1985). β -endorphin, α -MSH, ACTH, and related peptides. In: **Handbook of chemical Neuroanatomy.** GABA and neuropeptides in the CNS. Björklund A, Hökfelt T (eds) Part I, Elsevier, Amsterdam. 4 : 273-334.

Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C and Hirth CG. (1992). The δ -opioid receptor : isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 12048-12052.

Kinoshita F, Nakai UY, Katakami H and Imura H. (1982). Suppressive effect of dynorphin (1-13) on luteinizing hormone release in conscious castrated rats. *Life Sci.* 30: 1915-1919.

Kiss JZ, Mezey E, Cassell MD, Williams TH, Mueller GP, O'Donohus TL and Palkovits M. (1985). Topographical distribution of proopiomelanocortin-

derived peptides (ACTH/ β -END/ α -MSH) in the rat median eminence. **Brain Res.** 329: 169-176.

Kitabgi P, Dubuc I, Nouel D, Costentin J, Cuber JC, Fulcrand H, Doulut S, Rodriguez M and Martinez J. (1992). Effects of thiorphan, bestatin and a novel metallopeptidase inhibitor JMV 390-1 on the recovery of neurotensin N released from mouse hypothalamus. **Neurosci. Lett.** 142: 200-204.

Koenig JI, Mayfield MA, Mc Cann SM and Krulich L. (1984). Differential role of the opioid μ and δ receptors in the activation of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) secretion by morphine in the male rat. **Life Sci.** 34 : 1829-1837.

Kokka N, Garcia JF, George R and Elliott HW. (1972). Growth hormone and ACTH secretion: evidence for an inverse relationship in rats. **Endocrinology.** 90: 735-743.

Kordon, C and Glowinski J. (1969). Selective inhibition of superovulation by blockage of dopamine synthesis during the "critical period" in the immature rat. **Endocrinology.** 85: 924.

Koshiya K, Kato T, Tanaka R and Kato T. (1984). Brain Peptidases: their possible neuronal and glial localization. **Brain Res.** 324: 261-270.

Kregel KC, Reynolds DG, Gurll NJ and Gisolfi CV. (1985). Effects of opiate receptor drugs injected intracerebrally into normovolemic and hypovolemic monkey. **Peptides.** 6 : 1161-1166.

Krieger DT. (1983). Brain peptides: what, where, and why? **Science.** 222: 975.

Krulich L, Koenig JI, Conway S, McCann SM and Mayfield MA. (1986). Opioid κ receptors and the secretion of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in the rat. **Neuroendocrinology.** 42 : 75-81.

Larra F and Droz B. (1970). Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. **J. Microsc.** 9: 845-880.

Leadem CA, Crowley WR, Simpkins JW, Kalra SP. (1985). Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid-primed rat. **Neuroendocrinology.** 40: 497-500.

Leadem CA and Kalra SP. (1985). Effects of endogenous opioid peptides and opiates on luteinizing hormone and prolactin secretion in ovariectomized rats. **Neuroendocrinology.** 41: 342-352.

Lecomte JM, Costentin J, Vlaiculescu A, Chaillet P, Marcais-Collado H, Llorens-Cortes C, Leboyer M and Schwartz JC. (1986). Pharmacological properties

of acetorphan, a parenterally active "enkephalinase" inhibitor. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 237: 937-944.

Lemoine C, Kieffer B, Gaveriaux-Ruff C, Befort K and Bloch B. (1994). Delta-opioid receptor gene expression in the mouse forebrain: localization in cholinergic neurons of the striatum. **Neuroscience.** 62: 635-640.

Lentzen H, Monden I, Linke J and Palenker J. (1983). No evidence for enkephalinase A on neuronal cells. **Life Sci.** 33: 105-108.

Lentzen H and Pelenker J. (1983). Localization of the thiorphan-sensitive endopeptidase, termed enkephalinase A on glial cells. **FEBS Lett.** 153: 93-97.

Leranth CS, MacLusky NJ, Shanabrough M and Naftolin F. (1988). Immunohistochemical evidence for synaptic connections between proopiomelanocortin-immunoreactive axons and LHRH neurons in the preoptic area of the rat. **Brain Res.** 449 : 167-176.

Lichteinsteiger W. (1969). Cyclic variations of catecholamines content in the hypothalamic nerve cells during the oestrous cycle of the rat, with a concomitant study of the substantia nigra. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 165: 204.

Lightman SL. (1992) Alterations in hypothalamic-pituitary responsiveness during lactation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 652: 340-346.

Liposits ZS, Stevers L and Paull WK. (1988). Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. **Histochemistry.** 1: 230-234.

Littlewood GM, Iversen LL and Turner AJ. (1988). Neuropeptides and their peptidases: functional considerations. **Neurochem. Int.** 12: 383-389.

Llorens-Cortes C, Gros C and Schwartz JC. (1985a). Study of endogenous TYR-Gly-Gly, a putative enkephalin metabolite in mouse brain: validation of radioimmunoassay, localization and effects of peptidase inhibitors. **Eur. J. Pharmac.** 119: 183-191.

Llorens-Cortes C, Malfroy B, Schwartz JC, Gacel G, Roques BP, Roy J, Morgat JL, Javoy-Agid F and Agid Y. (1982). Enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase (enkephalinase) activity : selective radioassay properties and regional distribution in human brain. **J. Neurochem.** 39 : 1081-1089.

Llorens-Cortes C, Pollard H and Schwartz JC. (1979). Localization of opiate receptors in substantia nigra evidenced by lesion studies. **Neurosci. Lett.** 12: 165-170.

Llorens-Cortes C, Schwartz JC and Gros C. (1985b). Detection of the tripeptide Tyr-Gly-Gly, a putative enkephalin metabolite in brain, using a sensitive radioimmunoassay. **Fedn. Eur. Biochem. Socs. Lett.** 189: 325-328.

Loose MD and Kelly MJ. (1989). Opioid inhibition of spontaneously active neurons of the rat arcuate nucleus *in vitro*. **Brain Res. Bull.** 22 : 819-823.

Loose MD and Kelly MJ; (1990). Opioid acts at μ receptors to hyperpolarize arcuate neurons via an inwardly rectifying potassium conductance. **Brain Res.** 513: 15-23.

Loose MD, Ronnekleiv OK and Kelly MJ. (1991). Neurons in the rat arcuate nucleus are hyperpolarized by GABA_B and μ -opioid receptor agonists : Evidence for convergence at a ligand-gated potassium conductance. **Neuroendocrinology.** 54 : 537-544.

Lotti VJ, Kokka N and George R. (1969). Pituitary-adrenal activation following intrahypothalamic microinjection of morphine. **Neuroendocrinology.** 4: 326-332.

Lynch DR and Snyder SH. (1986). Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways and receptors. **Ann. Rev. Biochem.** 55: 773-779.

Lynch WC, Watt J, Krall S and Paden CM. (1985). Autoradiographic localization of kappa opiate receptors in CNS taste and feeding areas. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 22 : 699-705.

MacLeod RM, Fontham EH and Lehmyer JE. (1970). Prolactin and growth hormone production as influenced by catecholamines and agents that affect brain catecholamines. **Neuroendocrinology.** 6: 283-294.

Mac Millan SJ and Clarke GI. (1983). Opioid peptides have differential actions on sub-populations of arcuate neurones. **Life Sci.** 33: 529-532.

Magoul R, Dubourg P, Benjelloun W and Tramu G. (1993a). Direct and indirect enkephalinergic synaptic inputs to the rat arcuate nucleus studied by combination of retrograde tracing and immunocytochemistry. **Neuroscience.** 55: 1055-1066.

Magoul R, Ontoniente B, Benjelloun W and Tramu G. (1993b). Tachykinergic afferents to the rat arcuate nucleus. A combined immunohistochemical and retrograde tracing study. **Peptides.** 14: 275-286.

Mahata SK, Mahata M, Hörtnagl H, Fischer-Colbrie R, Steiner HJ, Dietze O and Winkler H. (1993). Concomitant changes of messenger ribonucleic acid levels of secretogranin II, VGF, vasopressin and oxytocin in the paraventricular

nucleus of the rat after adrenalectomy and during lactation. *J. Neuroendocrinol.* 5: 323-330.

Mains RE, Eipper BA and Ling N. (1977). Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 3014.

Malfroy B and Schwartz JC. (1982). Properties of "enkephalinase" from rat kidney; Comparison of dipeptidylcarboxypeptidase and endopeptidase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106: 276-285.

Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP and Schwartz JC. (1978). High affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature.* 276 : 523-526.

Malfroy B, Swerts JP, Llorens-Cortes C and Schwartz JC. (1979). Regional distribution of a high-affinity enkephalin-degrading peptidase ("enkephalinase") and effects of lesions suggest localization in the vicinity of opiate receptors in brain. *Neurosci. Lett.* 11: 329-334.

Mansour A, Fox CA, Meng F, Akil H and Watson SJ. (1994a). κ_1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to κ receptor binding and prodynorphin mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.* 5: 124-144.

Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H and Watson SJ. (1994b). μ -opioid receptor mRNA expression in the rat CNS : comparison to μ -receptor binding. *Brain Res.* 643 : 245-265.

Mansour A, Khatchaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ. (1986). Pharmacological and anatomical evidence of selective μ , δ and κ opioid receptor binding in rat brain. *Brain Res.* 399 : 69-79.

Mansour A, Khatchaturian H, Lewis ME, Akil H and Watson SJ. (1987). Autoradiographic differentiation of μ , δ and κ opioid receptors in rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7 : 2445-2464.

Mansour A, Thompson RC, Akil H and Watson SJ. (1993). δ opioid receptors mRNA distribution in the brain : comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 6 : 351-362.

Manzanares J, Wagner EJ, Lookingland KJ and Moor KE. (1992). Effects of immunoneutralization of dynorphin 1-17 and dynorphin 1-8 on the activity of central dopaminergic neurons in the male rat. *Brain Res.* 587: 301-305.

Marcel D, Pollard H, Verroust P, Schwartz JC and Beaudet A. (1990). Electron microscopic localization of immunoreactive enkephalinase (E. C. 3. 4. 24. 11) in the neostriatum of the rat. *J. Neurosci.* 10: 2804-2817.

Marks DL, Smith MS, Clifton DK and Steiner RA. (1993). Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and galanin gene expression in GnRH neurons during lactation in the rat. **Endocrinology**. 133: 1450-1458.

Martin R and Voigt KH. (1981). Enkephalins co-exist with oxytocine and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. **Nature**. 289: 502-504.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE and Gilbert PE. (1976). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 197: 517-532.

Matsas R, Fulcher IS, Kenny AJ and Turner AJ. (1983). Substance P and leu-enkephalin are hydrolysed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 80: 3111-3115.

Matsas R, Rattray M, Kenny A and Turner AJ. (1985). The metabolism of neuropeptides: endopeptidases-24.11 in human synaptic membrane preparations hydrolyses substance P. **Biochem. J.** 228: 487-492.

Maubert E, Ciofi P, Tramu G, Mazzuca M and Dupouy JP. (1992). Early transient expression of somatostatin (SRIF) immunoreactivity in dorsal root ganglia during ontogenesis in the rat. **Brain Res.** 573 : 153-156.

Mauborgne A, Bourgoïn S, Benoliel JJ, Hirsch M, Berthier JL, Hamon M and Cesselin F. (1987). Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance P released from slices of rat substantia nigra. **J. Pharmacol. Ther.** 243 : 674-680.

Mc Conahey PJ and Dixon FJ. (1966). A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. **Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.** 29: 185-191.

Mc Kelvy JF and Blumberg S. (1986). Inactivation and metabolism of neuropeptides. **A Review Neuroscience**. 9: 415-434.

McLean S, Rothman RB and Herkenham M. (1986). Autoradiographic localization of μ and δ opiate receptors in the forebrain of the rat. **Brain Res.** 378 : 49-60.

Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Andén NE, Andén M and Theodorsson E. (1989). Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. **Exp. Brain Res.** 76: 343-368.

Meites J, Bruni JF, Van Vugt DA and Smith AF. (1979). Relation of endogenous opioid peptides and morphine to neuroendocrine functions. **Life Sci.** 24: 1325-1326.

Mendelsohn LG, Johnson BG, Scott WL and Frederickson RCA. (1985). Thiorphan and analogs: lack of correlation between potency to inhibit enkephalinase A *in vitro* and analgesic potency *in vivo*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 234: 386-390.

Merchenthaler I. (1992). Enkephalin in dopamine neurons of the arcuate nucleus in lactating rats. **Program of the 9th International Congress of Endocrinology, Nice, France.** p 554. (Abstract).

Merchenthaler I. (1992). Enkephalin-immunoreactive neurons in the parvicellular subdivisions of the paraventricular nucleus project to the external zone of the median eminence. **J. Comp. Neurol.** 326 : 112-120.

Merchenthaler I. (1993). Induction of enkephalin in tuberoinfundibular neurons during lactation. **Endocrinology.** 133 : 2645-2651.

Merchenthaler I, Maderdrut JL, Altschuler RA and Petrusz P. (1986). Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system of the rat. **Neuroscience.** 17 : 325-348.

Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P, Wilkinson S, Lowe L, Beddell C and Fotlenfant R. (1978). Distribution and pharmacology of the enkephalins and related opiate peptides. In: **Centrally Acting Peptides.** Hughes J, Editor, pp 195-214.

Minami M, Hosoi Y, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Katsumata S, Yabuuchi K, Onogi T, Satoh M. (1993). *In situ* hybridization study of κ -opioid receptor mRNA in the rat brain. **Neurosci. Lett.** 162 : 161-164.

Mitchell V, Beauvillain JC, Poulain P and Mazzuca M. (1988). Catecholamine innervation of enkephalinergic neurons in guinea pig hypothalamus : demonstration by an *in vitro* autoradiographic technique combined with a post-embedding immunogold method. **J. Histochem. Cytochem.** 36 : 533-542.

Moore KE. (1987). Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. **Biol. Reprod.** 36: 47-58.

Morel G and Pelletier G. (1986). Endorphinic neurons are contacting the Tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the rat brain. **Peptides.** 7 : 1197-1199.

Morris BJ and Hertz A. (1986). Autoradiographic localization in rat brain of κ opiate binding sites labelled by [3h]bremazocine. **Neuroscience.** 19 : 839-846.

Moyse E, Pasquini F, Quirion R and Beaudet A. (1986). 125 I-FK 33824; a selective probe for radioautographic labeling of μ opioid receptor in the brain. **Peptides**. 7: 351-355.

Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN and Numa S. (1979). Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. **Nature**. 278: 423.

Negro-Vilar A. (1982). The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. **Peptides**. 3: 305.

Negro-Vilar A, Ojeda SR, Arimura A, and Mc Cann SM. (1978). Dopamine and norepinephrine stimulate somatostatin release by median eminence fragments *in vitro*. **Life Sci**. 23: 1493-1495.

Neill JD. (1988). Prolactin secretion and its control, In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil E, Neill JD, Ewings LL, Greenwald GS, Market CL and Pfaff DW (eds) Raven Press, New York. 1.1379-1390.

Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S and Numa S. (1982). Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. **Nature**. 295 : 202-206.

O'Donohue TL and Dorsa DM. (1982). The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems. **Peptides**. 3: 353-395.

O'Donohue TL, Miller RL and Jacobowitz PM. (1979). Identification, characterization and stereotaxic mapping of intraneuronal alpha-melanocyte-stimulating hormone-like immunoreactive peptides in discrete regions of the rat brain. **Brain Res**. 176: 101-123.

Orstead KM and Spies HG. (1987). Inhibition of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by endogenous opioid peptides in the female rabbit. **Neuroendocrinology**. 46: 13-23.

Ottinger, M.A., Margaretten, K.T., Rosewell, K.L. and Wise P.M., Increased proenkephalin mRNA in specific hypothalamic areas during lactation, **Soc. Neurosci. Abs**. 18 (1992) 896.

Palkovits M. (1982). Neuropeptides in the median eminence: their sources and destination. **Peptides**. 3: 299-303.

Panerai AE, Petraglia F, Sacerdote P and Genazzanni R. (1985). Mainly μ -opioid receptors are involved in luteinizing hormone and prolactin secretion. **Endocrinology**. 117 : 1096-1099.

Pang CN, Zimmerman E and Sawyer CH. (1977). Morphine inhibition of the preovulatory surges of plasma luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the rat. *Endocrinology*. 101: 1726-1732.

Paterson SJ, Robson LE and Kosterlitz HW. (1983). Classification of opioid receptors. *British Medical Bulletin*. 39: 31-36.

Patey G, De la Beaume S, Schwartz JC, Gros C, Roques BP, Fournié-Zaluski MC and Socora-Lucas E. (1981). Selective protection of methionine enkephalin released from brain slices by enkephalinase inhibition. *Science*. 212: 1153-1155.

Patey G and Rossier J. (1986). Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opioïdes endogènes. *Annales d'Endocrinologie*. 47: 71-87.

Pearson L, Brandeis L, Simon E, Miller J. (1980). Radioautography of binding of tritiated diprenorphine to opiate receptors. *Life Sci*. 26 : 1047-1052.

Pelletier G. (1980). Ultrastructural localization of a fragment (16K) of the common precursor for adrenocorticotropin (ACTH) and β -lipotropin (B-LPH) in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett*. 16: 85-90.

Pelletier G and Tong Y. (1992). Lactation but not prolactin increases the levels of pre-proNPY mRNA in the rat arcuate nucleus. *Mol. Cell. Neurosci*. 3: 286-290.

Pert A. (1978). The effects of opiates on nigrostriatal dopaminergic activity. In: **Characteristic and functions of opioids** (Eds Van Ree JM and Terenius L) pp 389-402. Biochemical Press Elsevier North Holland, Amsterdam.

Petrusz P, Merchenthaler I and Maderdrut JL. (1985). Distribution of enkephalin-containing neurons in the central nervous system. In: **Handbook of chemical Neuroanatomy**. GABA and neuropeptides in the CNS. Björklund A, Hökfelt T(eds) Part I, Elsevier, Amsterdam. 4 : 273-334.

Pfeiffer DG, Pfeiffer A, Shimohigashi Y, Merriam GR and Loriaux L. (1983). Predominant involvement of μ -rather than δ - or κ -opiate receptors in LH secretion. *Peptides*. 4 : 647-649.

Pickel VM, Chan J and Ganten D. (1986). Dual peroxidase and colloidal gold-labeling study of angiotensin converting enzyme and angiotensin-like immunoreactivity in rat subfornical organ. *J. Neurosci*. 6: 2457-2469.

Piekut DT and Joseph SA. (1986). Co-existence of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular paraventricular neurons of rat hypothalamus. *Peptides*. 7: 891-898.

Pollard H, Bouthenet ML, Moreau J, Souil E, Verroust P, Ronco P and Schwartz JC. (1989). Detailed immunoradiographic mapping of enkephalinase (E. C. 3. 4. 24. 11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance P. **Neuroscience**. 30: 339-376.

Pollard H, De la Beaume S, Bouthenet ML, Schwartz JC, Ronco P and Verroust P. (1987a). Characterization of two probes for the localization of enkephalinase in rat brain: ³H-thiorphan and a ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody. **Eur. J. Pharmacol.** 133: 155-164.

Pollard H, Llorens-Cortes C, Couraud JY, Verroust P and Schwartz JC. (1987b). Enkephalinase (E. C. 3. 4. 24. 11) is highly localized to a striatonigral pathway in rat brain. **Neurosci. Lett.** 77: 267-271.

Pretel S and Piekut D. (1990). Coexistence of Corticotropin-Releasing Factor and Enkephalin in the paraventricular Nucleus of the Rat. **J. Comp. Neurol.** 294 : 192-201.

Quirion R, Zajac JM, Morgat JL and Riquès BP. (1983). Autoradiographic distribution of μ and δ opiate receptors in rat brain using highly selective ligands. **Life Sci.** 33 : 227-230.

Rasmussen DD, Kennedy BP, Ziegler MG and Nett TM. (1988). Endogenous opioid inhibition and facilitation of gonadotropin-releasing hormone from the median eminence *in vitro*: potential role of catecholamines. **Endocrinology.** 123: 2916-2921.

Relton JM, Gee NS, Matsas R, Turner AJ, Kenny AJ. (1983). Purification of endopeptidase 24.11 (enkephalinase) from pig brain by immunoadsorbent chromatography. **Biochem. J.** 215 : 519-523.

Reymond MJ, Kaur C and Porter JC. (1983). An inhibitory role for morphine on the release of dopamine into hypophysial portal blood and on the synthesis of dopamine in tuberoinfundibular neurons. **Brain Res.** 262: 253-258.

Rivier C, Vale W, Ling N, Brown M and Guillemin R. (1977). Stimulation *in vivo* of the secretion of prolactin and growth hormone by β -endorphin. **Endocrinology.** 100: 238-241.

Roemer DH, Buescher H, Hill H, Pless J, Bauer W, Cardinaux F, Closse A, Hauser D and Hugenin R. (1977). A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity. **Nature.** 268: 547-549.

Romagnano MA, Chafel TL, Pilcher WH and Joseph S. (1982). The distribution of enkephalin in the mediobasal hypothalamus of the mouse brain: effects of neonatal administration of MSG. **Brain Res.** 236: 497-504.

Ronco P, Geniteau M, Poujeol P, Melcion C, Verroust P and Vandewalle A. (1986). Characterization of monoclonal antibodies to rabbit renal cortical cells. **An. J. Physiol.** 250: C 506.

Ronco P, Pollard H, Galceran M, Delauche M, Schwartz JC and Verroust P. (1988). Distribution of enkephalinase (membrane metalloendopeptidase, E. C. 3. 4. 24. 11) in rat organs. Detection using a monoclonal antibody. **Lab. invest.** 58 N°2: 210-217.

Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Socora E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens-Cortes C and Schwartz JC. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows anti-nociceptive activity in mice. **Nature.** 288: 286-288.

Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E and Kordon C. (1977). Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats. **Endocrinology.** 101: 1475-1483.

Rotsztein WH, Drouva SV, Pattou E and Kordon C. (1978). Met-enkephalin inhibits in vitro dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. **Nature.** 274: 281-282.

Rotsztein WH, Drouva SV, Pollard H, Sokoloff P, Pattou E and Kordon C. (1982). Further evidence for the existence of opiate binding sites on neurosecretory LHRH mediobasal hypothalamic terminals. **Eur. J. Pharmacol.** 80: 139-141.

Ruprecht J, Ukponmwan OE, Admiraal PV and Dzoljic MR. (1983). Effect of phosphoramidon, a selective enkephalinase inhibitor, on nociception and behaviour. **Neurosci. Lett.** 41: 331-335.

Sarkar DK and Yen SSC. (1985). Changes in β -endorphin-like immunoreactivity in pituitary portal blood during the oestrus cycle and after ovariectomy in rats. **Endocrinology.** 116: 2075-2079.

Schäfer MKH, Bette M, Romeo H, Schwaeble W and Weihe E. (1994). Localization of κ -opioid receptor mRNA in neuronal subpopulations of rat sensory ganglia and spinal cord. **Neurosci. Letters.** 167 : 137-140.

Schneider HPG and Mc Cann SM. (1970). Mono and indolamines and control of LH secretion. **Endocrinology.** 86: 1127.

Schwartz JC. (1983). Metabolism of enkephalins and the concept of neuropeptidase. **Trends Neurosci.** 6: 45-48.

Schwartz JC. (1988). Enkephalinase inhibitors as drugs. **Design of enzyme inhibitors as drugs.** 2: 206-226.

Schwartz JC, Costentin J and Leconte JM. (1985). Pharmacology of enkephalinase inhibitors. **Trends Pharmacol.** 6: 472-476.

Schwartz JC, De La Beaume S, Bouthenet ML, Giros B, Gros C, Llorens-Cortes C, Pollard H, Sales N, Solhonne B, Costentin J and Lecomte JM. (1986). Neuropeptidases responsables de l'inactivation des enképhalines et pharmacologie de leurs inhibiteurs. **J. Pharmacol.** (Paris). 17, suppl. II: 104-122.

Schwartz JC, Malfroy B and De La Beaume S. (1981). Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase (enkephalinase) as neuropeptidase. **Life Sci.** 29: 1715-1740.

Segawa T, Nakata Y, Yajima H and Kitagawa K. (1977). **Jap. J. Pharmac.** 27: 573.

Seidah NG, Dennis M, Corvol P, Rochemont J and Chretien MA. (1980) A rapid high-performance liquid chromatography purification method of iodinated polypeptide hormones. **Anal. Biochem.** 109: 185-191.

Shaar CJ, Frederickson RCA, Dininger NB and Jackson L. (1977). Enkephalin analogues and naloxone modulate the release of growth hormone and prolactin. Evidence for regulation by an endogenous opioid peptide in brain. **Life Sci.** 21: 853-860.

Sharif NA and Hughes J. (1989). Discrete mapping of brain μ and δ opioid receptors using selective peptides : quantitative autoradiography, species differences and comparison with κ receptors. **Peptides.** 10 : 499-522.

Silverman AJ. (1988).The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry, In: **The Physiology of Reproduction.** Knobil E, Neill JD, Ewings LL, Greenwald GS, Market CL and Pfaff DW (eds). Raven Press, New York. Vol.1.1283-1304.

Simon EJ. (1991). Opioid receptors and endogenous opioid peptides. **Medicinal Research Reviews.** 11: 357-374.

Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR and Erdos EG. (1984) Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. **Peptides.** 5: 769-776.

Smith MS. (1993). Lactation alters neuropeptide-Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat. **Endocrinology.** 133: 1258-1265.

Smith MS and Reinhart J. (1993). Changes in pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid content during lactation and after pup removal. **Endocrinology.** 133: 2080-2084.

Sonnenberg JL, Sakane Y, Jeng AY, Koehm JA, Ansell JA, Wennogle LP and Ghai RD. (1988). Identification of protease 3. 4. 24. 11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. **Peptides**. 9: 173-180.

Stephenson SL and Kenny AJ. (1987). The hydrolysis of α -human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24. 11. **Biochem. J.** 243: 183-187.

Sullivan S, Akil H and Barchas JD. (1978). *In vitro* degradation of enkephalin : evidence for cleavage at the Gly-Phe bond. **Commun. Psychopharmac.** 2 : 525-530.

Swerts JP, Perdrisot R, Patey G, De La Beaume S and Schwartz JC. (1979). Is "enkephalinase" identical with "angiotensin converting enzyme"? **Eur. J. Pharmac.** 53: 209-210.

Tempel E and Zukin RS. (1987). Neuroanatomical patterns of the μ , δ and κ opioid receptors of rat brain as determined by quantitative *in vitro* autoradiography. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84 : 4308-4312.

Theodosis D.T. and Poulain D.A. (1987). Oxytocin-secreting neurones: a physiological model for structural plasticity in the adult mammalian brain. **Trends Neurosci.** 10: 426-430.

Theodosis D.T. and Poulain D.A. (1989). Neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult rat paraventricular nucleus. **Brain Res.** 484: 361-366.

Thind KK and Goldsmith PC. (1988). Infundibular gonadotropin-releasing hormone neurons are inhibited by direct opioid and autoregulatory synapses in juvenile monkeys. **Neuroendocrinology.** 47: 203-216.

Thompson RC, Mansour A, Akil H and Watson SJ. (1993). Cloning and pharmacological characterization of a rat μ -opioid receptor. **Neuron.** 11 : 903-913.

Tramu G and Léonardelli J. (1979). Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. **Brain Res.** 168: 457-471.

Tramu G, Croix D and Pillez A. (1983). Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. **Neuroendocrinology.** 37: 467-469.

Tramu G, Beauvillain JC, Croix D, Pillez A and Garaud JC. (1984). Coexistence of hypothalamic factors with other neuropeptides. Demonstration in the median eminence of rats and guinea pigs. **Neurochem. Int.** 6 : 721-730.

Turner AJ, Matsas R and Kenny AJ. (1985). Are there neuropeptide-specific peptidases? Commentary. **Biochem. Pharmacol.** 34: 1347-1356.

Turner AJ and Whittle SR. (1983). Biochemical dissection of the γ -aminobutyrate synapse. **Biochem. J.** 209: 29.

Tweedle CD and Hatton GI. (1987). Morphological adaptability at neurosecretory axonal endings on the neurovascular contact zone of the rat neurohypophysis. **Neuroscience.** 20: 241-246.

Van Loon GR, Ho D and Kim C. (1980). β -endorphin-induced decrease in hypothalamic dopamine turnover. **Endocrinology.** 106: 76.

Van Ree JM, Spaapen-Kok WB and Wied D. (1976). Differential localization of pituitary-adrenal activation and temperature changes following intrahypothalamic microinjection of morphine in rats. **Neuroendocrinology.** 22: 318-325.

Van Vugt DA, Bruni JF and Meites J. (1978). Naloxone inhibition of stress induced increase in prolactin secretion. **Life Sci.** 22: 85-90.

Van Vugt DA, Bruni JF, Sylvester PW, Chen HT, Leiri T and Meites J. (1979). Interaction between opiates and hypothalamic dopamines on prolactin release. **Life Sci.** 24: 2361-2368.

Waksman G, Hamel E, Delay-Goyet P and Roques BP. (1986a). Neuronal localization of the neutral endopeptidase "enkephalinase" in rat brain revealed by lesions and autoradiography. **EMBO J.** 5 N°12: 3163-3166.

Waksman G, Hamel E, Fournié-Zaluski MC and Roques BP. (1986b). Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of μ and δ opioid receptors in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 1523-1527.

Waksman G, Hamel E, Delay-Goyet P and Roques BP. (1987). Neutral endopeptidase-24.11, μ , δ opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. **Brain Res.** 436: 205-216.

Wamsley J. (1983). Opioid receptors : autoradiography. **Pharmacol. Rev.** 35 : 69-83.

Wang HJ, Hoffman GE and Smith MS. (1993). Suppressed tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic system during lactation. **Endocrinology.** 133: 1657-1663.

- Wang JB, Imai YS, Eppler GM, Gregor P, Spivak CE and Uhi GR. (1993). μ -opiate receptor-cDNA cloning and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90 : 10230-10234.
- Weesner GD and Malven PV. (1990). Intracerebral immunoneutralization of β -endorphin and met-enkephalin disinhibits release of pituitary luteinizing hormone in sheep. **Neuroendocrinology.** 52: 382-388.
- Wessendorf MW, Arvidsson U, Dado RJ, Law PY, Loh HH and Elde R. (1994). δ -opioid receptor relationship to biogenic amines and enkephalin in rat spinal cord and brain stem. **Society for Neuroscience Abstract.** 24 th annual meeting. Miami Beach, Florida. 611.2.
- Whisnant CS, Havern RL and Goodman RL. (1991). Endogenous opioid suppression of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude in the ewe: hypothalamic sites of action. **Neuroendocrinology.** 54: 587-593.
- White JD and Mc Kelvy JF. (1986). Enkephalin biosynthesis and processing during lactation. **Neuroendocrinology.** 43 : 377-382.
- Wilcox J N, Pollard H, Moreau J, Schwartz J C and Malfroy B. (1989). Localization of enkephalinase mRNA in rat brain by *in situ* hybridization: comparison with immunocytochemical localization of the protein. **Neuropeptides.** 14: 77-83.
- Wilk S. (1983). Minireview: prolyl endopeptidase. **Life Sci.** 33: 2149.
- Wilkes MM and Yen SSC. (1981). Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. **Life Sci.** 28: 2355-2359.
- Wittaker VP, Dowdall MJ and Boyne AF. (1972). In: **Biochem. Soc. Symp.** (Ed Smellie RMS), Neurotransmitters and metabolic regulation. 36: 49.
- Wolozin BL, Nishimura S and Pasternak GW. (1982). The binding of κ and σ -opiates in rat brain. **J. Neurosci.** 2 : 708-713.
- Wood PL and Iyengar S. (1988). Central actions of opiates and opioid peptides, *in vitro* evidence for opioid receptor multiplicity. In: **The opiate receptors.** Pasternak GW (ed) Humana, Clifton, NJ, pp 307-356.
- Yamamoto C. (1973). Propagation of after discharges elicited in thin brain sections in artificial media. **Exp. Neurol.** 40: 183-188.
- Yoshikawa K, Williams C and Sabol SL. (1984). Rat brain proenkephalin mRNA, cDNA cloning, primary structure and distribution in the central nervous system. **J. Biol. Chem.** 259 : 14301-14308.

Zhang R, Hisano S, Chikamori-Aoyama M and Daikoku S. (1987). Synaptic association between enkephalin-containing axon terminals and proopiomelanocortin-containing neurons in the arcuate nucleus of rat hypothalamus. **Neurosci. Lett.** 82: 151-156.

Zuzel KA, Rose C and Schwartz JC. (1985). Assessment of the role of "enkephalinase" in cholecystokinin inactivation. **Neuroscience.** 15: 149-158.

LOCALISATION ULTRASTRUCTURALE DE L'ENDOPEPTIDASE-24.11 (E.C.3.4.24.11, ENDOPEPTIDASE NEUTRE, ENKEPHALINASE, E-24.11) DANS L'EMINENCE MEDIANE DU RAT: ARGUMENTS MORPHOLOGIQUES EN FAVEUR D'UNE ACTION LOCALE MODULATRICE DES ENKEPHALINES.

RESUME DE LA THESE

Les peptides opioïdes sont impliqués dans le contrôle de la plupart des fonctions neuroendocrines. Cette étude, réalisée chez le Rat, s'est intéressée au rôle des enképhalines présentes dans la zone externe de l'éminence médiane. Cette région, essentiellement constituée de terminaisons nerveuses, est la charnière neurohémale entre l'hypothalamus et l'hypophyse.

Dans l'éminence médiane, la présence d'endopeptidase-24.11 (E-24.11), une enzyme membranaire impliquée dans l'inactivation des enképhalines, peut être considérée comme un bon indicateur d'une action des enképhalines.

L'analyse ultrastructurale de la distribution d'E-24.11 montre que cette enzyme est associée essentiellement aux membranes plasmiques des terminaisons nerveuses, mais aussi à celles des tancytes. Cette présence peut être considérée comme un bon argument morphologique en faveur d'une action locale des enképhalines.

L'étape suivante a consisté à déterminer quels pouvaient être les systèmes neuroendocriniens concernés. Des doubles marquages immunocytochimiques en microscopie électronique ont permis de montrer que l'E-24.11 était insérée dans la membrane plasmique de la majorité des terminaisons nerveuses dopaminergiques et de certains boutons terminaux à CRF. Par contre, les terminaisons nerveuses à GnRH, à SOM et à GRF ne semblent pas posséder l'enzyme. Ces résultats suggèrent: 1-) que les enképhalines de l'éminence médiane peuvent agir sur les terminaisons dopaminergiques mais pas sur les terminaisons à GnRH. 2-) que les enképhalines n'ont pas d'action directe sur les boutons à SOM et à GRF. 3-) que certaines terminaisons nerveuses à CRF sont la cible d'une action enképhalinergique.

D'autres observations ont permis de constater qu'il existait une variation concomitante des enképhalines et de l'E-24.11 dans l'éminence médiane pendant la lactation. Ceci implique: 1-) qu'il existe une relation fonctionnelle entre l'E-24.11 et les enképhalines dans l'éminence médiane 2-) que les enképhalines ont une action locale au sein de l'EM pendant la lactation.

Enfin, grâce à l'utilisation de ligands spécifiques, une densité importante de sites de liaison μ a été mise en évidence alors qu'il n'a pas été possible d'observer de sites de liaison de type δ . L'action locale des enképhalines dans la zone externe de l'éminence médiane se ferait donc, au moins en partie, par l'intermédiaire de récepteurs opioïdes de type μ .

MOTS-CLES

-neuroendocrinologie
-Rat
-éminence médiane
-endopeptidase-24.11

-lactation
-enképhalines
-microscopie électronique
-paracrinie/autocrinie

