

50376  
1999  
371

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**  
**U.F.R. DE BIOLOGIE**

Année 1998-1999

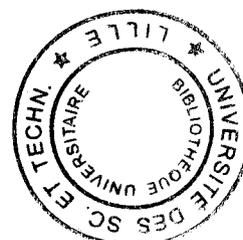
Numéro d'ordre : 2571

**THESE**

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé**  
Option : **Neurosciences**

Par

**Laurence DUFOURNY**



**ETUDE MORPHO-FONCTIONNELLE DES NEURONES CONTENANT  
LE RECEPTEUR DE LA PROGESTERONE DANS LE NOYAU  
VENTROLATERAL HYPOTHALAMIQUE DU COBAYE : ASPECTS  
NEUROCHIMIQUES ET NEUROANATOMIQUES.**

Soutenue le mercredi 6 octobre 1999 devant le Jury composé de :

<b>Président :</b>	<b>Monsieur le Professeur Jean-Paul Dupouy</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Monsieur le Professeur Dominique Fellmann</b> <b>Monsieur le Docteur Yves Tillet</b>
<b>Examineur :</b>	<b>Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain</b>
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Madame le Docteur Maryvonne Warembourg</b>

**A mes parents,**

**A mon frère,**

Pour leur chaleureuse affection et leur soutien sans lesquels  
ce travail n'aurait pas été possible

*Je tiens à remercier les membres du Jury :*

Monsieur le **Professeur J-P Dupouy** qui a aimablement accepté de présider le jury de cette thèse

Monsieur le **Docteur Y Tillet** pour l'honneur qu'il me fait de s'intéresser à mes recherches et d'en juger les résultats.

Monsieur le **Professeur D Fellmann** qui a accepté d'être rapporteur de cette thèse malgré ses lourdes charges scientifiques et administratives. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude pour avoir bien voulu assumer cette responsabilité supplémentaire.

Monsieur le **Docteur JC Beauvillain** qui, en m'intégrant dans son laboratoire, a permis la réalisation de ce travail.

Madame le **Docteur M Warembourg** qui a dirigé mes travaux de DEA et de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa disponibilité, ses commentaires durant l'évolution de ce travail, et ses nombreux conseils lors de la rédaction de ce mémoire. Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

*Je remercie également :*

Madame **D Leroy** pour sa disponibilité au cours de ces cinq années et pour la patience dont elle a fait preuve à mon égard lors de l'apprentissage des techniques. Sa sympathie et ses conseils ont été pour moi un apport précieux.

Monsieur le **Docteur P Poulain** pour m'avoir aimablement initiée à la technique du transport axonal.

Tous les membres de l'unité INSERM 422, collègues et amis dont l'amitié et la serviabilité m'ont aidée pendant toutes ces années.

Ce travail a été réalisé à l'unité INSERM « Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale » (U422) et a donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

## **Publications**

- 1- **Dufourny L, Warembourg M (1995).** Le récepteur de la progestérone dans le noyau ventrolatéral du cobaye : colocalisation avec la neurotensine et la somatostatine. *Ann Endocrinol* 56 : 437.
- 2- **Dufourny L, Warembourg M (1996).** Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology* 64 : 215-224
- 3- **Dufourny L, Warembourg M, Jolivet A (1997).** Sex differences in estradiol-induced progestin receptor immunoreactivity in the guinea pig preoptic area and hypothalamus. *Neurosci Lett* 223 : 109-112
- 4- **Dufourny L, Warembourg M, Jolivet A (1998).** Multiple peptides infrequently coexist in progesterone receptor-containing neurons in the ventrolateral hypothalamic nucleus of the guinea pig : an immunocytochemical triple-label analysis of somatostatin, neurotensin and substance P. *J Neuroendocrinol* 10 : 165-173
- 5- **Dufourny L, Warembourg M (1999).** Estrogen modulation of neuropeptides : somatostatin, neurotensin and substance P, in the ventrolateral and arcuate nuclei of the female guinea pig. *Neurosci Res* 33 : 223-228
- 6- **Dufourny L, Warembourg M, Jolivet A (1999).** Quantitative studies of progesterone receptor and nitric oxide synthase colocalization with somatostatin, or neurotensin, or substance P in neurons of the guinea pig ventrolateral hypothalamic nucleus : an immunocytochemical triple label analysis. *J Chem Neuroanat* 17(1) : à paraître.

- 7- **Dufourny L**, Leroy D, Warembourg M. Colchicine differentially induces nitric oxide synthase in the guinea pig hypothalamus. Soumis pour publication dans Brain Res Bull
- 8- **Dufourny L**, Warembourg M. Projections from ventrolateral hypothalamic neurons containing progesterone receptor and somatostatin to the midbrain central gray in female guinea pig. Soumis pour publication dans Exp Brain Res.

### **Publications en préparation**

- 1- **Dufourny L**, Warembourg M, Jolivet A. Colchicine influence on nitric oxide synthase and progesterone receptor immunoreactivities in the female guinea pig ventrolateral hypothalamic nucleus. En préparation pour Neurosci Lett.

### **Communication orale**

- 1- **Dufourny L**, Warembourg M. Caractérisation des neurones exprimant NO dans le noyau hypothalamique ventrolatéral du cobaye et effet des œstrogènes. XXVII Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, Septembre 1998.

### **Communications affichées**

- 1- **Dufourny L**, Warembourg M. Le récepteur de la progestérone dans le noyau ventrolatéral du cobaye : colocalisation avec la neurotensine et la somatostatine. XXIV Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Orford, Québec, 19-22 septembre 1995.
- 2- **Dufourny L**, Warembourg M. Coexistence de neurotensine, somatostatine, substance P et du récepteur de la progestérone dans les neurones du noyau ventrolatéral chez le cobaye. XXV Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Strasbourg, Septembre 1996.

- 3- **Dufourny L**, Warembourg M. Le récepteur de la progestérone dans le noyau ventrolatéral du cobaye : colocalisation avec la neurotensine et la somatostatine. Colloque ULB-Lille, Campus Erasme, Bruxelles, 1997.
  
- 4- Warembourg M, **Dufourny L**. Projections vers le mésencéphale de neurones du noyau ventrolatéral contenant de la somatostatine et des récepteurs de la progestérone, chez le cobaye. XXVII Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, Septembre 1998.

# **SOMMAIRE**

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	p. 6
<b>INTRODUCTION</b>	p. 7
<b>ETAT DES CONNAISSANCES</b>	p. 9
<b>I - Le noyau ventrolatéral du cobaye : comparaison avec la région ventrolatérale du noyau ventromédian du rat</b>	p. 9
<b>A – Localisation, terminologie et contenu neurochimique du VL</b>	p. 9
<b>B - Connexions du VL chez le cobaye</b>	p. 9
1) Efférences du VL	p. 10
2) Afférences au VL	p. 11
3) Comparaison avec les projections du VMvl chez le rat	p. 11
<b>II - Récepteurs des œstrogènes et récepteurs de la progestérone</b>	p. 12
<b>A – Structure des récepteurs et techniques utilisées pour leur détection</b>	p. 12
1) Structure du RE et du RP	p. 12
2) Techniques utilisées pour l'étude des récepteurs stéroïdiens	p. 13
<b>B - Localisation du RE dans le cerveau</b>	p. 13
<b>C - Localisation du RP dans le cerveau</b>	p. 14
<b>D - Régulation et rôles physiologiques des récepteurs stéroïdiens</b>	p. 15
1) Régulation du RE	p. 15
2) Régulation du RP	p. 15
3) Rôles des récepteurs stéroïdiens	p. 16
a) La sécrétion gonadotrope	p. 16
b) La réceptivité sexuelle	p. 17
<b>III - La somatostatine, la neurotensine et la substance P</b>	p. 18
<b>A - La SOM</b>	p. 18
1) Le neuropeptide et ses rôles biologiques	p. 18
2) Localisation de la SOM dans le diencephale	p. 19
3) Stéroïdes gonadiques et SOM	p. 19
<b>B - La NT</b>	p. 20
1) Le neuropeptide et ses rôles biologiques	p. 20
2) Localisation dans le diencephale	p. 20
3) Stéroïdes gonadiques et NT	p. 20

<b>C - La SP</b>	p. 21
1) Le neuropeptide et son action sur la fonction de reproduction	p. 21
2) Localisation dans le diencephale	p. 21
3) Stéroïdes gonadiques et SP	p. 22
<b>IV - Le monoxyde d'azote, un messenger intercellulaire</b>	p. 22
<b>A - Les NOS</b>	p. 22
<b>B - Localisation de la NOS neuronale</b>	p. 23
<b>C - Influence du NO sur les fonctions neuroendocrines et la lordose</b>	p. 23
<b>OBJECTIFS</b>	p. 25
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	p. 27
<b>I - Animaux et traitements</b>	p. 27
<b>A – Animaux</b>	p. 27
<b>B – Traitements</b>	p. 27
<b>II - Préparation du tissu et réalisation des sections</b>	p. 28
<b>A - Fixation et dissection</b>	p. 28
<b>B - Post-fixation, cryoprotection et congélation du tissu</b>	p. 28
<b>C - Réalisation des sections</b>	p. 29
1) Coupes au cryostat	p. 29
2) Coupes au microtome à congélation	p. 29
<b>III - Techniques immunocytochimiques</b>	p. 29
<b>A – Immunsérums</b>	p. 30
1) Anticorps primaires	p. 30
2) Anticorps secondaires	p. 30
<b>B - Etapes communes à toutes les réactions immunocytochimiques</b>	p. 31
<b>C - Simples réactions immunocytochimiques</b>	p. 32
1) Détection du RP	p. 32
2) Détection des neuropeptides (SOM, NT ou SP)	p. 32
<b>D - Détection du RP et de la SOM</b>	p. 32
<b>E - Triples réactions immunocytochimiques</b>	p. 33
1) Marquage du RP et de deux neuropeptides, nécessitant l'utilisation d'une élution	p. 33
a) Détection des cellules IR-RP/SOM/NT	p. 33
b) Détection des cellules IR-RP/NT/SOM	p. 34
c) Détection des cellules IR-RP/SP/SOM	p. 34
d) Détection des cellules IR-RP/SP/NT	p. 34

2) Marquage simultané du RP, de la NOS et de l'un des 3 neuropeptides précédemment étudiés	p. 34
a) Détection des cellules IR-RP/NOS/SOM	p. 34
b) Détection des cellules IR-RP/NOS/NT	p. 35
c) Détection des cellules IR-RP/NOS/SP	p. 35
<b>F - Contrôles de la spécificité des réactions immunocytochimiques</b>	p. 35
<b>IV – Techniques de traçage axonal rétrograde</b>	p. 36
<b>A – Stéréotaxie</b>	p. 36
<b>B – Traceurs axonaux fluorescents</b>	p. 36
<b>C – Mode d'injection du traceur</b>	p. 36
1) Injection par microélectroiontophorèse	p. 36
2) Injection par pression	p. 37
<b>D – Coloration du site d'injection du traceur</b>	p. 37
<b>E – Détection des cellules IR-RP/SOM se projetant vers la SGPM</b>	p. 37
1) Détection des cellules TB/RP/SOM et FG/RP/SOM	p. 37
2) Détection des cellules BV/SOM/RP	p. 38
<b>V – Histochimie NADPHd</b>	p. 38
<b>VI – Observation et analyse quantitative des résultats</b>	p. 38
<b>A – Observation</b>	p. 38
<b>B – Analyse quantitative de l'ensemble des résultats</b>	p. 39
1) Détermination des régions examinées	p. 39
2) Comptages	p. 40
a) sur lames	p. 40
b) sur photographies	p. 40
3) Analyse statistique	p. 41
<b>RESULTATS</b>	p. 42
<b>I – Les cellules IR-RP dans le VL et les autres régions hypothalamiques : comparaison entre le cobaye femelle et le cobaye mâle.</b>	p. 42
<b>A – Distribution des cellules IR-RP</b>	p. 42
1) Dans le VL	p. 42
2) Dans l'aire préoptique, le noyau arqué et le noyau prémamillaire ventral	p. 42
3) Induction du RP par le traitement œstrogénique	p. 43

B – Quantification des cellules IR-RP	p. 43
<b>II – Coexistence du RP et de la SOM</b>	p. 44
A – Distribution des cellules à SOM dans l’hypothalamus chez le cobaye	p. 44
B – Localisation des cellules IR-RP/SOM	p. 44
C – Estimation quantitative des cellules IR-RP/SOM	p. 45
<b>III – Projection des cellules IR-RP/SOM du VL en direction du mésencéphale</b>	p. 46
A – Localisation et aspect des sites d’injection	p. 46
1) Localisation des sites d’injection	p. 46
2) Aspect des sites d’injection	p. 46
B – Description des régions marquées après injection de FG	p. 47
C – Description des régions marquées après injection de TB	p. 47
1) Aspect des cellules marquées	p. 47
2) Localisation des cellules TB+ et des cellules TB/RP/SOM	p. 48
3) Estimation des cellules TB+ et des cellules TB/RP/SOM	p. 48
D – Description des régions marquées après injection de BV	p. 49
1) Aspect et localisation des cellules BV+ et des cellules BV/SOM/RP	p. 49
2) Estimation des cellules BV+ et des cellules BV/SOM/RP	p. 49
<b>IV – Coexistence du RP, avec la SOM, la NT, et/ou la SP dans des cellules du VL.</b>	p. 50
A – Distribution des cellules IR-SOM, IR-NT et IR-SP	p. 50
B – Cellules doublement IR	p. 51
1) Localisation des cellules doublement IR	p. 51
2) Estimation des cellules doublement IR	p. 51
C – Neurones triplement IR	p. 52
<b>V – Influence des œstrogènes sur les immunoréactivités SOM, NT et SP dans le VL</b>	p. 53
<b>VI – Colocalisation du RP avec la NOS et avec l’un des neuropeptides précédemment étudiés dans des cellules du VL</b>	p. 54
A – Cellules doublement IR (RP/NOS)	p. 54
B – Cellules triplement IR	p. 55
1) Cellules IR-RP/NOS/SOM	p. 55
2) Cellules IR-RP/NOS/NT	p. 55

3) Cellules IR-RP/NOS/SP	p. 55
<b>VII – Œstrogènes et colchicine : influence sur l'activité NADPHd et sur la coexistence du RP avec la NOS dans le VL</b>	p. 56
A – Effet des œstrogènes sur l'activité NADPHd en fonction de la durée du traitement stéroïdien	p. 56
B – Effet de la colchicine sur l'activité NADPHd	p. 56
1) Chez des femelles non GDX+EB	p. 57
2) Chez des femelles GDX+EB	p. 57
C – Influence de la colchicine sur les cellules IR-RP/NOS	p. 58
<b>DISCUSSION</b>	p. 59
<b>I – Les populations neuronales IR-RP, neuropeptidergiques et IR-NOS dans le VL : comparaison avec celles des autres régions hypothalamiques</b>	p. 59
A – Cellules IR-RP	p. 59
B – Cellules neuropeptidergiques	p. 60
C – Cellules NADPHd et cellules IR-NOS	p. 61
<b>II – Caractérisation neurochimique des populations IR-RP du VL</b>	p. 64
A – Considérations méthodologiques	p. 64
B – Populations neuronales doublement et triplement IR identifiées.	p. 65
<b>III – Projections des neurones IR-RP/SOM du VL vers la SGPM</b>	p. 67
A – Considérations méthodologiques	p. 68
B – Données anatomiques	p. 69
<b>IV – Implications du RP, des neuropeptides et du NO dans les fonctions de reproduction et en particulier dans la lordose</b>	p. 69
A – Fonction du RP	p. 69
B – Actions possibles des neuropeptides	p. 70
C – Rôle du NO	p. 73
<b>V – Fonctions possibles des neurones du VL dans d'autres comportements et dans l'intégration de la douleur</b>	p. 75
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	p. 78
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	p. 81
<b>RESUME</b>	p. 120

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

## LISTE DES ABREVIATIONS

AMCA :	acide alpha-méthyl coumarique
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
BV :	billes de latex liées à la fluorescéine
CRH :	corticolibérine
DAB :	diaminobenzidine
EB :	benzoate d'œstradiol
FG :	Fluoro-Gold
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
FSH :	hormone folliculo stimulante
GDX :	gonadectomisés
GHRH :	somatolibérine
GMPc :	guanosine monophosphate cyclique
GnRH :	gonadolibérine
GTP :	guanosine triphosphate
Ig :	immunoglobulines
IR :	immunoréactive
LH :	hormone lutéïnisante
NADPH :	nicotinamide-adénosine-dinucléotide-phosphate
NADPHd :	NADPH diaphorase
NBT :	nitroblue tetrazolium
NO :	monoxyde d'azote
NOS :	synthétase du monoxyde d'azote
NT :	neurotensine
OVX :	ovariectomisée(s)
PBS :	tampon phosphate salin
PPT :	préprotachykinine
RE :	récepteur des œstrogènes
RP :	récepteur de la progestérone
SEM :	écart standard à la moyenne
SGPM :	substance grise périventriculaire mésencéphalique
SOM :	somatostatine
SP :	substance P
TB :	true blue
VL :	noyau ventrolatéral du cobaye
VMvl :	région ventrolatérale du noyau ventromédian du rat

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les stéroïdes gonadiques régissent par l'intermédiaire d'un rétrocontrôle cérébral, les différents événements neurochimiques contrôlant la fonction de reproduction. Celle-ci est conditionnée, chez les mammifères, par l'équilibre endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, permettant l'ovulation, et par la régulation hormonale du comportement sexuel aboutissant à l'accouplement. Cette régulation ne résulte pas d'une action isolée et particulière des stéroïdes sur le cerveau mais représente plutôt une composante parmi la multitude des réponses physiologiques qui peuvent être influencées par ces hormones comme l'anxiété, l'agressivité, le comportement alimentaire, l'apprentissage ou la mémoire.

Bien que le cerveau soit reconnu pour être un organe cible des stéroïdes et que l'induction hormonale du comportement de reproduction, qui se traduit chez les rongeurs par la réceptivité sexuelle, soit bien établie, de nombreux mécanismes intervenant dans cette induction ne sont pas encore démontrés. La question, de savoir comment les hormones gonadiques peuvent agir simultanément sur plusieurs systèmes neuromodulateurs et ce à de multiples endroits du cerveau, de façon cohérente pour influencer les trajets nerveux et ainsi coordonner les réponses comportementales, reste posée.

Les récepteurs des stéroïdes sont des facteurs de transcription qui agissent sur le génome pour augmenter ou diminuer l'expression des gènes. L'induction hormonale du comportement de reproduction passe obligatoirement par un changement dans l'expression des gènes qui va entraîner une série d'événements pour aboutir à une modulation de la neurotransmission chimique dans le cerveau. Parmi les événements impliqués, qui peuvent être influencés par les stéroïdes, on peut citer des modifications dans la synthèse de neuropeptides et/ou de neurotransmetteurs ainsi que dans leur libération ou leur recapture, et/ou l'activation de composantes postsynaptiques spécifiques telles que récepteurs, seconds messagers et/ou enzymes qui peuvent changer la réponse synaptique. Ces mécanismes peuvent être mieux compris en précisant au moyen de techniques neuroanatomiques et plus particulièrement de marquages immunocytochimiques multiples, la nature chimique du contenu cellulaire des neurones cibles des stéroïdes.

Le noyau ventrolatéral (VL) hypothalamique chez le cobaye est une région très intéressante puisqu'elle renferme de nombreux récepteurs de l'œstradiol (RE ; Warembourg, 1977 ; Warembourg et al., 1989 ; Blaustein et Turcotte, 1989) et de la progestérone (RP ; Warembourg, 1978 a ; Warembourg et al., 1986 ; Blaustein et al., 1988 ; DonCarlos et al., 1989), et qu'elle joue un rôle clé dans la réceptivité sexuelle (Morin et Feder, 1974 ; Delville et Blaustein, 1991). Le présent travail utilise des techniques immunocytochimiques et de traçage axonal pour caractériser dans cette région, le contenu neurochimique des cellules contenant le RP et aborder l'étude de leurs projections. Dans la littérature, pratiquement tous les systèmes neuropeptidergiques ont été impliqués, à des niveaux différents, dans le contrôle de la fonction de reproduction. Un autre participant vraisemblable à la régulation des fonctions neuroendocrines et de la réceptivité sexuelle est le monoxyde d'azote (NO), messenger diffusible qui joue un rôle important dans les communications intercellulaires. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à trois neuropeptides, la somatostatine (SOM), la neurotensine (NT), et la substance P (SP), et nous avons recherché leur coexistence possible avec le RP. La synthétase du NO (NOS), enzyme qui produit le NO, a également retenu notre attention.

# **ETAT DES CONNAISSANCES**

## ETAT DES CONNAISSANCES

### I - Le noyau ventrolatéral du cobaye: comparaison avec la région ventrolatérale du noyau ventromédian du rat

#### A – Localisation, terminologie et contenu neurochimique du VL

La dénomination “ noyau ventrolatéral ” a été utilisée pour la première fois en 1983 par Bleier. Ce terme désigne une région hypothalamique bien individualisée chez le cobaye. En coupe frontale, le VL s'étend de la base du cerveau en direction du fornix (Fig. 1). Dans ses deux tiers antérieurs, il est situé de part et d'autre du noyau arqué et borde latéralement le noyau ventromédian et l'aire hypothalamique latérale (Fig 1). Postérieurement, ce noyau est plus compact et occupe une position plus basale. Le VL est l'équivalent anatomique d'une région non individualisée chez le rat qui correspond à la région ventrolatérale du noyau ventromédian (VMvl).

Dans le VL, la présence de SP (Gallagher et al., 1992), de NT (Warembourg et Jolivet, 1994), d'enképhalines (Olster et Blaustein, 1990 b), de NOS (Warembourg et al., 1999), et de récepteurs stéroïdiens, en particulier, le RP (Warembourg, 1978 a ; Warembourg et al., 1986) et le RE (Warembourg, 1977 ; Warembourg et al., 1989) a été mise en évidence.

#### B – Connexions du VL chez le cobaye

Les connexions du VL du cobaye ont été examinées de façon détaillée au moyen de techniques radioautographiques, basées sur l'injection d'acides aminés tritiés (Anderson et Shen, 1980 ; Shen, 1983) ou de techniques de transport axonal utilisant soit un traceur fluorescent à transport axonal rétrograde, le Fluorogold (FG ; Delville et Blaustein, 1993 ; Ricciardi et Blaustein, 1994) soit un traceur axonal antérograde, la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* (Staiger et Nurnberger, 1991 ; Ricciardi et al., 1996 ; Turcotte et Blaustein, 1999).

Le VL établit des relations privilégiées et réciproques avec des structures télencéphaliques, diencephaliques et mésencéphaliques (Fig. 2).

Fig. 1: Schéma d'une section frontale du cerveau chez le cobaye montrant la localisation du noyau ventrolatéral hypothalamique (en rouge). Am: amygdale; AR: noyau arqué; CA: corne d'Ammon; CC: corps calleux; ci: capsule interne; cpu: caudate putamen; f: fornix; LA: aire hypothalamique latérale; mt: tractus mamillo-thalamique; ot: tractus optique; Pa: noyau paraventriculaire; Th: thalamus; 3V: troisième ventricule; VL: noyau ventrolatéral; Vla: ventricule latéral; Vm: noyau ventromédian.

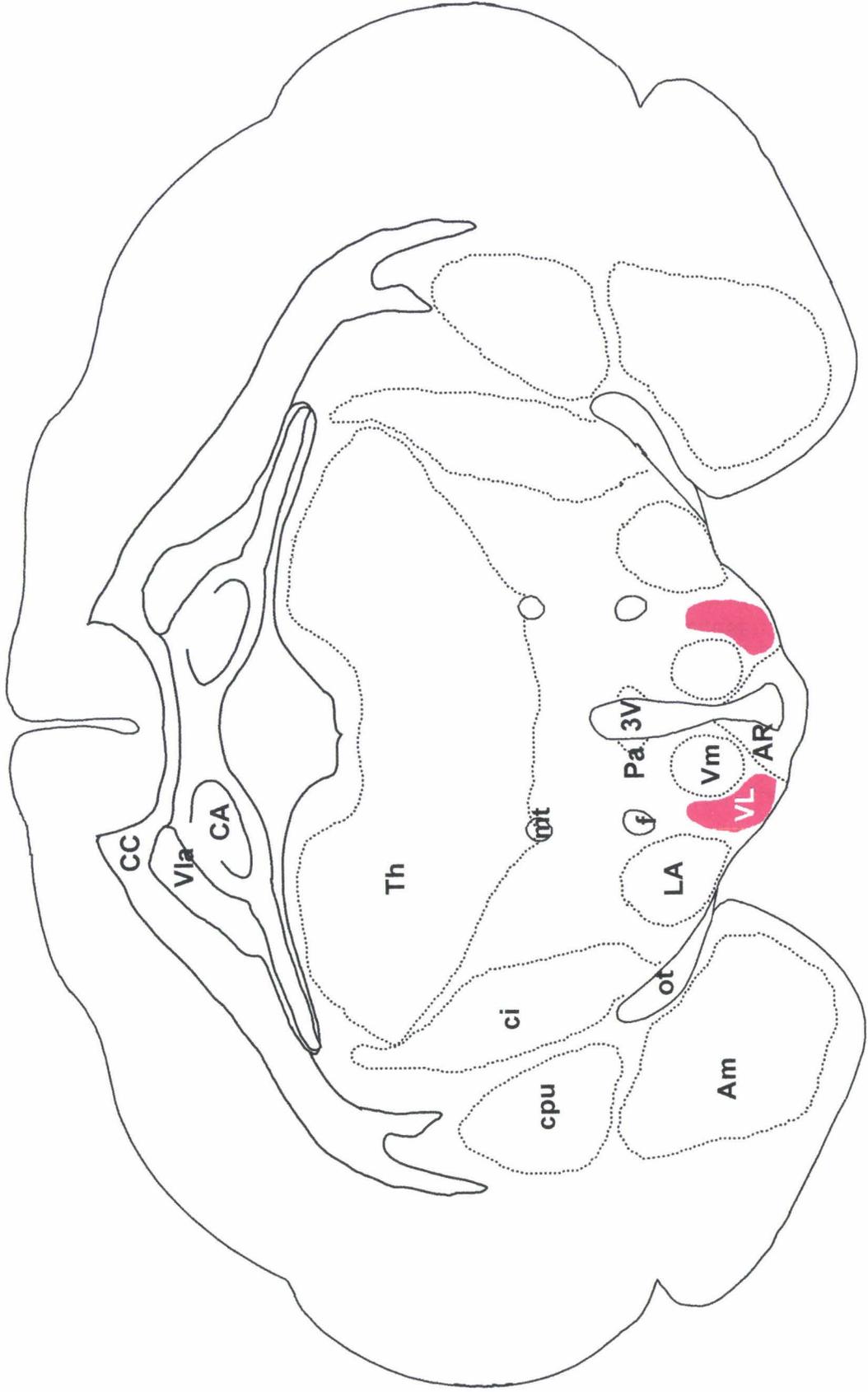
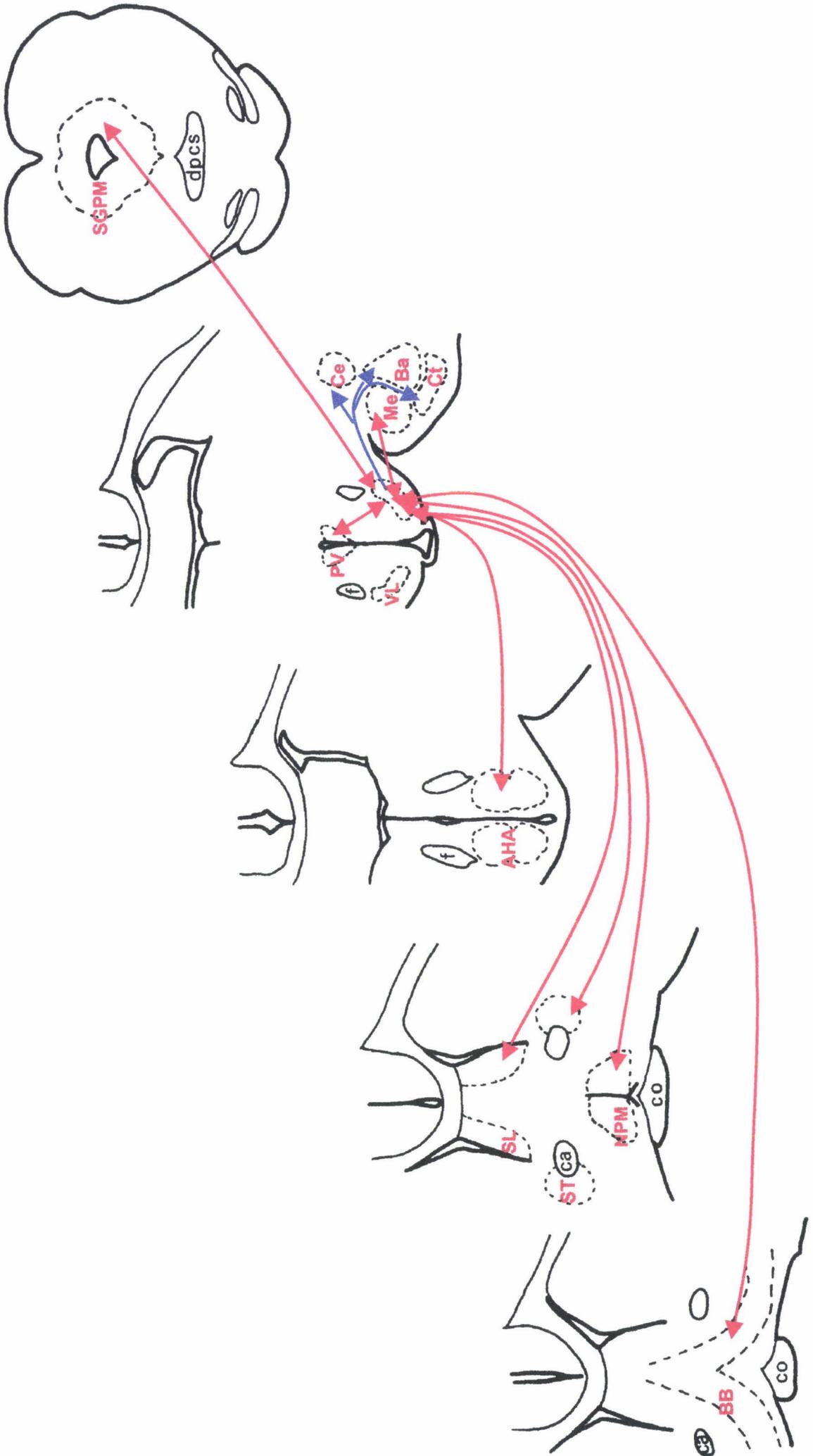


Fig. 2 : Schémas de sections frontales à travers le cerveau du cobaye représentant les efférences (flèches bleues) et les relations réciproques (flèches rouges) du VL avec des régions de l'aire préoptique, de l'hypothalamus et du mésencéphale. BB : bandelettes diagonales de Broca ; co: chiasma optique; ca: commissure antérieure; f: fornix; dpcs: décussation du pédoncule cérébral supérieure; NPM : noyau préoptique médian ; ST: noyau de la strie terminale; SL : septum latéral ; AHA : aire hypothalamique antérieure ; PV : noyau paraventriculaire ; VL : noyau ventrolatéral ; Ce: noyau central de l'amygdale; Ct: noyau cortical de l'amygdale; Ba: noyau basal de l'amygdale; Me: noyau médian de l'amygdale; SGPM : substance grise périventriculaire mésencéphalique.



## 1) Efférences du VL (Fig. 2)

### - vers les structures télencéphaliques

Quelques fibres, en provenance de neurones du VL, sont observées dans la région ventrale du septum latéral, le noyau septo-hypothalamique et les bandelettes diagonales de Broca (Shen, 1983). De nombreuses cellules du VL se projettent vers le noyau du lit de la strie terminale tandis que l'amygdale reçoit de rares terminaisons dans le noyau cortical, la région ventrolatérale du noyau basal, le noyau médian, et autour du noyau central (Ricciardi et Blaustein, 1994 ; Ricciardi et al., 1996 ; Turcotte et Blaustein, 1999).

### - vers les structures diencephaliques

Des axones, émis par des neurones du VL, sont observés dans le noyau préoptique médian, l'aire préoptique médiane et l'aire préoptique latérale (Shen, 1983 ; Ricciardi et Blaustein, 1994 ; Turcotte et Blaustein, 1999). Les cellules du VL se projettent plus massivement vers l'aire hypothalamique antérieure que vers l'aire hypothalamique latérale (Shen 1983). Le noyau paraventriculaire reçoit quelques efférences en particulier dans ses subdivisions parvocellulaires antéro-ventrale et médiane. Les neurones du VL émettent un plus grand nombre de terminaisons vers la région rostrale du noyau ventromédian que vers l'hypothalamus dorso-médian et postérieur. Quelques terminaisons et varicosités sont observées au niveau de la région caudale du noyau ventromédian, du noyau mamillaire médian et dans les deux tiers antérieurs du noyau arqué (Turcotte et Blaustein, 1999).

### - vers le mésencéphale

Les neurones du VL innervent massivement les divisions dorsale, latérale et ventrolatérale de la substance grise périventriculaire mésencéphalique (Shen, 1983; Ricciardi et Blaustein, 1994) mais se projettent plus rarement vers le colliculus supérieur et le tractus tegmental central. Quelques terminaisons sont détectées au niveau du tractus tegmental latéral (Ricciardi et al., 1996; Turcotte et Blaustein, 1999).

## 2) Afférences au VL (Fig. 2)

### - Afférences télencéphaliques

Le VL est richement innervé par les axones de neurones appartenant au septum latéral et médian et de neurones localisés dans la région rostrale des bandelettes diagonales de Broca (Staiger et Nurnberger, 1991). Le VL est la cible de nombreuses afférences provenant de cellules de la subdivision latérale du noyau du lit de la strie terminale, du noyau médian de l'amygdale et de l'aire amygdalo-hippocampique (Delville et Blaustein, 1993).

### - Afférences diencephaliques

Le VL reçoit des afférences de cellules situées dans le noyau préoptique médian, l'aire préoptique latérale et l'aire préoptique médiane, en particulier des neurones bordant l'aire préoptique latérale (Anderson et Shen, 1980). Il est également innervé par quelques fibres en provenance de l'aire hypothalamique antérieure et de la subdivision parvocellulaire du noyau paraventriculaire ainsi que par des projections de neurones de l'hypothalamus postérieur et du noyau prémamillaire ventral (Delville et Blaustein, 1993).

### - Afférences mésencéphaliques

Des fibres provenant de neurones de la substance grise périventriculaire mésencéphalique et de quelques cellules du noyau du raphé sont mises en évidence dans le VL (Delville et Blaustein, 1993).

## 3) Comparaison avec les projections du VMvl chez le rat

Les relations réciproques entre le VMvl et des régions télencéphaliques, diencephaliques et mésencéphaliques ont été étudiées en détail au moyen de techniques radioautographiques (Conrad et Pfaff, 1976 a, b ; Saper et al., 1976 ; Swanson, 1976 ; Krieger et al., 1979) et de techniques de transport axonal mettant en jeu des traceurs fluorescents (DonCarlos et Morrell, 1990 ; Akesson et al., 1994), la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* (Canteras et al., 1994) ou la peroxydase du raifort (McBride et Sutin, 1977; Ter Horst et Luiten, 1987 ; Fahrbach et al., 1989 ; Li et al., 1991). Des structures télencéphaliques, notamment le septum médian, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau médian de l'amygdale, mais aussi des

structures diencephaliques comme l'aire préoptique médiane, l'aire hypothalamique antérieure, le noyau paraventriculaire, le noyau prémamillaire ventral, ainsi que des structures mésencéphaliques, reçoivent des afférences de neurones localisés dans le VMvI (Saper et al., 1976 ; Krieger et al., 1979 ; DonCarlos et Morrell, 1990 ; Akesson et al., 1994 ; Canteras et al., 1994). Les afférences au VMvI proviennent des mêmes régions télencéphaliques (Conrad et Pfaff, 1976 a; Swanson, 1976; McBride et Sutin, 1977), diencephaliques (Conrad et Pfaff, 1976 b; Ter Horst et Luiten, 1987; Fahrbach et al., 1989), ou mésencéphaliques (Li et al., 1991). Le VMvI et le VL établissent donc des relations réciproques avec des régions cérébrales similaires, ce qui laisse supposer qu'ils ont des actions physiologiques analogues.

## **II - Récepteurs des œstrogènes et récepteurs de la progestérone**

### **A – Structure des récepteurs et techniques utilisées pour leur détection**

#### 1) Structure du RE et du RP

Toutes les protéines appartenant à la famille des récepteurs stéroïdiens possèdent une structure commune composée de différents domaines fonctionnels (Krust et al., 1986). Les régions A/B situées du côté N-terminal, variables selon le récepteur, permettent sa dimérisation (Fig. 3). La région C, dont la composition est la plus constante parmi les récepteurs des stéroïdes gonadiques, assure la liaison du récepteur à l'ADN (Fig. 3). Elle est suivie par la région D qui permet l'adressage nucléaire des récepteurs (Fig. 3). Les domaines E/F situés du côté C-terminal sont impliqués dans la liaison à l'hormone (Fig. 3). A ce jour, deux formes d'ARNm du RE, codées par des gènes différents, sont connues: l'ARNm du RE $\alpha$ , considéré comme la forme « classique » du RE, code une protéine constituée de 600 acides aminés, et l'ARNm du RE $\beta$ , isolé à partir de la prostate (Kuiper et al., 1996), code une protéine constituée de 485 acides aminés. Les deux protéines présentent de fortes homologues en particulier dans la région du RE liant l'ADN, et celle permettant la liaison du ligand (Kuiper et al., 1996). Le RP est une protéine de 930 acides aminés (Loosfelt et al., 1986).

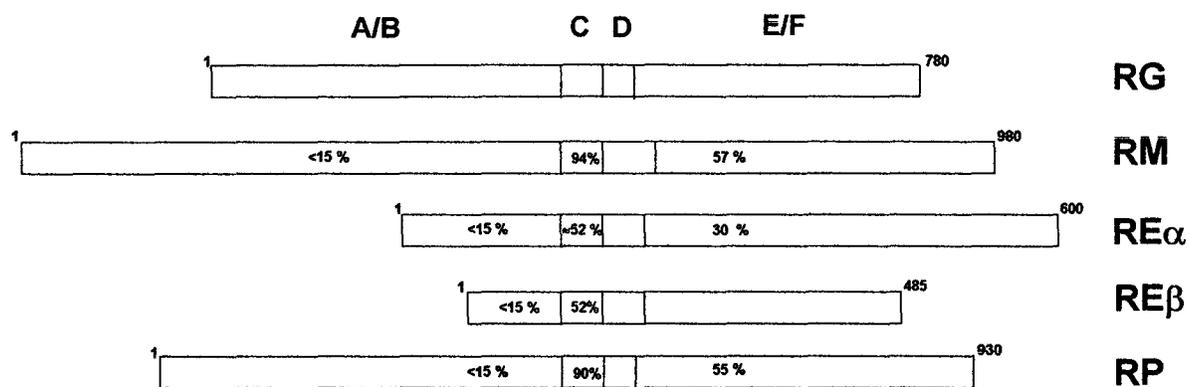


Fig. 3: Comparaison schématique de la structure des récepteurs stéroïdiens humains. Les valeurs indiquées donnent le pourcentage d'homologie en acides aminés des différents domaines par rapport au récepteur des glucocorticoïdes. RG : récepteur des glucocorticoïdes ; RM : récepteur des minéralocorticoïdes ; RE $\alpha$  : récepteur  $\alpha$  des œstrogènes ; RE $\beta$  : récepteur  $\beta$  des œstrogènes ; RP : récepteur de la progestérone. D'après Evans RM, Science 240 : 889-895, 1988.

## 2) Techniques utilisées pour l'étude des récepteurs stéroïdiens

Les travaux effectués dans le domaine de la biochimie sur les RE (Eisenfeld, 1967 ; Kato et Villed, 1967) et les RP (Whalen et Luttge, 1971) ont établi la nature protéique et la localisation intracellulaire des récepteurs, et envisagé l'hypothèse de la translocation nucléaire du récepteur stéroïdien cytoplasmique après interaction avec son ligand. Puis, les premières localisations radioautographiques des cellules contenant le RE (Stumpf, 1968; Warembourg, 1970) et des cellules contenant le RP (Sar et Stumpf, 1973 ; Warembourg, 1978 a, b) ont été réalisées dans le système nerveux central des rongeurs sur du tissu non-fixé après injection de l'hormone radioactive. Ces techniques radioautographiques, qui révèlent le complexe hormone –ligand, ont montré une localisation nucléaire des récepteurs mais ne mettent pas en évidence la nature du produit détecté et il ne faut pas oublier que le traceur peut être métabolisé. Dans les années 1984-1986, le développement d'anticorps contre le RE et le RP, a permis l'utilisation des techniques immunocytochimiques qui ont confirmé la localisation essentiellement nucléaire des récepteurs stéroïdiens dans différents organes cibles tels que l'utérus (King et Greene, 1984 ; Perrot-Applanat et al., 1985) et le cerveau (Warembourg et al., 1986). Les techniques immunocytochimiques, réalisées sur tissu fixé, ont rendu possible des recherches sur la coexistence dans les mêmes neurones d'un récepteur avec un neuromodulateur ou un neurotransmetteur. Des études par hybridation *in situ* ont ensuite été réalisées (Romano et al., 1989 b, Lauber et al., 1990; Simerly et al., 1990) après l'isolement des ARNm du RE et du RP. Après liaison à l'hormone, les récepteurs des stéroïdes gonadiques subissent des changements conformationnels, conduisant à leur dimérisation et à leur liaison à l'ADN au niveau de gènes cibles où ils constituent des facteurs de transcription (Beato et al., 1995).

### **B - Localisation du RE dans le cerveau**

Les cellules contenant le RE ont été localisées par radioautographie dans le télencéphale (septum latéral, amygdale, noyau du lit de la strie terminale, hippocampe), l'aire préoptique (noyau préoptique médian, aire préoptique médiane, noyau supraoptique, région périventriculaire), et l'hypothalamus (région hypothalamique périventriculaire, noyau paraventriculaire, noyau arqué, VL, noyau

prémamillaire ventral) chez le cobaye (Warembourg, 1977) et chez d'autres rongeurs (Pfaff, 1968 ; Stumpf, 1968 ; Warembourg, 1970 ; Pfaff et Keiner, 1973). Les études immunocytochimiques chez le cobaye donnent une distribution du RE similaire à celle précédemment obtenue (Warembourg et al., 1989 ; Blaustein et Turcotte, 1989 ; DonCarlos et al., 1991). Des cellules immunoréactives (IR) pour le RE ont aussi été localisées dans la substance grise périventriculaire mésencéphalique (DonCarlos et al., 1991 ; Turcotte et Blaustein, 1993). Les structures cérébrales contenant des cellules IR-RE chez le rat, à l'exception du noyau supraoptique, (Cintra et al., 1986 ; Axelson et Van Leeuwen, 1990) ou l'ARNm du RE (Simerly et al., 1990) sont identiques à celles décrites chez le cobaye. Les ARNm du RE $\alpha$  et du RE $\beta$  sont mis en évidence dans les mêmes proportions dans l'aire préoptique médiane et périventriculaire, dans les noyaux dorsomédian et prémamillaire (Shugrue et al., 1997 ; Laflamme et al., 1998). Le RE $\alpha$  est exprimé en plus grande quantité que le RE $\beta$  dans le noyau périventriculaire hypothalamique et dans le noyau arqué (Shugrue et al., 1997 ; Laflamme et al., 1998). Il n'est pas exprimé dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique où l'ARNm du RE $\beta$  est détecté, mais est le seul synthétisé dans le VMNvl (Shugrue et al., 1997 ; Laflamme et al., 1998).

### **C - Localisation du RP dans le cerveau**

Chez le cobaye (Warembourg, 1978 a), des cellules cibles de la progestérone ont été localisées, par radioautographie, dans l'aire préoptique (noyau préoptique médian, région préoptique périventriculaire, aire préoptique médiane), et l'hypothalamus (noyau arqué, VL, région périventriculaire du noyau paraventriculaire, région hypothalamique périventriculaire, noyau prémamillaire ventral). Le VL est la structure qui concentre le plus de RP. L'immunocytochimie confirme et précise cette distribution chez le cobaye (Warembourg et al., 1986 ; Blaustein et al., 1988 ; DonCarlos et al., 1989) qui est superposable à celle décrite chez le rat (Sar et Stumpf, 1973 ; Warembourg, 1978 b). Des cellules IR-RP sont observées dans la substance grise périventriculaire mésencéphalique (Turcotte et Blaustein, 1993). L'hybridation *in situ* démontre une localisation des ARNm du RP identique à celle des cellules IR-RP dans les régions d'encéphaliques précédemment citées (Romano et al., 1989 b ; Hagihara et al. 1992).

Dans l'aire préoptique et l'hypothalamus, la localisation des neurones IR-RE est identique à celle des neurones IR-RP, et il a été démontré que toutes les cellules

IR-RP possèdent des RE (Warembourg et al., 1989 ; Blaustein et Turcotte, 1989). Par contre, le septum, l'hippocampe, le noyau du lit de la strie terminale, l'amygdale et l'organe subfornical ne contiennent que des RE.

## **D – Régulation et rôles physiologiques des récepteurs stéroïdiens**

### 1) Régulation du RE

Un traitement œstrogénique tend à réduire le taux d'ARNm du RE dans l'hypothalamus médio-basal du rat femelle (Lauber et al., 1990 ; Simerly et Young, 1991) ce qui peut expliquer la diminution de l'immunoréactivité associée au RE chez le cobaye femelle après traitement œstrogénique (Warembourg et al., 1989). Par contre, le taux d'ARNm du RE dans l'hypothalamus du rat mâle n'est pas significativement modifié par l'injection d'œstrogènes (Lauber et al., 1991). L'injection de progestérone diminue spécifiquement la quantité de RE dans le noyau ventromédian du rat (Brown et MacLusky, 1994) et du singe (Bethea et al., 1996). De même, un traitement androgénique diminue le nombre de RE dans le noyau ventromédian du rat femelle (Brown et al., 1994) et le taux d'ARNm du RE dans le noyau préoptique médian et le noyau du lit de la strie terminale chez le rat mâle (Lisciotto et Morrell, 1993).

### 2) Régulation du RP

L'injection d'œstradiol pendant 5 jours consécutifs augmente significativement la quantité de RP dans l'hypothalamus du rat (Kato et Onouchi, 1977 ; Moguilewsky et Raynaud, 1977) et du cobaye (Blaustein et Feder, 1979) ovariectomisés. L'induction du RP par les œstrogènes est fonction de la dose d'œstrogènes injectée (Kato, 1978). Elle est bloquée par l'injection d'un antagoniste du RE, le CI-628 (Roy et al., 1979). Le traitement œstrogénique est donc indispensable pour détecter le RP chez des animaux ovariectomisés. L'hybridation *in situ* a confirmé l'augmentation du taux d'ARNm du RP sous l'effet des œstrogènes dans l'hypothalamus du cobaye (Bayliss et Millhorn, 1991) et du rat (Pfaff, 1989 ; Romano et al., 1989 b). Une injection de progestérone, 24 H avant le sacrifice de cobayes ovariectomisés soumis aux œstrogènes, diminue le nombre de cellules IR-RP dans l'aire préoptique et le noyau arqué (Blaustein et Turcotte, 1990), tandis que 6 H avant le sacrifice, elle

augmente le nombre de cellules IR-RP dans l'aire préoptique, le VL et le noyau arqué (DonCarlos et al., 1989). Ces effets opposés semblent résulter de la durée d'action de la progestérone.

Des différences dans le nombre de RP apparaissent entre mâles et femelles aussi bien chez le rat que chez le cobaye dans l'aire préoptique (Rainbow et al., 1982 b; Thornton et al., 1989) et l'hypothalamus médio-basal (Blaustein et al., 1980; Brown et al., 1987 a, 1996; Olster et Blaustein, 1990 a).

### 3) Rôles des récepteurs stéroïdiens

Les stéroïdes gonadiques agissent via leurs récepteurs sur la reproduction en modulant, d'une part, les fonctions neuroendocrines, et d'autre part, le comportement sexuel.

#### a) La sécrétion gonadotrope

Les stéroïdes gonadiques contrôlent l'axe hypothalamo- hypophyso-gonadique et régissent le déclenchement de l'ovulation en modulant la sécrétion d'une neurohormone, la gonadolibérine (GnRH) qui agit sur les cellules de l'adénohypophyse afin de synchroniser la libération de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) (Fig. 4).

La sécrétion de GnRH est dépendante des taux d'œstrogènes et de progestérone durant le cycle œstrien qui a une durée de 15 à 16 jours chez le cobaye (Fig. 4; Croix et Franchimont, 1975). L'élévation du taux d'œstradiol sérique au cours du proœstrus provoque l'apparition d'une pic de LH permettant l'ovulation (Fig. 4). Les mécanismes par lesquels les stéroïdes induisent la libération de GnRH ne sont pas encore tous élucidés, mais l'action des hormones gonadiques sur la GnRH semble indirecte car l'immunocytochimie a démontré l'absence de RE et de RP dans la plupart des cellules à GnRH chez le rat (Shivers et al., 1984 ; Herbison et Théodosis, 1992), le cobaye (Watson et al., 1992), la brebis (Herbison et al., 1993 ; Lehman et Karsch, 1993), le singe (Herbison et al., 1995 ; Sullivan et al., 1995) et le vison (Warembourg et al., 1998). L'action des stéroïdes sexuels sur la GnRH passerait donc par l'intermédiaire d'interneurones, bien que très récemment, la présence de cellules IR-RE $\alpha$  contenant de la GnRH ait été mise en évidence dans l'aire préoptique du rat (Butler et al., 1999).

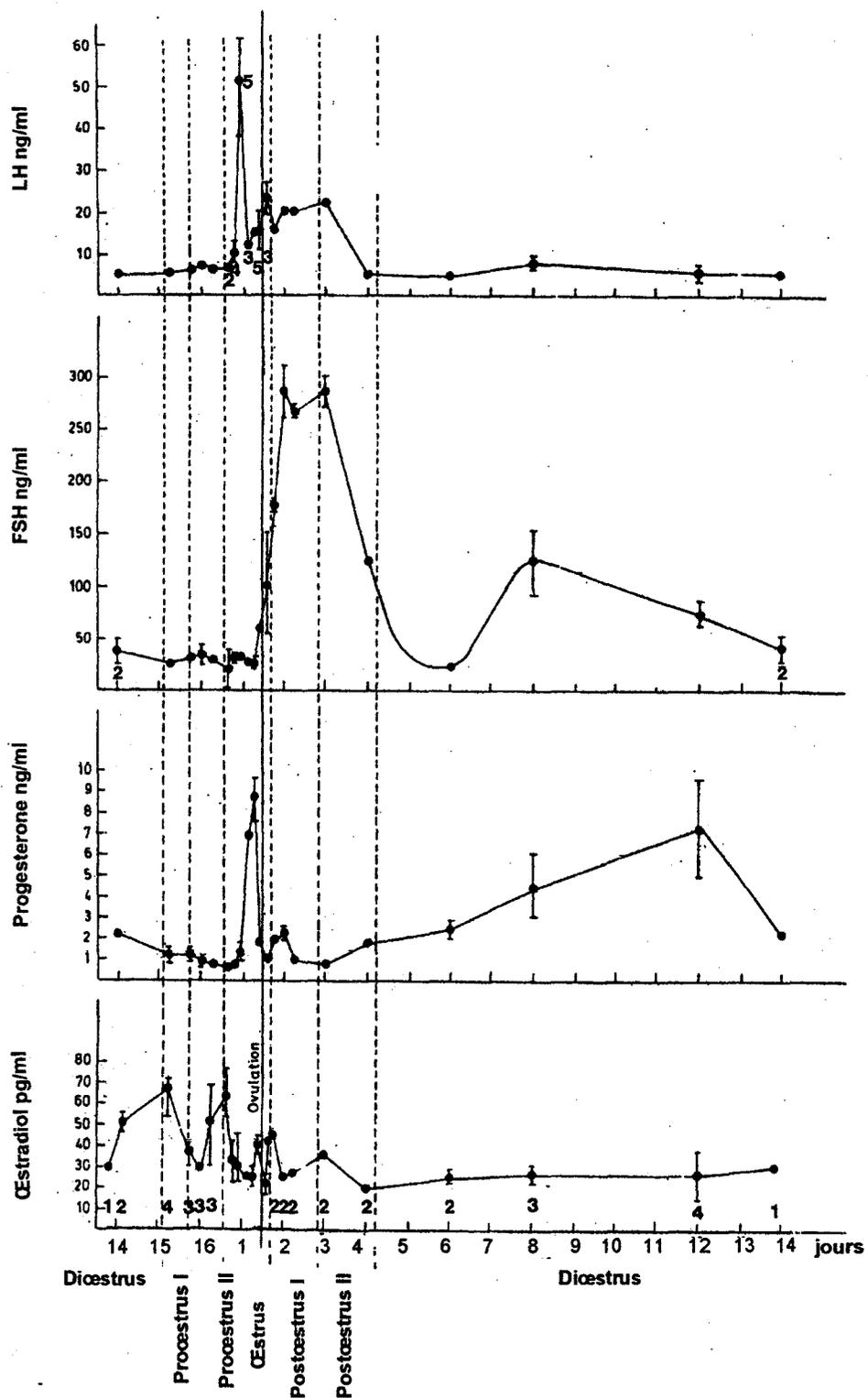


Fig. 4: Taux de LH, de FSH, de progestérone et de  $17\beta$  œstradiol sériques, chez le cobaye, au cours du cycle œstrien. D'après Croix et Franchimont, Neuroendocrinology 19 : 1-11, 1975.

## b) La réceptivité sexuelle

La réceptivité sexuelle femelle est caractérisée chez les rongeurs par le réflexe de lordose qui se traduit par une élévation du museau, une dorsiflexion et une extension des pattes postérieures. Le VL du cobaye femelle semble particulièrement impliqué dans ce comportement puisque sa lésion abolit la mise en place du réflexe (Goy et Phoenix, 1963) alors que l'implantation d'œstradiol dans le VL (Morin et Feder, 1974) induit l'apparition de la lordose. De plus, l'injection de progestérone chez des cobayes ovariectomisés ayant subi des implantations d'œstradiol dans le VL, facilite la réceptivité sexuelle en augmentant le nombre et la durée des dorsiflexions (Delville et Blaustein, 1991). Par contre, l'injection simultanée d'œstrogènes et de progestérone supprime la lordose chez le cobaye (Zucker, 1967). La progestérone possède donc un effet biphasique sur la réceptivité sexuelle, d'abord stimulateur puis inhibiteur, en fonction du temps entre son administration et celle des œstrogènes. Après la période durant laquelle la progestérone facilite le réflexe survient une période dite "réfractaire", pendant laquelle le taux des RP hypothalamiques diminue (Blaustein, 1982) aboutissant à l'altération de la lordose (Feder et Marrone, 1977 ; Morin, 1977).

Des résultats similaires sont observés chez le rat qui possède un dioestrus plus court que celui du cobaye. La lésion de l'hypothalamus ventromédian provoque en effet une suppression de la lordose (Kennedy, 1964 ; Pfaff et Sakuma, 1979 a), alors que la stimulation électrique de cette région facilite la réceptivité sexuelle (Pfaff et Sakuma, 1979 b). La lordose peut être induite par l'implantation d'œstradiol dans le VMv (Lisk, 1962 ; Barfield et Chen, 1977) et facilitée par la progestérone (Rubin et Barfield, 1983 a, b ; Mathews et Edwards, 1977). L'injection de progestérone simultanément à celle d'œstradiol, supprime la réceptivité sexuelle (Blaustein et Wade, 1977). Satou et Yamanouchi (1996) ont démontré l'existence d'un effet stimulateur ou inhibiteur de la progestérone sur la lordose en fonction du temps entre son injection et celle des œstrogènes chez des rates ovariectomisées. Ces résultats suggèrent que des analogies fonctionnelles entre les neurones du VMv et du VL, responsables de la lordose, doivent exister.

Les stéroïdes gonadiques contrôlent l'expression génique de facteurs chimiques assurant le déroulement de la lordose puisque celle-ci est bloquée par l'application intracérébrale d'inhibiteurs de la synthèse protéique (Whalen et al., 1974 ; Rainbow et al., 1982 a ; Meisel et Pfaff, 1984, 1985).

La facilitation de la lordose par la progestérone est bloquée d'une part par l'injection du RU 38486, un inhibiteur compétitif de la progestérone (Brown et al., 1987 b) et d'autre part, par l'injection intracérébroventriculaire (Mani et al., 1994 a) ou intrahypothalamique (Pollio et al., 1993 ; Ogawa et al., 1994) d'oligonucléotides antisens de l'ARNm du RP. La réceptivité sexuelle femelle est également étroitement dépendante de la présence de RE fonctionnels puisque l'injection d'un antagoniste du RE chez le rat (Powers, 1975; Arai et Gorski, 1986) et la suppression du gène du RE chez la souris (Ogawa et al., 1996), diminuent le réflexe de lordose.

Chez des rats mâles castrés, la lordose peut être induite par l'implantation d'œstradiol dans le noyau ventromédian (Davis et Barfield, 1979 ; Yamanouchi et Arai, 1985).

### **III - La somatostatine, la neurotensine et la substance P**

#### **A - La SOM**

##### 1) Le neuropeptide et ses rôles biologiques

La SOM est un peptide, appartenant à la famille des facteurs de sécrétion, qui existe sous plusieurs formes moléculaires: une forme constituée de 14 acides aminés, isolée à partir d'extraits hypothalamiques chez le mouton (Brazeau et al., 1972), une forme de 25 acides aminés (Bohlen et al., 1980) et une forme de 28 acides aminés (Praydayrol et al., 1980) qui sont des extensions N-terminale de la forme 14. L'ARNm de ces différentes formes de SOM est codé par un seul gène qui permet la synthèse d'un précurseur inactif, la préprosomatostatine (Goodman et al., 1980).

La SOM a une action inhibitrice sur la sécrétion de l'hormone de croissance (GH). Elle freine aussi la libération d'insuline et de glucagon, et la sécrétion d'amylase pancréatique (Mandarino et al., 1981). Par ailleurs, la SOM inhibe, de façon dose dépendante, la sécrétion de GnRH à partir de fragments d'hypothalamus médio-basal (Rotsztejn et al., 1982). *In vivo*, la SOM est un neuromodulateur de la neurotransmission noradrénergique (Göthert, 1980) ou dopaminergique (Chesselet et Reisine, 1983).

## 2) Localisation de la SOM dans le diencephale

Des études de dosages radioimmunologiques montrent la présence de SOM en grande concentration dans l'hypothalamus du rat (Brownstein et al., 1975 ; Kobayashi et al., 1977). Dans la plupart des études immunocytochimiques où la présence de neuropeptides est recherchée dans les péricaryons, les animaux sont traités par la colchicine, un alcaloïde qui interrompt le transport axonal en se liant à la tubuline (Alonso, 1988). Des neurones IR-SOM sont localisés dans l'aire préoptique (région périventriculaire, noyau suprachiasmatique) et dans l'hypothalamus (région périventriculaire, aire hypothalamique antérieure, noyau paraventriculaire, étendue rostro-caudale du noyau arqué, VMvl, noyau dorsomédian, aire hypothalamique latérale) du rat colchicinisé (Finley et al., 1981 ; Kawano et al., 1982 ; Johansson et al., 1984 ; Vincent et al., 1985). Cette localisation est confirmée par hybridation *in situ* (Fitzpatrick-McElligott et al., 1988). Seule, la distribution immunocytochimique des fibres IR-SOM est rapportée dans l'hypothalamus chez le cobaye (Hökfelt et al., 1974).

## 3) Stéroïdes gonadiques et SOM

La gonadectomie diminue le taux d'ARNm de la SOM dans l'hypothalamus des rats mâles (Murray et al., 1999) et des rats femelles (Werner et al., 1988 ; Baldino et al., 1988 ; Chowen-Breed et al., 1989 ; Zorilla et al., 1990) en particulier dans les noyaux périventriculaire et ventromédian tandis qu'un traitement par l'œstradiol (Baldino et al., 1988 ; Senaris et al., 1992) ou par la testostérone (Werner et al., 1988 ; Zorilla et al., 1990) l'augmente. Ces travaux montrent que la synthèse de SOM est sous la dépendance des stéroïdes sexuels qui exercent une action ciblée sur des systèmes neuronaux spécifiques. Les techniques de doubles marquages immunocytochimiques révèlent d'ailleurs la coexistence de la SOM avec le récepteur des androgènes, chez le rat, dans la région périventriculaire hypothalamique (Bingaman et al., 1994 ; Huang et Harlan, 1994 ; Herbison, 1995), ou avec le RE dans des neurones du noyau du lit de la strie terminale (Herbison et Theodosis, 1993) et du VMvl (Herbison, 1994).

## **B – La NT**

### 1) Le neuropeptide et ses rôles biologiques

L'ARN de la NT code un peptide de 13 acides aminés (Kislauskis et al., 1988), isolé à partir de l'hypothalamus du bovin (Carraway et Leeman, 1973). La NT module la sécrétion de différents neuropeptides parmi lesquels la SOM (Sheppard et al., 1979 ; Robbins et Landon, 1985) et la thyrolibérine (Sheppard et al., 1983). Concernant la fonction de reproduction, la NT semble stimuler au niveau de l'aire préoptique l'apparition du pic pré-ovulatoire de LH chez le rat (Alexander et al., 1989 b). Des appositions de boutons terminaux à NT ont été observés au contact de cellules à GnRH (Hoffman, 1985). Par ailleurs, la NT provoque une hypotension (Rioux et al., 1981), une hypothermie (Kalivas et al., 1985), induit l'analgésie (Nemeroff et al., 1979) et la relaxation musculaire (Osbaahr et al., 1979), et diminue la prise alimentaire (Beck et al., 1995) et l'activité locomotrice (Kalivas et al., 1982).

### 2) Localisation dans le diencephale

Des cellules IR-NT sont détectées dans l'aire préoptique (région périventriculaire, noyau préoptique médian) et dans l'hypothalamus (région périventriculaire, noyau paraventriculaire, aire hypothalamique latérale, région périfornicale, noyau arqué, VL) chez le cobaye traité par la colchicine (Warembourg et Jolivet, 1994). Kobayashi et al. (1977) démontrent, au moyen de dosages biochimiques, la présence de NT dans les mêmes structures chez le rat, alors que ni la présence de cellules IR-NT (Uhl et al., 1979 ; Kahn et al., 1980 ; Jennes et al., 1982) ni celle d'ARNm de la NT (Alexander et al., 1989 c) ne sont détectées dans le VMvl.

### 3) Stéroïdes gonadiques et NT

Un traitement par les œstrogènes augmente la quantité d'ARNm de la NT/neuromédine dans l'aire préoptique (Alexander et al., 1989 a ; Alexander et Leeman, 1994) et dans la subdivision dorso-médiane du noyau arqué (Alexander, 1993) chez le rat femelle. Par contre, le même traitement n'induit aucune augmentation dans l'aire préoptique chez des rats mâles (Alexander et Leeman, 1992). L'action des stéroïdes gonadiques sur les cellules à NT semble directe

puisque ce neuropeptide coexiste avec le RE dans des neurones de l'aire préoptique rostrale du rat (Herbison et Theodosios, 1991 ; Axelson et al., 1992) ou avec le RP dans des cellules du VL et dans quelques neurones du noyau arqué du cobaye femelle (Warembourg et Jolivet, 1994).

## **C – La SP**

### 1) Le neuropeptide et son action sur la fonction de reproduction

La SP est un peptide de 11 acides aminés, isolé à partir du cerveau du cheval (Von Euler et Gaddum, 1931), qui provient d'un précurseur, la préprotachykinine (PPT; Krause et al., 1987). Elle exerce une influence importante sur la fonction de reproduction chez la femelle, d'une part, en stimulant la lordose chez le cobaye (Blaustein et al., 1991) et chez le rat (Dornan et al., 1987), et d'autre part, en agissant selon le contexte stéroïdien sur l'axe gonadotrope via une modulation de la sécrétion de GnRH (Vijayan et McCann, 1979 ; Arisawa et al., 1990), de LH (Duval et al., 1996) et de FSH (Duval et al., 1998). Des contacts ont été mis en évidence entre les terminaisons à SP et les cellules à GnRH (Hoffman, 1985). L'administration intracarotidienne de SP stimule la libération de GnRH chez le rat mâle (Walczewska et al., 1998).

### 2) Localisation dans le diencéphale

Des techniques radioimmunologiques (Powell et al., 1973 ; Brownstein et al., 1976 ; Cuello et al., 1978) ont permis de déceler la présence de SP dans l'aire préoptique et l'hypothalamus du rat. Les cellules IR-SP sont mises en évidence dans l'aire préoptique (noyau préoptique médian, aire préoptique latérale) et dans l'hypothalamus (VL, région périfornicale, noyau dorsomédian, noyau prémamillaire ventral) chez le cobaye traité par la colchicine (Gallagher et al., 1992). Elles sont détectées dans les mêmes régions chez le rat (Cuello et al., 1978, 1985 ; Ljungdahl et al., 1978). Alors que dans le noyau arqué chez le rat, l'immunocytochimie ne montre pas de corps cellulaires à SP, l'hybridation *in situ* révèle la présence de l'ARNm de la PPT (Romano et al., 1989 a).

### 3) Stéroïdes gonadiques et SP

Si certains travaux ne montrent pas d'effet significatif d'un traitement œstrogénique sur la synthèse de la PPT dans l'hypothalamus chez des rats ovariectomisés (Romano et al., 1989 a), d'autres études mettent en évidence une augmentation du nombre de cellules IR-SP (Akesson, 1994) ou de l'ARNm de la PPT (Brown et al., 1990 ; Priest et al., 1995). La castration réduit le nombre de cellules à SP dans l'aire préoptique chez le hamster mâle ; cette diminution est supprimée par un traitement androgénique (Swann et Newman, 1992). La synthèse de SP semble sous l'action directe des stéroïdes gonadiques puisque la SP coexiste avec le RP dans des neurones du VL du cobaye (Nielsen et Blaustein, 1990 ; Olster et Blaustein, 1992 a, b), et du noyau arqué du singe (Bethea et Widmann, 1996), et avec le RE dans des cellules de l'aire préoptique (Okamura et al., 1994 a) et de l'hypothalamus médio-basal (Akesson et Micevych, 1988) du rat.

## **IV - Le monoxyde d'azote, un messager intercellulaire**

### **A – Les NOS**

Le NO et la L-citrulline sont co-synthétisés à partir d'un substrat, la L-arginine, via l'action d'une enzyme, la NOS (Moncada et Higgs, 1993 ; Dawson et Snyder, 1994). Trois types de NOS ont été isolés : la NOS neuronale (Bredt et Snyder, 1990), la NOS des macrophages (Lowenstein et al., 1992) et la NOS endothéliale (Lamas et al., 1992). Les gènes codant pour ces trois enzymes sont situés sur des chromosomes différents chez l'homme (Marsden et al., 1993, 1994 ; Fujisawa et al., 1994). L'activité des NOS neuronale et endothéliale exprimées de façon constitutive, est dépendante de la présence intracellulaire de calcium, alors que l'activité de la NOS des macrophages, qui est inductible, est indépendante du calcium. Les NOS nécessitent la présence de plusieurs cofacteurs parmi lesquels le nicotinamide-adenosine-dinucléotide phosphate (NADPH) pour être complètement actives et permettre la formation du NO (Dawson et Snyder, 1994). En tant que messager gazeux, le NO peut agir par voie autocrine et par voie paracrine dans de nombreuses régulations, parmi lesquelles la régulation de la défense immunologique (Moilanen et Vapaatalo, 1995), de la vasodilatation (Ignarro et al., 1987), des sécrétions endocrines (Southern et al., 1990 ; Kato, 1992), et de la neurotransmission cérébrale

(Bredt et al., 1990; Dawson et Snyder, 1994 ; Schuman et Madison, 1994). L'action du NO s'effectue par l'intermédiaire d'une enzyme, la guanylate cyclase, qui produit de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc ; Garthwaite et al., 1988 ; Bredt et Snyder, 1989 ; Knowles et al., 1989).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés exclusivement à la NOS neuronale, qui est la NOS la plus synthétisée dans l'hypothalamus du rat (Bhat et al., 1996).

## **B – Localisation de la NOS neuronale**

La présence de NOS est mise en évidence à la fois dans le péricaryon et dans les terminaisons axonales (McCann et Rettori, 1996). L'activité NADPH diaphorase (NADPHd) constitue un marqueur histochimique des neurones produisant le NO (Dawson et al., 1991 ; Hope et al., 1991). Les cellules NADPHd positives sont observées chez le cobaye (Warembourg et al., 1999) dans le télencéphale (bandelettes diagonales de Broca, noyau du lit de la strie terminale), dans l'aire préoptique (noyau supraoptique, noyau préoptique médian, aire préoptique médiane, noyau suprachiasmatique), et dans l'hypothalamus médio-basal (noyau paraventriculaire, aires hypothalamiques antérieure et latérale, région périphérique du noyau ventromédian, VL, noyau dorsomédian, subdivision postérieure du noyau arqué, noyau prémamillaire ventral, noyau paramamillaire) mais aucune cellule NADPHd n'est mise en évidence dans les deux tiers antérieurs du noyau arqué. Dans ces régions, toutes les cellules NADPHd positives sont IR-NOS. Chez le rat, les cellules NADPHd positives sont trouvées dans les mêmes régions cérébrales, à l'exception du noyau supraoptique où les cellules sont plus nombreuses (Bredt et al., 1991 ; Vincent et Kimura, 1992).

## **C – Influence du NO sur les fonctions neuroendocrines et la lordose**

Le NO, libéré par les cellules IR-NOS, stimule la sécrétion d'une grande variété de neuromodulateurs tels que la SOM (Aguila, 1994 ; Rettori et al., 1994 a), la corticolibérine (CRH ; Karanth et al., 1993 ; Costa et al., 1993), la GH et la somatolibérine (GHRH ; Rettori et al., 1994 a), et la GnRH (Moretto et al., 1993 ; Rettori et al., 1993, 1994 b ; Lopez et al., 1997). Il peut aussi avoir un rôle inhibiteur

dans certaines conditions physiologiques puisque l'injection intracérébroventriculaire d'un inhibiteur de la NOS augmente la libération d'ocytocine chez des rats déshydratés (Summy-Long et al., 1993).

Les neurones IR-GnRH et IR-NOS de l'aire préoptique sont souvent proches les uns des autres mais aucune coexistence n'est mise en évidence (Grossman et al., 1994 ; Bhat et al., 1995 ; Herbison et al., 1996). Dans cette région, la synthèse de NO est stéroïdo-dépendante (Pu et al., 1996) et des RE sont présents dans des cellules IR-NOS neuronale (Okamura et al., 1994 b). De plus, l'injection d'inhibiteurs de la NOS atténue le pic de LH induit par les stéroïdes (Bonavera et al., 1993). Ces données suggèrent que le NO synthétisé par les neurones de l'aire préoptique, cibles des stéroïdes sexuels, stimule la sécrétion de GnRH au niveau du péricaryon. L'injection d'oligonucléotides anti-NOS, spécifiques de chacune des trois formes de l'enzyme, a permis de montrer que la sécrétion de LH est sous l'influence du NO synthétisé non seulement par la NOS neuronale mais aussi par la NOS endothéliale (Aguan et al., 1996). Prevot et al. (1999) ont montré que le NO produit par la NOS endothéliale au niveau de l'éminence médiane, intervient dans la libération de la GnRH dans les capillaires du système porte hypophysaire.

Les œstrogènes augmentent le taux d'ARNm de la NOS dans le VMvl chez des rats femelles ovariectomisés (Ceccatelli et al., 1996 ; Rachman et al., 1998). La coexistence du RP avec la NOS est observée dans l'aire préoptique et dans le VL du cobaye (Warembourg et al., 1999) et l'activité NADPHd est trouvée dans des neurones IR-RE du VMvl du rat (Okamura et al., 1994 c). Ces données bibliographiques montrent l'importance des stéroïdes gonadiques sur l'activité NOS, notamment au niveau du VL et du VMvl, où le NO est impliqué dans la lordose facilitée par la progestérone (Mani et al., 1994 b, Chu et Etgen, 1997). Le NO intervient également dans la régulation du comportement sexuel chez la souris mâle (Nelson et al., 1995) et la coexistence de la NOS avec le récepteur des androgènes est aussi trouvée dans le noyau prémamillaire chez le rat (Yokosuka et Hayashi, 1996).

# **OBJECTIFS**

## OBJECTIFS

Les données bibliographiques prouvent l'importance du VL dans la régulation des fonctions de reproduction et en particulier dans la réceptivité sexuelle par : 1) son contenu en récepteurs stéroïdiens ; 2) ses relations réciproques établies avec l'aire préoptique, où sont localisées les cellules à GnRH, et avec le mésencéphale ; et 3) l'existence de populations neuropeptidergiques et NOergique susceptibles d'intervenir dans la modulation du réflexe de lordose.

L'identification et la caractérisation d'une population neuronale distincte au sein d'une structure du système nerveux central, à partir de l'étude de ses efférences nerveuses et de son contenu immunocytochimique, permet d'accéder aux bases nécessaires pour appréhender son intervention dans certains phénomènes physiologiques ou comportementaux.

La distribution hypothalamique des cellules IR-RP chez le cobaye mâle n'ayant jamais été précisée, nous l'avons déterminée et comparée à celle de la femelle.

La SOM, est un peptide susceptible d'intervenir dans la réceptivité sexuelle. La localisation des cellules à SOM n'étant pas connue dans le cerveau du cobaye, nous avons ensuite réalisé une double réaction immunocytochimique afin, d'une part, de déterminer la topographie des cellules IR-SOM, et d'autre part, de montrer une coexistence éventuelle entre la SOM et le RP. Les projections vers le mésencéphale des cellules IR-RP/SOM, mises en évidence dans le VL, ont ensuite été examinées au moyen d'un double marquage immunofluorescent associé à une technique de transport axonal rétrograde.

L'existence de cellules IR-RP/SP et IR-RP/NT ayant été rapportée dans le VL, nous avons déterminé si les cellules IR-RP/SOM, IR-RP/NT et IR-RP/SP du VL appartiennent à des populations distinctes, ou si les cellules IR-RP peuvent synthétiser à la fois de la SOM, de la NT et de la SP, à l'aide de triples marquages immunofluorescents faisant appel à la technique d'élution.

Comme il a été montré, en particulier chez le rat, que les œstrogènes influencent la synthèse de SOM, de NT et de SP dans des systèmes neuronaux spécifiques, il nous a semblé nécessaire d'étudier l'influence du traitement

œstrogénique, qui permet l'induction du RP, sur l'immunoréactivité de la SOM, de la NT et de la SP chez le cobaye femelle.

La présence d'une population IR-RP/NOS a récemment été mise en évidence dans le VL, aussi nous avons recherché la présence de NOS dans les cellules IR-RP du VL contenant un des trois neuropeptides précédemment étudiés au moyen d'un triple marquage immunofluorescent.

Afin de permettre la visualisation simultanée du RP et des neuropeptides, les animaux doivent être traités par les œstrogènes et par la colchicine, ce qui nous a amené à examiner les effets de ces substances sur l'activité NADPHd et sur la coexistence du RP avec la NOS dans le VL.

# **MATERIEL ET METHODES**

# MATERIEL ET METHODES

## I - Animaux et traitements

### A – Animaux

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur un total de 238 cobayes albinos (19 mâles et 219 femelles), pesant de 400 à 450 g, provenant de l'élevage CEGAV (Saint Mars d'Egrenne, France). Par souci de clarté et de précision, nous avons choisi de spécifier le nombre d'animaux expérimentaux dans les résultats en début de paragraphe, pour chaque recherche effectuée. Les animaux sont soumis à un rythme de 14 H de lumière, 10 H d'obscurité, et ont libre accès à la boisson et à la nourriture. Toutes les expérimentations sont réalisées suivant les directives de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

### B – Traitements

Avant toute expérimentation, les animaux sont anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange constitué de xylazine (Rompun, Bayer, 40 mg/kg) et de kétamine (Kétalar 50, Parke Davis, 8 mg/kg). Lors du sacrifice des animaux, ces doses d'anesthésique sont doublées.

Afin d'éliminer la production endogène de stéroïdes sexuels, les animaux sont gonadectomisés (GDX) après incision cutanée bilatérale, 12 à 15 jours avant leur sacrifice. A l'exception de 13 femelles et d'un mâle qui ont servi d'animaux témoins, l'ensemble des cobayes subit l'ablation des gonades.

Dans la plupart des expériences mettant en évidence le RP, les animaux GDX reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de 15 µg de 3-benzoate  $\beta$ -œstradiol (EB; Sigma, St Louis, Mo, USA) dissous dans 0,3 ml d'huile de sésame, pendant les 5 jours précédant le sacrifice. L'EB a pour effet d'induire la synthèse du récepteur et ainsi de permettre sa visualisation par immunocytochimie. Lorsque la durée du traitement est différente, le nombre de jours est précisé dans les résultats. Les animaux témoins (GDX+huile) sont des cobayes GDX qui reçoivent un traitement équivalent en huile de sésame mais sans EB.

Afin d'obtenir une localisation neuronale cytoplasmique des neuropeptides, les animaux reçoivent 40 µg de colchicine (Sigma) dans 8 µl de sérum physiologique, 25 H avant le sacrifice, par injection unilatérale dans le ventricule latéral suivant les coordonnées stéréotaxiques de l'atlas de Poulain (1974) :

- sens antéro-postérieur : 11,8 mm en avant de l'axe interauriculaire.
- sens latéral : 1,7 - 1,8 mm à partir du plan sagittal séparant les deux hémisphères cérébraux
- profondeur : 3 - 3,5 mm sous la surface du cerveau évaluée à partir de la dure mère.

## **II - Préparation du tissu et réalisation des sections**

### **A – Fixation et dissection**

Le tissu cérébral est fixé par perfusion intracardiaque. L'animal est maintenu en décubitus dorsal. Après dissection de la cage thoracique, une canule reliée à une pompe péristaltique (Cole-Parmer Instrument Co, Chicago, IL, USA) est introduite dans l'aorte ascendante. Le passage d'environ 100 ml de sérum physiologique (NaCl 0,9 %) hépariné permet d'éliminer le sang des vaisseaux. Six cents ml d'un mélange de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 contenant 4 % de paraformaldéhyde et 15 % d'acide picrique saturé à 4° C sont ensuite injectés pendant environ 35 min. L'animal est décapité et le cerveau est délicatement disséqué. Les régions cérébrales correspondant à l'aire préoptique, l'hypothalamus médio-basal ou le mésencéphale sont prélevées.

### **B – Post-fixation, cryoprotection et congélation du tissu**

Les pièces de tissu sont post-fixées 4 à 6 H à 4° C dans le même fixateur puis immergées dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,4 contenant 15 % de saccharose, pendant une nuit à 4° C, afin d'assurer la cryoprotection. Elles sont ensuite incluses dans du Tissue Tek (O.C.T. Compound, Miles Inc, Elkhart, IN, USA) et congelées par immersion dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Après congélation, elles peuvent être stockées à – 80° C jusqu'à leur utilisation ou immédiatement sectionnées.

## **C – Réalisation des sections**

### 1) Coupes au cryostat

A l'exception des prélèvements contenant l'aire préoptique et l'hypothalamus de 36 cobayes et de tous les prélèvements mésencéphaliques, le tissu cérébral est débité en coupes frontales de 16  $\mu\text{m}$  d'épaisseur au moyen d'un cryostat (2800 Frigocut E, Reichert-Jung) à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les coupes sériées sont récupérées sur des lames gélatinées (10 g/l de gélatine pulvérisée ; 1 g/l d'alun de chrome). Elles sont ensuite incubées ou stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Ces coupes sont utilisées pour toutes les techniques immunocytochimiques exposées dans le paragraphe III et pour l'histochimie NADPHd décrite dans le paragraphe V.

### 2) Coupes au microtome à congélation

Les prélèvements diencéphaliques (36), non découpés au cryostat, et mésencéphaliques, sont fixés à l'aide de Tissue Tek sur la platine d'un microtome à congélation à glissière (Kryomat 1700, Leitz). Des coupes frontales de 60  $\mu\text{m}$  sont réalisées à travers l'étendue rostro-caudale du diencéphale ou du mésencéphale. Toutes les sections sont recueillies dans du tampon phosphate salin 0,01M pH 7,4 (PBS). Les coupes mésencéphaliques sont étalées sur des lames gélatinées et mises à sécher à l'obscurité, tandis que les autres sections subissent l'histochimie NADPHd (paragraphe V).

## **III - Techniques immunocytochimiques**

Toutes les expériences décrites dans ce chapitre sont réalisées sur des coupes au cryostat.

## A – Immunsérums

### 1) Anticorps primaires

Les caractéristiques (origine, provenance et dilution) des anticorps primaires utilisés sont présentées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés dans nos études**

Anticorps primaires	Origine	Provenance	Dilution utilisée
anti-RP (let 126)	souris	INSERM U 135, Le Kremlin-Bicêtre (Pr. Milgrom)	1,5 µg/ml
anti-SOM (IHC 8001)	lapin	Peninsula (Belmont, CA, USA)	1 : 750
anti-NT (IHC 7351)	lapin	Peninsula	1 : 400
anti-SP (AB 1977)	lapin	Chemicon (Temecula, CA, USA)	1 : 400
anti-NOS (AB 1529)	mouton	Chemicon	1 : 1500

L'anticorps anti-RP utilisé est un anticorps monoclonal gracieusement fourni par l'équipe du Pr. Milgrom (INSERM U 135, Le Kremlin-Bicêtre). Les caractéristiques et spécificités de cet anticorps ont été précédemment publiées (Logeat et al., 1983, 1985 ; Loosfelt et al., 1984 ; Lorenzo et al., 1988). Les anticorps anti-neuropeptides et anti-NOS utilisés sont des anticorps polyclonaux commerciaux. Les caractéristiques et spécificités des anticorps anti-neuropeptides sont précisées sur les fiches techniques des fournisseurs ; celles de l'anticorps anti-NOS ont été déterminées par Anderson et al. (1995).

### 2) Anticorps secondaires

Les caractéristiques (origine, provenance et dilution) des anticorps secondaires et des systèmes d'amplification utilisés sont exposées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Anticorps secondaires et systèmes d'amplification**

Anticorps secondaires et systèmes d'amplification	Origine	Provenance	Dilution utilisée
Ig anti-souris biotinylées	mouton	Amersham (Les Ulis, France)	1 : 200
	âne	Jackson (West Grove, PA, USA)	1 : 200
Ig anti-souris	lapin	Dako (Trappes, France)	1 : 80
Ig anti-lapin liées à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC)	âne	Amersham	1 : 50
Ig anti-lapin liées à l'acide alpha-méthyl coumarique (AMCA)	âne	Jackson	1 : 200
Ig anti-lapin biotinylées	âne	Amersham	1 : 200
Ig anti-mouton liées au FITC	âne	Jackson	1 : 200
Streptavidine-peroxydase		Amersham	1 : 100
Streptavidine Texas red		Amersham/Jackson	1 : 200
Système peroxydase-anti peroxydase	souris	Dako	1 : 80

## **B – Etapes communes à toutes les réactions immunocytochimiques**

Les lames sont décongelées à température ambiante (TA) pendant environ 30 min avant la première incubation. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS contenant 0,3 % de Triton X100, et les anticorps secondaires sont dilués dans du PBS. Les incubations sont réalisées à 4°C en atmosphère humide.

Lors des simples marquages immunocytochimiques, 10 % de sérum pré-immun de l'espèce ayant produit l'anticorps secondaire sont ajoutés au mélange de PBS contenant l'anticorps primaire pour saturer les sites de liaison non-spécifiques.

Pour les doubles marquages immunocytochimiques, un mélange de PBS contenant 10 % de sérum normal de mouton et 10 % de sérum normal d'âne est déposé pendant 30 min à TA, avant l'incubation des anticorps primaires, afin d'atténuer le marquage non-spécifique.

Entre chaque incubation, les sections sont rincées dans du PBS (3 bains de 10 min).

## **C – Simples réactions immunocytochimiques**

### 1) Détection du RP

Les sections sont incubées dans l'anticorps anti-RP pendant environ 72 H. Elles sont ensuite incubées dans des Ig de mouton anti-souris biotinylées pendant 1 H à TA, puis dans la streptavidine liée à la peroxydase pendant 1 H à TA. L'immunoréactivité associée au RP est révélée avec la diaminobenzidine (DAB ; Sigma) intensifiée au nickel imidazole. Pour cela, les sections lavées dans du tampon acétate imidazole (175mM d'acétate de sodium, 10mM d'imidazole, pH 7,2) pendant 10 min, sont laissées dans une solution chromogène (125mM d'acétate de sodium, 100mM de sulfate de nickel, 10mM d'imidazole, pH 6,2), contenant 0,05 % de DAB et 0,033 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 10 à 15 min à TA. La réaction est ensuite arrêtée dans le tampon acétate imidazole, les coupes sont déshydratées et montées dans de l'Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Allemagne).

### 2) Détection des neuropeptides (SOM, NT ou SP)

Les sections sont incubées avec l'anticorps anti-SOM, anti-NT ou anti-SP (cf Tableau 1) pendant environ 72 H. L'immunoréactivité neuropeptidergique est mise en évidence en laissant les sections dans des Ig d'âne anti-lapin liées au FITC 1 H à 4° C. Les coupes sont recouvertes d'une lamelle avec un mélange de glycérol à 98 %/PBS (3 v : 1 v) contenant 0,1 % de p-phenylènediamine pour diminuer le " fading " lors de l'observation.

## **D – Détection du RP et de la SOM**

Les sections sont incubées avec l'anticorps anti-RP et l'anticorps anti-SOM (cf Tableau 1) pendant 72 H. Les immunoréactivités sont détectées par incubation des coupes dans des Ig d'âne anti-lapin liées au FITC pendant 1 H à 4°C, puis dans des Ig de mouton anti-souris biotinylées pendant 1 H 30 à 4°C suivies par la streptavidine

liée au Texas red pendant 1 H à 4° C. Les sections sont montées comme précédemment.

## **E – Triples réactions immunocytochimiques**

### 1) Marquage du RP et de deux neuropeptides, nécessitant l'utilisation d'une élution

La mise en évidence de plusieurs antigènes différents dans une même structure par des réactions immunocytochimiques successives utilisant des anticorps primaires produits dans la même espèce, donne lieu à des réactions croisées entre les différents anticorps secondaires qui rendent impossible l'interprétation des marquages. Il faut donc supprimer le complexe immunologique précédemment formé entre les marquages successifs. Dans nos expériences, le RP et un premier neuropeptide sont mis en évidence, puis les résultats sont photographiés. Les coupes subissent alors le traitement d'élution des anticorps fixés et une troisième réaction immunocytochimique est effectuée pour révéler le second neuropeptide.

Quatre séries d'expériences ont été entreprises permettant la détection des cellules IR-RP/SOM/NT, IR-RP/NT/SOM, IR-RP/SP/SOM et IR-RP/SP/NT.

#### a) Détection des cellules IR-RP/SOM/NT

Les sections sont incubées dans l'anticorps anti-RP et l'anticorps anti-SOM pendant 72 H. Les immunoréactivités sont mises en évidence comme au paragraphe D. Les cellules IR-RP, IR-SOM et IR-RP/SOM sont comptées sous le microscope. Les régions contenant des cellules doublement IR sont photographiées. Après observation et photographie, les lamelles sont délicatement retirées des préparations par passage dans du PBS et les lames sont trempées dans une solution de permanganate de potassium et d'acide sulfurique selon la méthode décrite par Tramu et al. (1978) pendant 90 sec à TA. L'élimination complète des immunoréactivités RP et SOM précédemment détectées est vérifiée par passage des sections dans du PBS contenant 10 % de sérum normal de lapin et 10 % de sérum normal de souris à TA, puis, dans les anticorps secondaires suivis par la streptavidine liée au Texas red comme il est décrit au paragraphe D. Les sections sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-NT pendant 48 H. Les cellules IR-NT sont

détectées après incubation des coupes dans des Ig anti-lapin liées au FITC pendant 1 H 30.

#### b) Détection des cellules IR-RP/NT/SOM

Les sections sont traitées selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent, mais dans la première étape, l'anticorps anti-SOM est remplacé par l'anticorps anti-NT, et dans la deuxième, l'anticorps anti-NT est remplacé par l'anticorps anti-SOM.

#### c) Détection des cellules IR-RP/SP/SOM

Les immunoréactivités RP et SP sont détectées comme précédemment (paragraphe a). Après élution, les sections sont incubées avec l'anticorps anti-SOM.

#### d) Détection des cellules IR-RP/SP/NT

De la même façon, le RP et la SP sont d'abord détectés par double immunofluorescence, puis la présence de NT est recherchée après élution.

### 2) Marquage simultané du RP, de la NOS et de l'un des 3 neuropeptides précédemment étudiés.

Les anticorps primaires provenant d'espèces différentes (souris, lapin, mouton) sont révélés par des anticorps secondaires réalisés chez l'âne et liés à des fluorochromes différents.

#### a) Détection des cellules IR-RP/NOS/SOM

Des sections sont incubées dans un mélange contenant les anticorps anti-RP, anti-NOS et anti-SOM (Tableau 1) pendant 72 H. Les immunoréactivités sont révélées comme suit : les sections sont incubées à 4° C dans des Ig d'âne anti-mouton liées au FITC pendant 1 H 30, dans des Ig d'âne anti-lapin liées à l'AMCA pendant 1 H 30, dans des Ig d'âne anti-souris biotinylées pendant 1 H 30 et dans la streptavidine liée au Texas red pendant 1 H (cf Tableau 2). Les sections sont montées dans le milieu glycérolé contenant le p-phenylènediamine.

#### b) Détection des cellules IR-RP/NOS/NT

Les coupes sont traitées comme précédemment, mais l'anticorps anti-SOM est remplacé par l'anticorps anti-NT.

#### c) Détection des cellules IR-RP/NOS/SP

Les coupes subissent le même traitement qu'au paragraphe ci-dessus, mais l'anticorps anti-SOM est remplacé par l'anticorps anti-SP.

### **F - Contrôles de la spécificité des réactions immunocytochimiques**

Pour vérifier la spécificité de la réaction, nous avons réalisé des expériences dans lesquelles nous avons :

- 1- Remplacé l'anticorps primaire anti-RP par de l'anticorps anti-RP préabsorbé avec le RP hautement purifié (Warembourg et al., 1986).
- 2- Remplacé chaque anticorps primaire anti-neuropeptide par de l'anticorps préabsorbé par un excès du neuropeptide synthétique (concentration supérieure à  $10^{-3}M$ ) pendant au moins 12 H.
- 3- Omis les anticorps primaires ou les avons remplacé par du sérum pré-immun de souris, de lapin ou d'âne.
- 4- Utilisé des anticorps secondaires dirigés contre des espèces inappropriées.

Dans ces conditions, aucun marquage immunocytochimique n'est obtenu.

L'absence de réaction croisée entre les anticorps primaires lors des triples marquages immunocytochimiques est vérifiée en adsorbant chaque anticorps anti-neuropeptide par un excès des deux autres neuropeptides recherchés dans l'étude. Ainsi, l'anticorps anti-SOM est préadsorbé par une concentration saturante de NT et de SP synthétiques (concentration supérieure à  $10^{-3}M$ ). Les autres anti-neuropeptides sont saturés de façon identique.

## **IV - Technique de traçage axonal rétrograde**

### **A – Stéréotaxie**

Notre objectif était d'obtenir une injection du traceur dans la région latérale de la substance grise périventriculaire mésencéphalique (SGPM) et plus précisément au niveau médian de son extension rostro-caudale. Comme aucun atlas stéréotaxique du mésencéphale du cobaye de 400 à 450 g n'a été publié nous avons dû, pour atteindre cette région, effectuer de nombreux essais d'injection en procédant par approches successives. Lorsque le traceur se situe dans la région de la SGPM souhaitée, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes :

- 4,7 – 4,8 mm en avant de l'axe inter-auriculaire.
- 1 mm latéralement à partir de l'axe sagittal séparant les 2 hémisphères cérébraux.
- 6,5 mm sous la surface du cerveau appréciée au niveau de la dure mère.

### **B – Traceurs axonaux fluorescents**

Trois traceurs axonaux à transport rétrograde sont utilisés : le FG (Schmued et Fallon, 1986), le true blue (TB) et les billes de latex liées à la fluoresceine (BV ; Katz et al., 1984). Le FG (Fluorochrome, Inc., Englewood, Co, USA) présente une fluorescence blanche-bleue, le TB (Sigma) émet une fluorescence d'un bleu intense, et les billes de latex (Lumafluor Naples, FL, USA) émettent une fluorescence verte.

### **C – Mode d'injection du traceur**

#### 1) Injection par microélectroiontophorèse

Les microélectrodes sont réalisées à l'aide d'une étireuse verticale (Narishige Scientific Instrument Laboratory) à partir de tubes de verre de 2 mm de diamètre externe. Elles sont recassées sous loupe binoculaire de façon à obtenir un diamètre de 40 à 60  $\mu\text{m}$  à la pointe et remplies au moyen d'une seringue Hamilton avec le FG (5 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1M) qui est injecté dans la SGPM par passage d'un courant de 5  $\mu\text{A}$  appliqué pendant 4 sec toutes les 8 sec, et cela

pendant environ 5 min (stimulateur isolé A 360, WPI). Un essai d'injection du TB (3 % dans de l'eau stérile) par iontophorèse est également réalisé. Après injection, la microélectrode de verre est laissée en place environ 10 min pour éviter l'éjection du traceur.

## 2) Injection par pression

Un  $\mu\text{l}$  contenant soit le FG à 5 %, soit le TB à 3 %, soit les BV est injecté au moyen d'une seringue Hamilton de 5  $\mu\text{l}$  par pressions successives.

Le temps de survie des animaux est de 6 jours.

## **D – Coloration du site d'injection du traceur**

Les coupes de mésencéphale (60 $\mu\text{m}$ ), obtenues au microtome à congélation, sont observées sous le microscope et photographiées après séchage sur des lames gélatinées. Elles sont ensuite colorées au bleu de méthylène à 0,05 % (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA) pendant 10 min, déshydratées et montées au DEPEX (Gurr®, BDH Laboratories supplies Poole, England).

## **E – Détection des cellules IR – RP/SOM se projetant vers la SGPM**

Les hypothalamus sont débités au cryostat en coupes de 16  $\mu\text{m}$  seulement quand le site d'injection est restreint à la SGPM.

### 1) Détection des cellules TB/RP/SOM et FG/RP/SOM

Après montage dans du PBS, les sections contenant le VL sont observées. Les régions montrant des cellules marquées par du TB ou du FG sont photographiées. Les lamelles sont alors délicatement retirées des préparations puis le RP et la SOM sont mis en évidence par immunofluorescence. Les champs microscopiques, correspondant aux photographies précédentes, sont recherchés et à nouveau photographiés.

## 2) Détection des cellules BV/SOM/RP

Les sections sont incubées pendant 48 H avec l'anticorps anti-SOM. La SOM est détectée en incubant les coupes avec des Ig anti-lapin biotinylées pendant 1 H 30 à 4° C suivies par la streptavidine liée au Texas red pendant 1 H à 4° C. Après observation et photographie des cellules BV/SOM, les lamelles sont délicatement retirées. Les sections sont alors incubées dans l'anticorps anti-RP. Le RP est mis en évidence au moyen d'une réaction à la DAB intensifiée au nickel-imidazole et les régions correspondant aux photographies précédentes sont recherchées et photographiées.

## **V - Histochimie NADPHd**

La technique histochimique de Vincent et Kimura (1992) est utilisée sur les sections flottantes de 60 µm et sur des sections de 16 µm. Elle permet l'observation de la NADPHd par réduction du nitrobleu tetrazolium (NBT) en un produit de réaction bleu foncé insoluble. Les sections sont rincées dans du PBS (3 bains de 10 min) puis laissées environ 1 H à 37° C dans un mélange contenant 1,1mM de β - NADPH, 0,1mM de NBT et 0,3 % de Triton X 100. Après incubation, les sections sont rincées dans du PBS et montées dans du glycergel (Dako). Des sections sont incubées dans le milieu dépourvu de NBT ou de β - NADPH pour vérifier la spécificité de la réaction.

## **VI - Observation et analyse quantitative des résultats**

### **A – Observation**

Les sections sont observées, soit en lumière blanche, soit en fluorescence, au moyen d'un microscope Leica DMRB équipé de différents filtres (Tableau 3).

**Tableau 3 : Filtres utilisés et substances détectées.**

Filtres	Longueurs d'ondes d'excitation	Fluorochromes et traceurs détectés
L4	450 – 490 nm	FITC, BV
N2 - 1	515 – 560 nm	Texas red
B/G/R	400/20, 495/15 et 570/50 nm	FITC, Texas red
A	340 – 380 nm	AMCA, TB, FG

Les cellules marquées à la fois avec le FITC et le Texas red sont visualisées en passant du filtre L4 au filtre N2.1 ou au moyen du filtre B/G/R qui permet l'observation simultanée des 2 fluorochromes.

Des photographies en noir et blanc sont réalisées avec des films Agfapan APX 100 pour la lumière blanche, et avec des films Ilford HP 5 Plus pour la fluorescence. Des diapositives couleurs sont réalisées avec des films Kodak Ektachrome 64 T pour la lumière blanche, et avec des films Fuji Sensia 400 pour la fluorescence.

## **B – Analyse quantitative de l'ensemble des résultats**

### 1) Détermination des régions examinées

Les régions analysées (aire préoptique, noyau paraventriculaire, VL, noyau arqué) sont délimitées selon la terminologie de l'atlas de Bleier (1983). Pour nos analyses, nous avons souvent subdivisé le VL et le noyau arqué en 3 régions en essayant de respecter toujours les mêmes limites. Sur nos sections frontales, la région que nous avons appelée région rostrale du VL se termine quand se dessine l'éminence médiane et correspond aux sections 322 à 330 de l'atlas (Fig. 5A). La région médiane du VL s'observe entre le début de l'éminence médiane et le niveau postérieur du noyau ventromédian et se situe entre les sections 331 et 337 (Fig. 5B). La région caudale du VL délimitée entre l'extrémité postérieure du noyau ventromédian et le début du noyau prémamillaire ventral est localisée au delà de la section 337 (Fig. 5C). La région rostrale du noyau arqué se termine quand l'éminence médiane apparaît et s'observe sur les sections 301 à 322 de l'atlas (Fig. 6A). La région médiane du noyau arqué, comprise entre le début de l'éminence médiane et la séparation de celle-ci avec le troisième ventricule, est délimitée par les sections 323 et 357 (Fig. 6B). La région caudale commence antérieurement lorsque

Fig 5: Photographies de sections frontales de l'hypothalamus du cobaye issues de l'atlas de Bleier (1983), montrant les niveaux où nous avons situé les régions rostrale (A), médiane (B), et caudale (C) du VL. Ahi: portion infundibulaire de l'adénohypophyse ; cp : pédoncule cérébral ; DA : aire dorsale hypothalamique ; DI : noyau dorsolatéral du tuber cinereum ; DIA : aire dorsolatérale ; Dm : noyau dorsomédian ; Do : noyau dorsal ; f : fornix ; ic : capsule interne ; In : noyau infundibulaire ou arqué ; Inf : infundibulum ou éminence médiane ; LA : aire latérale hypothalamique ; mt : tractus mamillothalamique ; ot : tractus optique ; Pat : noyau paraventriculaire thalamique ; Pdp : groupe parvocellulaire de la division dorsale du noyau paraventriculaire ; Sot : noyau supraoptique, composante du tuber ; TAd : noyau antérodorsal thalamique ; TAm : noyau antéromédian thalamique ; TAv : noyau antéroventral thalamique ; TCA : aire du tuber cinereum ; Th : thalamus ; TI : division latérale du noyau du tuber ; Tm : division médiane du noyau du tuber ; VI : noyau ventrolatéral ; Vm : noyau ventromédian ; ← : groupe magnocellulaire périventriculaire de la division dorsale du noyau paraventriculaire ;

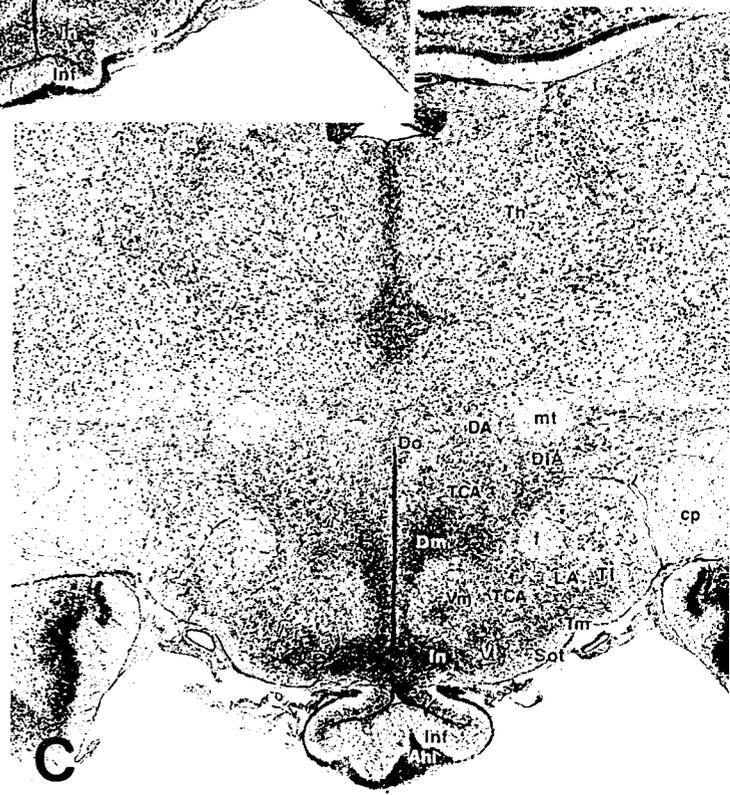
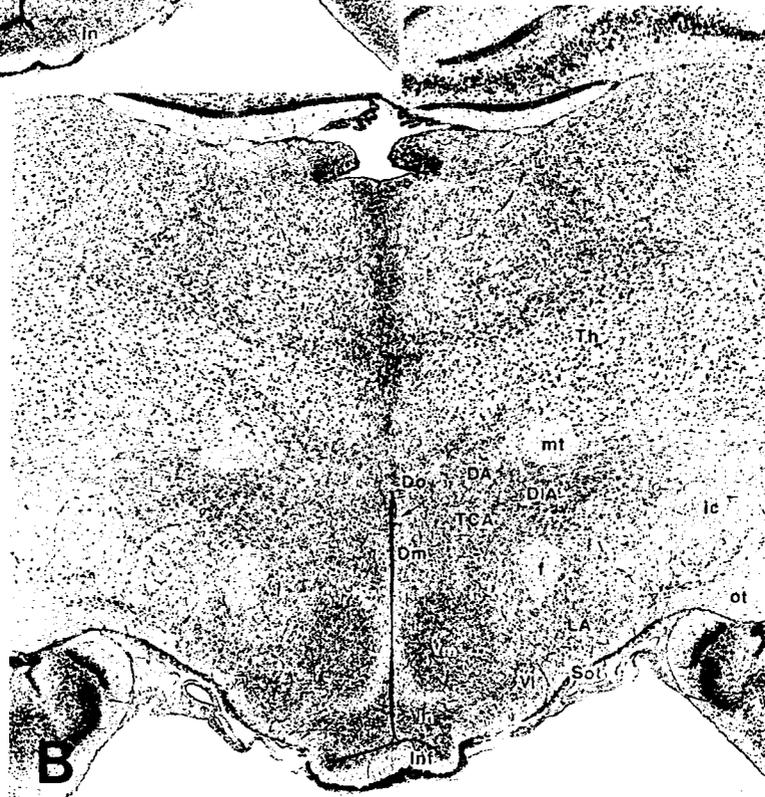
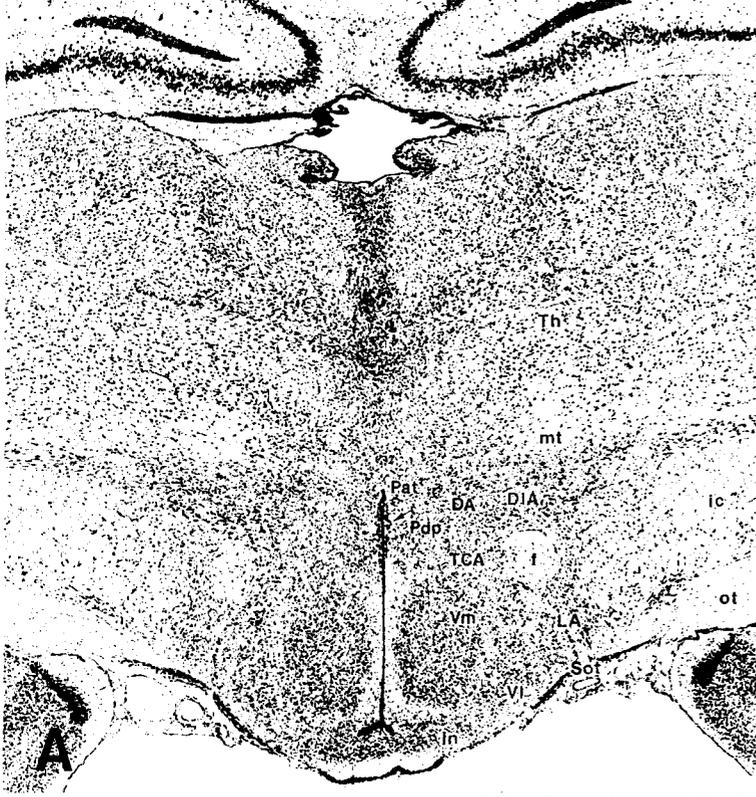
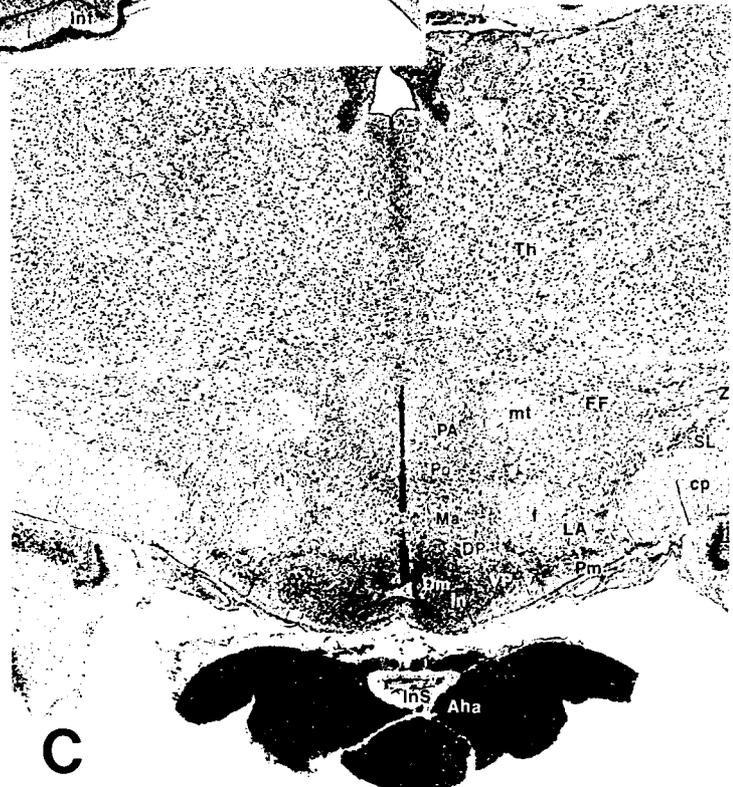
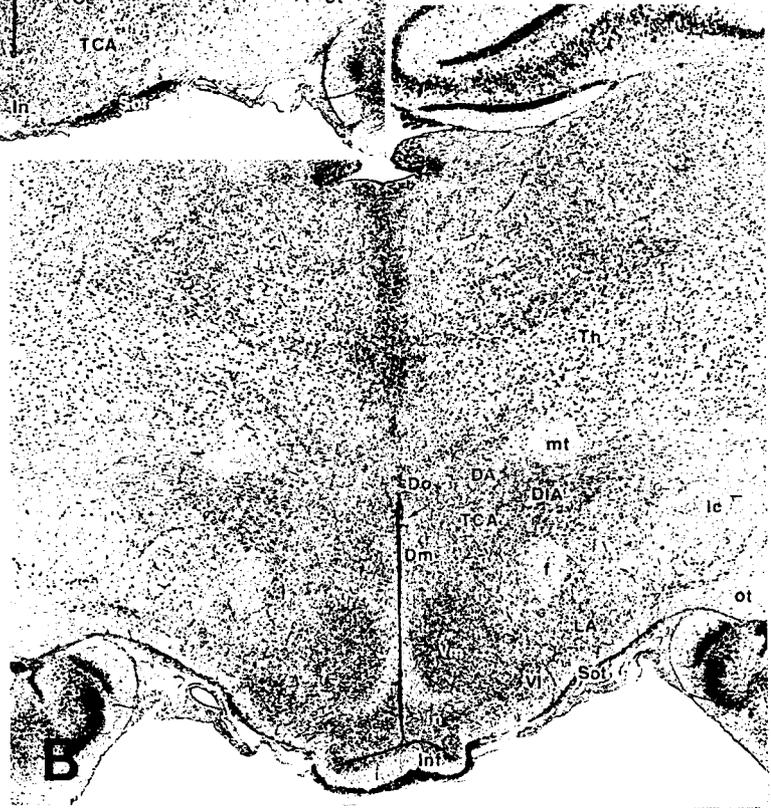
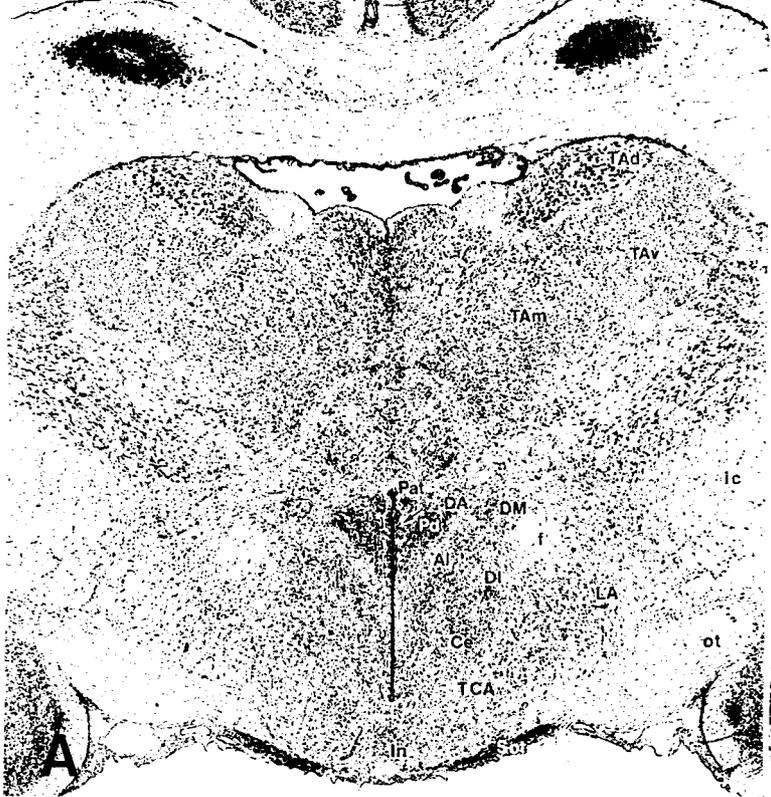


Fig. 6: Photographies de sections frontales de l'hypothalamus du cobaye issues de l'atlas de Bleier (1983), montrant les niveaux où nous avons situé les régions rostrale (A), médiane (B), et caudale (C) du noyau arqué. Aha: lobe antérieur de l'adénohypophyse; Al: noyau alar; Ce: noyau central; cp: pédoncule cérébral; DA: aire dorsale hypothalamique; DI: noyau dorsolatéral; DIA: aire dorsolatérale; Dm: noyau dorsomédian; DM: noyau magnocellulaire dorsolatéral; Do: noyau dorsal; DP: noyau prémamillaire dorsal; f: fornix; FF: champs de Forel; ic: capsule interne; In: noyau infundibulaire ou arqué; Inf: infundibulum ou éminence médiane; InS: tige infundibulaire ou pituitaire; LA: aire latérale hypothalamique; Ma: division antérieure du noyau mamillaire médian; mt: tractus mamillothalamique; ot: tractus optique; PA: aire postérieure hypothalamique; Pat: noyau paraventriculaire thalamique; Pd: division dorsale (parvocellulaire et magnocellulaire) du noyau paraventriculaire; Pm: noyau paramamillaire; Po: noyau postérieur; ; SL: noyau subthalamique de Luys; Sot: noyau supraoptique, composante du tuber; TAd: noyau antérodorsal thalamique; TAm: noyau antéromédian thalamique; TAv: noyau antéroventral thalamique; TCA: aire du tuber cinereum; Th: thalamus; VI: noyau ventrolatéral; Vm: noyau ventromédian; VP: noyau prémamillaire ventral; ZI: zona incerta; ←: groupe magnocellulaire périventriculaire de la division dorsale du noyau paraventriculaire;



le récessus infundubulaire est complètement entouré par la base du cerveau et se termine postérieurement lorsque le récessus mamillaire disparaît. Elle s'étend au delà de la section 357 (Fig. 6C).

## 2) Comptages

### a) sur lames

A partir des comptages sur lames, réalisés sous le microscope en lumière blanche et en fluorescence, à raison d'une section sur 2, le nombre moyen de cellules ( $\pm$ SEM)/hémisection est calculé pour chaque population neuronale. Les pourcentages de cellules doublement et triplement IR sont estimés en fonction de chaque population neuronale.

Par souci de clarté, nous avons choisi de préciser le nombre d'hémisections analysées dans chaque expérimentation dans la légende des figures et des différents tableaux portant sur l'analyse quantitative.

### b) sur photographies

La comparaison des paires de photographies, réalisées chez tous les animaux expérimentés après chacune des deux étapes des triples marquages immunofluorescents faisant appel à l'éluion (photographie après la double immunofluorescence + photographie après la troisième réaction immunofluorescente) et du transport axonal associé à une double immunofluorescence (photographie des cellules contenant le traceur + photographie après l'immunocytochimie RP/SOM), permet de compter les cellules doublement et triplement marquées. A partir des valeurs obtenues pour chaque population neuronale nous calculons le nombre ( $\pm$ SEM) de cellules /unité de surface ( $\text{mm}^2$ ) en considérant que chaque photographie, réalisée sous l'objectif 40X du microscope, correspond à une surface de  $440 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$  du VL. A partir de l'ensemble des comptages, les pourcentages ( $\pm$ SEM) des populations cellulaires doublement et triplement marquées sont calculés en fonction des populations neuronales simplement et doublement fluorescentes. Contrairement aux comptages sur lames, la technique des comptages sur photographies ne permet pas d'évaluer les populations cellulaires totales dans le VL, il peut en résulter des variations dans les pourcentages de colocalisation obtenus au cours de nos différentes études.

### 3) Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées au moyen du logiciel Sigma Stat (Jandel Scientific, Erkrath, Allemagne). Un test de t de Student avec un niveau de significativité  $p < 0,05$  est réalisé dans 2 cas : (1) pour établir l'existence de différences entre mâles et femelles dans l'induction du RP dans le diencephale et dans la proportion des cellules IR–RP/SOM ; (2) pour s'assurer de la significativité des disparités dans la proportion de cellules IR–RP/NOS entre animaux traités et animaux non traités par la colchicine.

La comparaison de plusieurs groupes d'animaux entre eux est toujours réalisée avec un ANOVA à un facteur. Quand  $p < 0,05$ , un test post-hoc est entrepris :

- soit le test de Student – Newman – Keuls ( $p < 0,05$ ) qui permet de déterminer si parmi plusieurs groupes expérimentaux un (ou plusieurs) groupe(s) présente(nt) une (des) différence(s) significative(s). Ce test est utilisé dans l'étude des effets du traitement œstrogénique sur les cellules neuropeptidergiques et dans l'étude de l'influence de la colchicine sur l'activité NOS.

- ou le test t de Bonferroni ( $p < 0,05$ ) qui permet de mettre en évidence une différence significative d'un ou de plusieurs groupes par rapport à un groupe témoin. Ce test est utilisé pour spécifier la durée à partir de laquelle le traitement des œstrogènes sur l'activité NOS devient significative.

# RESULTATS

## RESULTATS

### I - Les cellules IR-RP dans le VL et les autres régions hypothalamiques: comparaison entre le cobaye femelle et le cobaye mâle.

#### A – Distribution des cellules IR-RP

La distribution neuroanatomique des RP a été étudiée sur les sections de cerveau de 8 cobayes femelles et de 8 cobayes mâles GDX+EB. Les cellules IR-RP sont recherchées au moyen d'une réaction immunocytochimique produisant une coloration bleu-noir après révélation avec la DAB intensifiée au nickel imidazole. Les RP ont une localisation essentiellement nucléaire.

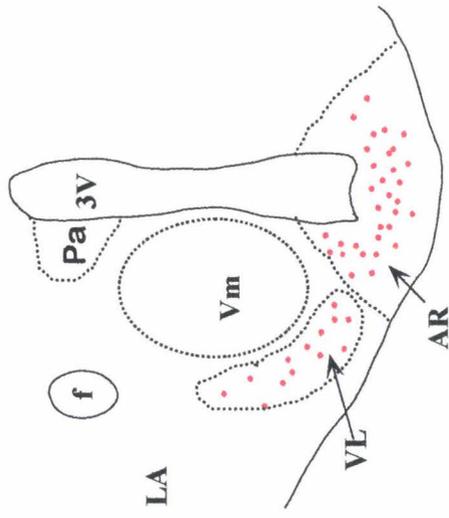
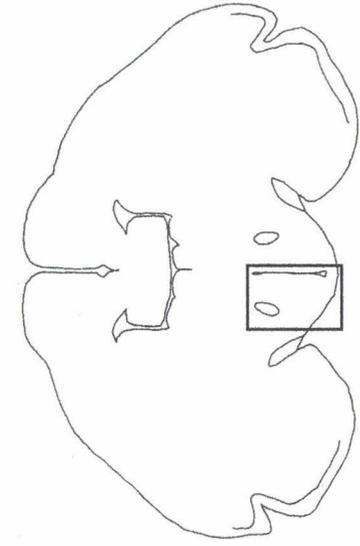
##### 1) Dans le VL

Chez le mâle comme chez la femelle, des cellules IR-RP sont observées dans l'étendue rostro-caudale du VL (Fig. 7), où elles bordent le noyau ventromédian et l'aire hypothalamique latérale. Elles sont détectées de la base du cerveau en direction du fornix dans les régions rostrale (Fig. 7A) et médiane (Fig. 7B) et occupent une position médio-ventrale dans la région caudale du noyau (Fig. 7C). Elles sont éparpillées au niveau rostral, alors qu'elles apparaissent groupées dans les deux tiers postérieurs du VL. Dans les deux tiers antérieurs du VL, les cellules IR-RP sont observées en nombre moins important en direction du fornix chez la femelle (Fig. 8A) que chez le mâle (Fig. 8B). Dans la région caudale, les cellules IR-RP ont la même distribution chez le mâle et chez la femelle.

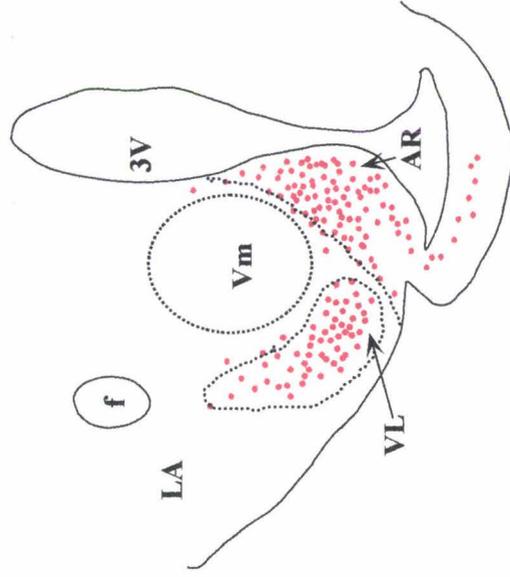
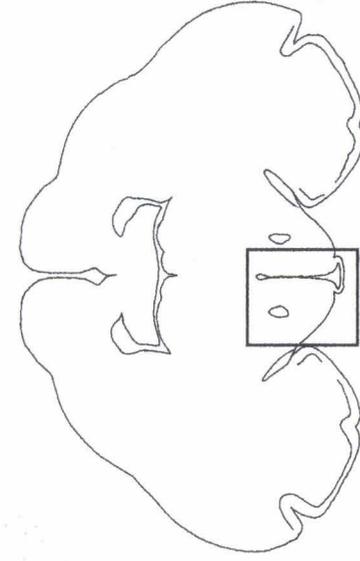
##### 2) Dans l'aire préoptique, le noyau arqué et le noyau prémamillaire ventral

Les cellules contenant des RP occupent une région plus étendue latéralement dans l'aire préoptique de la femelle (Fig. 8C) par rapport à celle du mâle (Fig. 8D). Par contre, dans les différentes régions du noyau arqué, nous n'observons pas de

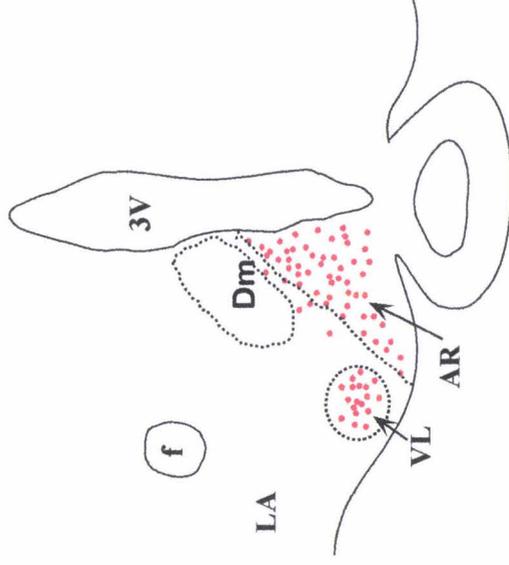
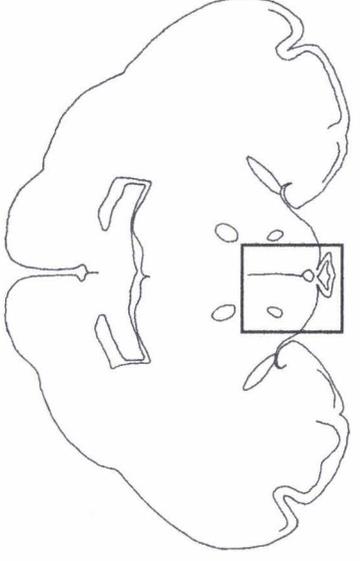
Fig. 7: Localisation sur des hémisections d'hypothalamus médio-basal des cellules IR-RP (points rouges) dans le noyau arqué et dans les subdivisions rostrale (A), médiane (B) et caudale (C) du VL. Le niveau de ces hémisections correspond sur les coupes frontales de cerveau situées au dessus, à la région encadrée. Chaque point correspond à une cellule IR. AR: noyau arqué; f: fornix; Dm : noyau dorsomédian ; LA: aire hypothalamique latérale ; Pa : noyau paraventriculaire; 3V: troisième ventricule ; VL: noyau ventrolatéral; Vm: noyau ventromédian.



**A - niveau rostral**

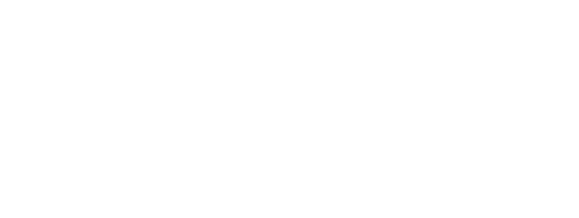
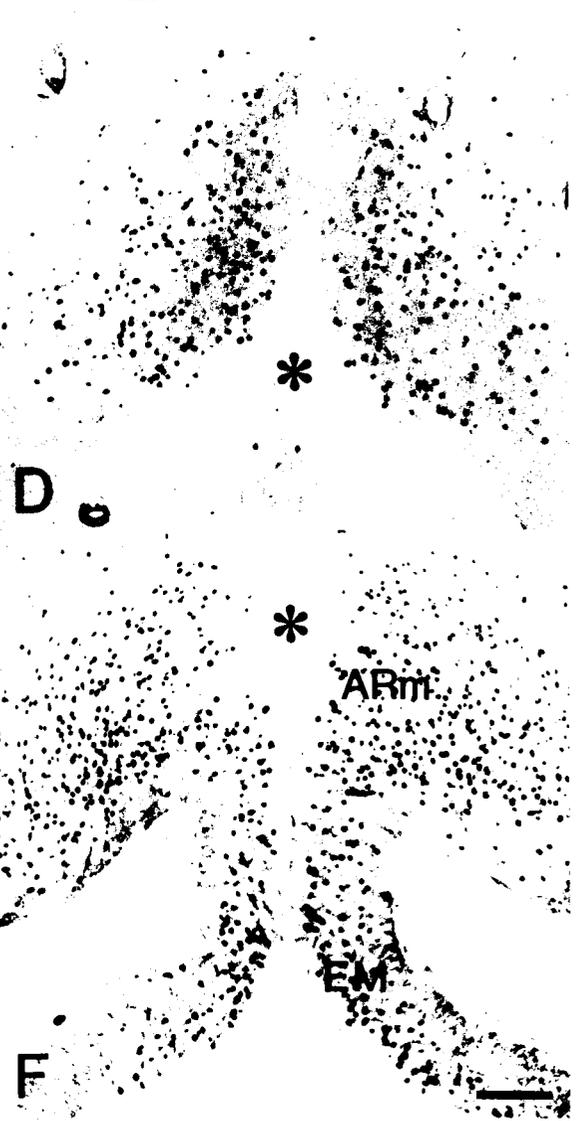


**B - niveau médian**



**C - niveau caudal**

Fig. 8: Distribution des cellules IR-RP dans le VL (A et B), l'aire préoptique (C et D) et la subdivision médiane du noyau arqué (E et F) chez le cobaye femelle (A, C et E) et chez le cobaye mâle (B, D et F) GDX+EB. ARm: subdivision médiane du noyau arqué; EM: éminence médiane ; VLr: subdivision rostrale du VL ; \* : troisième ventricule. Barre de calibration: 150  $\mu$ m.



différences dans la localisation des cellules IR-RP entre femelles (Fig. 8E) et mâles (Fig. 8F). La région renfermant les cellules IR dans le noyau prémamillaire ventral est plus étendue et les cellules sont plus dispersées latéralement de part et d'autre de la subdivision caudale du noyau arqué chez la femelle que chez le mâle. L'aire préoptique et le noyau prémamillaire ventral présentent également des différences entre mâles et femelles dans l'intensité du marquage IR.

### 3) Induction du RP par le traitement œstrogénique

Les sections d'hypothalamus des femelles (n=2) et des mâles (n=2) GDX+huile contiennent très peu de cellules IR-RP dans l'aire préoptique, le noyau arqué, et le VL (Fig. 9). Ce dernier ne montre pas de cellules IR-RP chez le mâle (Fig. 9).

## **B – Quantification des cellules IR-RP**

L'estimation quantitative des cellules contenant le RP a été réalisée sur les sections de cerveau de tous les animaux GDX+EB et GDX+huile. Le nombre de cellules IR-RP chez le mâle et chez la femelle GDX+EB est significativement supérieur ( $p < 0,05$ ) dans toutes les régions examinées par rapport à celui obtenu chez les animaux GDX+huile (Fig. 9). Chez les animaux traités aux œstrogènes, nos comptages mettent en évidence un nombre de cellules IR significativement supérieur ( $p < 0,05$ ) dans la région rostrale du VL chez le mâle (36 cellules/hémisection) par rapport à celui obtenu chez la femelle (25 cellules/hémisection). Par contre, les autres régions du VL ne montrent pas de différence significative (Fig. 9). L'aire préoptique contient significativement ( $p < 0,05$ ) plus de cellules IR-RP chez la femelle GDX+EB que chez le mâle (239 contre 197 cellules/hémisection) (Fig. 9). Le traitement œstrogénique ne provoque pas de variation significative du nombre de cellules IR-RP entre mâles et femelles GDX+EB dans les différentes régions du noyau arqué (Fig. 9).

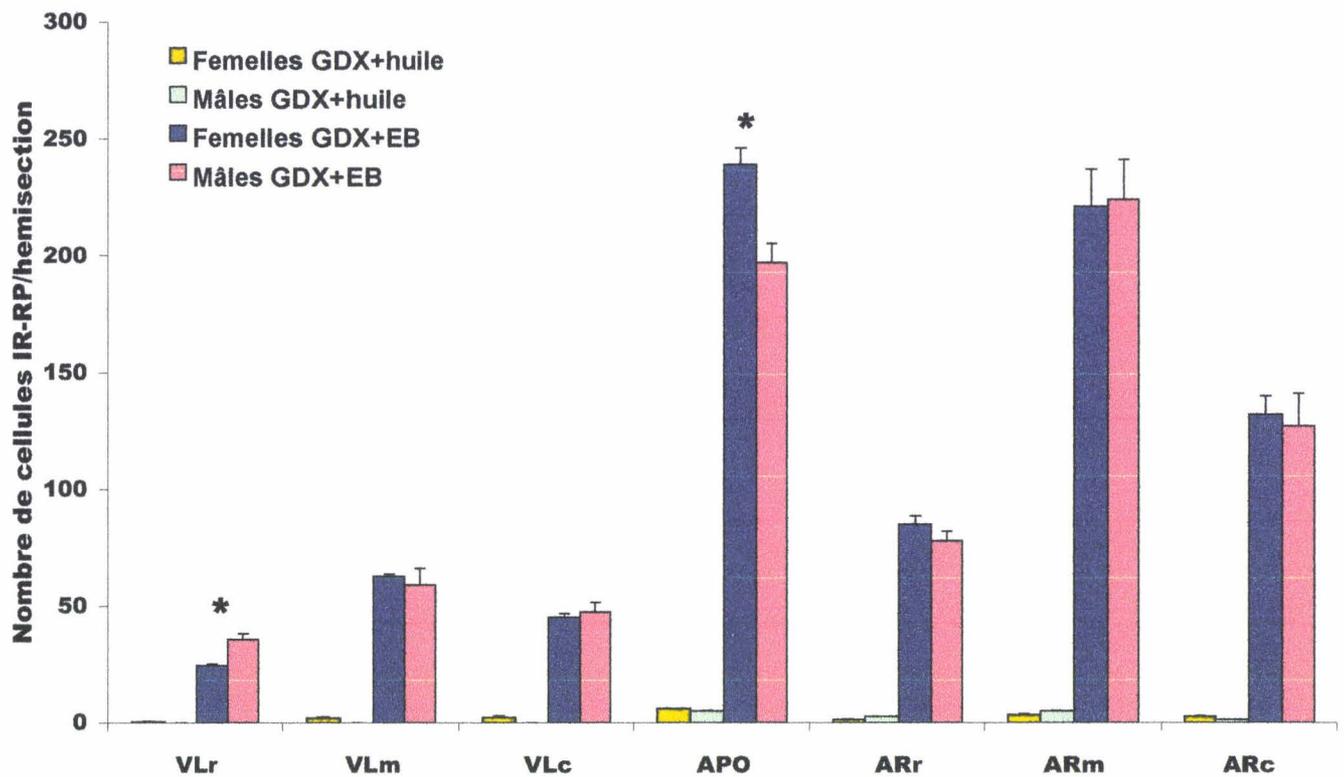


Fig. 9: Comparaison du nombre de cellules IR-RP entre le cobaye femelle et le cobaye mâle dans le VL, l'aire préoptique et le noyau arqué. L'estimation quantitative a été réalisée sur 8 hémisections de chaque subdivision du VL, sur 20 hémisections de l'aire préoptique et sur 10 hémisections de chaque subdivision du noyau arqué chez 2 femelles et 2 mâles GDX+huile et chez 8 femelles et 8 mâles GDX+EB. La barre d'erreur représente le SEM. VLr, VLm, VLc: subdivisions rostrale, médiane et caudale du VL; APO: aire préoptique; ARr, ARm, ARc: subdivisions rostrale, médiane et caudale du noyau arqué. \* significativement différent ( $p < 0,05$ ; test t de Student) entre mâles et femelles GDX+EB.

## **II - Coexistence du RP et de la SOM.**

Le RP et la SOM ont été mis en évidence au moyen d'une technique de double immunofluorescence chez 8 femelles et 8 mâles GDX+EB traités par la colchicine.

### **A – Distribution des cellules à SOM dans l'hypothalamus chez le cobaye**

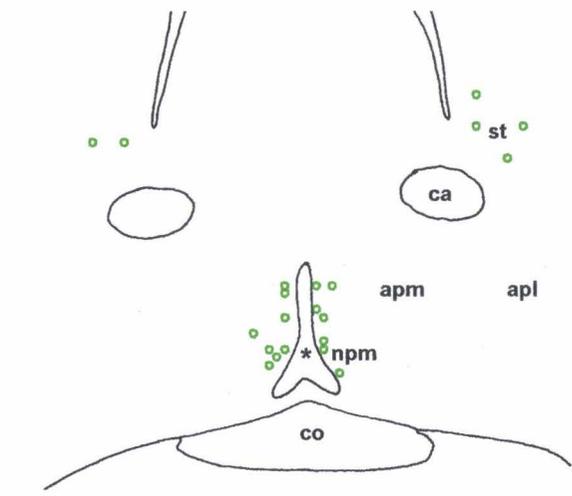
Nous décrivons seulement la distribution des corps cellulaires à SOM (Fig. 10 A-F) qui montrent une fluorescence vert-jaune cytoplasmique provenant du FITC.

Des neurones IR-SOM sont localisés dans l'organe vasculaire de la lame terminale et dans le noyau préoptique médian le long du troisième ventricule (Fig. 10 A et B, Fig. 11A). Des cellules à SOM sont détectées dans le noyau hypothalamique périventriculaire (Fig. 10C, Fig. 11B), la région parvocellulaire du noyau paraventriculaire (Fig. 10D), la région médiane de l'aire hypothalamique latérale et dans la région périfornicale (Fig. 10 D et E). Dans toute l'extension rostro-caudale du noyau arqué (Fig. 10 D-F), les neurones à SOM, qui sont de petite taille, présentent une fluorescence de forte intensité (Fig. 11C). Ils occupent les régions ventrolatérales et périventriculaires dans les deux tiers antérieurs du noyau (Fig. 10 D et E), tandis qu'ils sont essentiellement distribués en position ventrale dans la région postérieure (Fig. 10F). De nombreuses cellules à SOM sont localisées dans l'étendue antéro-postérieure du VL (Fig. 10 D et E). Dans les régions rostrale et médiane, nous observons une hétérogénéité dans l'intensité de la fluorescence des neurones IR, les neurones localisés en position ventrale et le long de l'aire hypothalamique latérale montrant une immunofluorescence plus intense (Fig. 11D) que celle des cellules en position médiane et en bordure du noyau ventromédian. Dans la région caudale du VL, les neurones groupés en position basale présentent une fluorescence d'intensité plus homogène. Les cellules à SOM apparaissent plus nombreuses dans les régions médiane et caudale du VL.

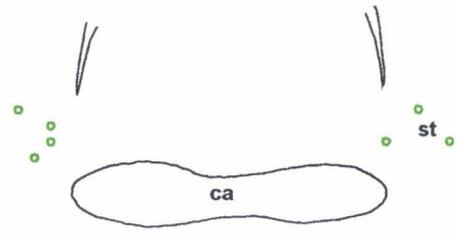
### **B – Localisation des cellules IR-RP/SOM**

Les cellules IR-SOM précédemment décrites et les cellules IR-RP qui présentent, suite au double marquage immunocytochimique, une fluorescence rouge nucléaire, montrent des localisations superposables dans le noyau préoptique

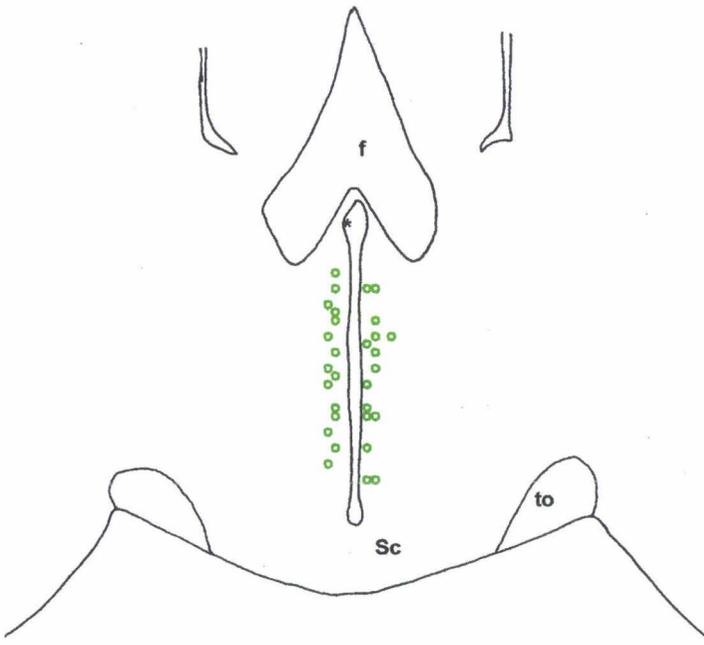
Fig 10: Schémas montrant la distribution des cellules IR-SOM (cercles verts) sur des sections frontales de l'aire préoptique (A, B) et de l'hypothalamus (C-F) du cobaye femelle. Chaque cercle représente une cellule IR. apl : aire préoptique latérale ; apm : aire préoptique médiane ; Ar : noyau arqué ; ca : commissure antérieure ; co : chiasma optique ; f : fornix ; LA : aire latérale hypothalamique ; mt : tractus mamillothalamique ; npm : noyau préoptique médian ; Pa : noyau paraventriculaire ; Sc : noyau suprachiasmatique ; st : strie terminale ; to : tractus optique ; VL : noyau ventrolatéral ; Vm : noyau ventromédian ; \* : troisième ventricule.



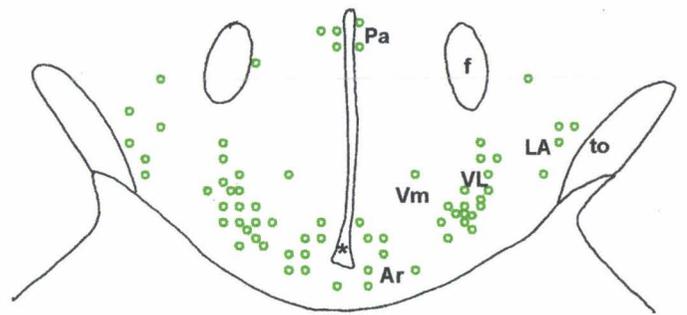
**A**



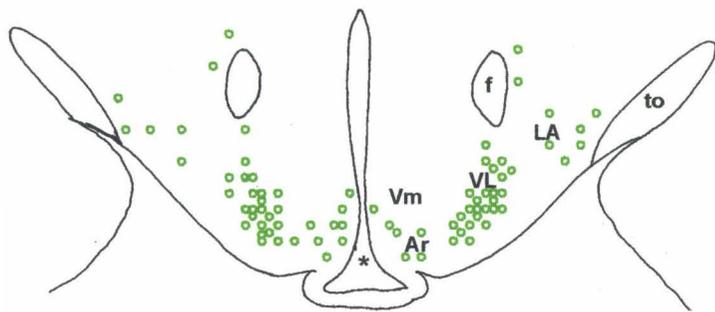
**B**



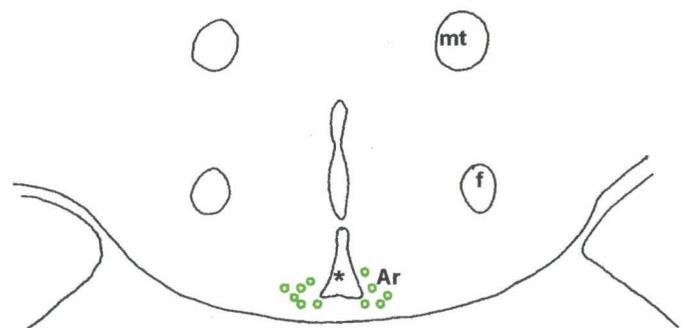
**C**



**D**

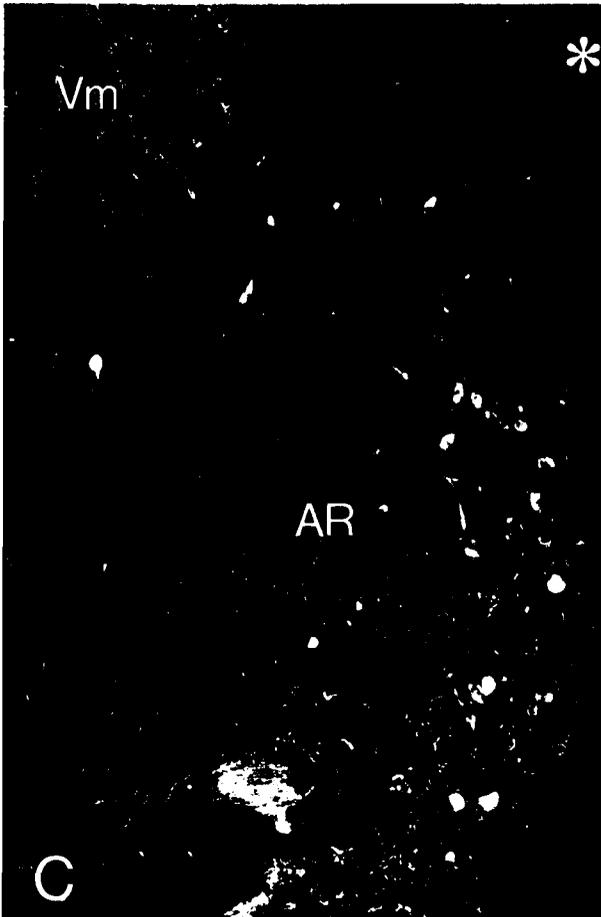
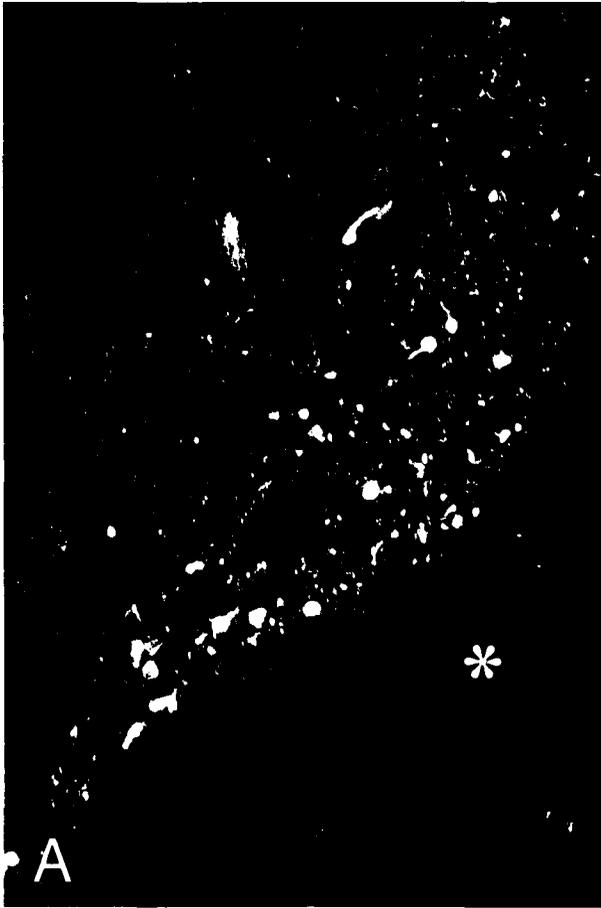


**E**



**F**

Fig. 11: Microphotographies montrant la localisation des cellules IR-SOM dans le noyau préoptique médian (A), le noyau hypothalamique périventriculaire (B), le noyau arqué (C) et le VL (D) du cobaye femelle GDX+EB traité par la colchicine. AR: noyau arqué. VL : noyau ventrolatéral, Vm: noyau ventromédian; \*: troisième ventricule. Barre de calibration: 75  $\mu$ m



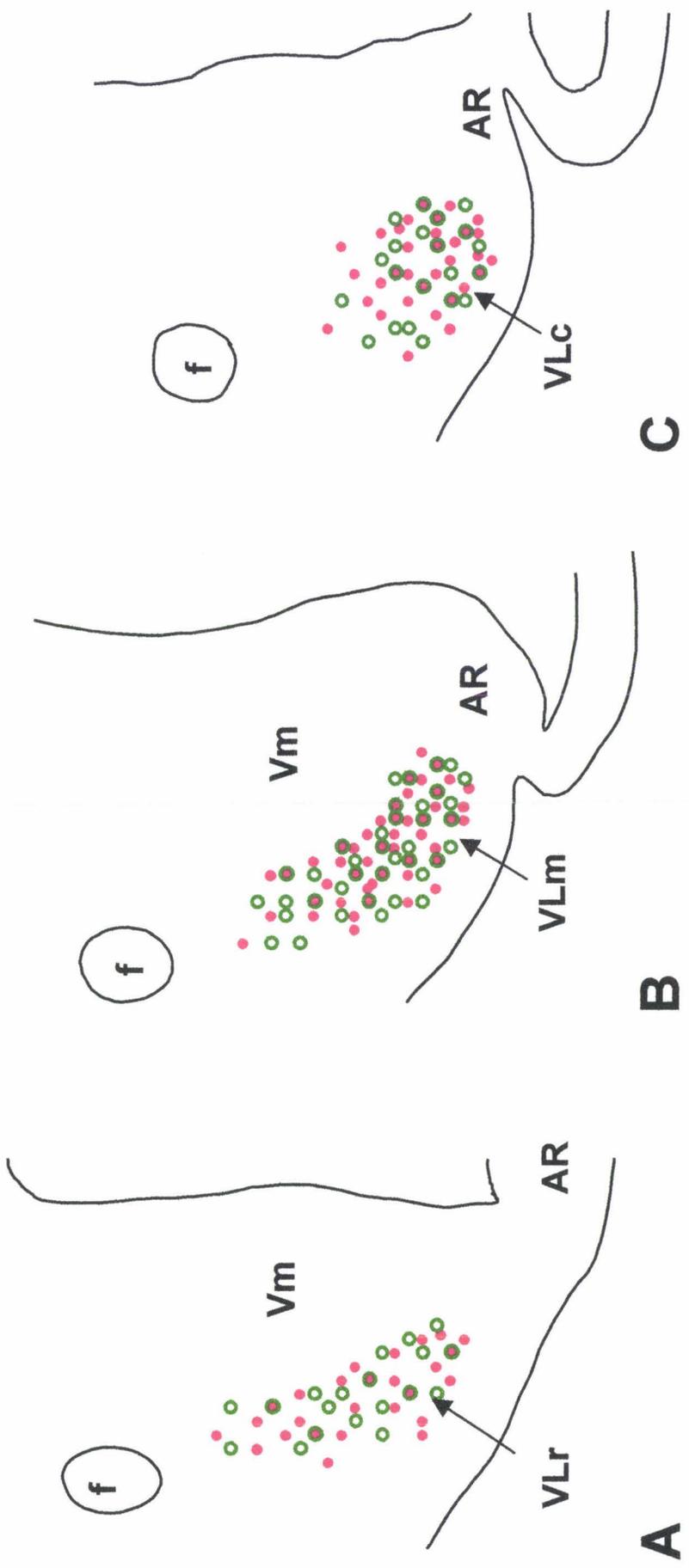
médian, le noyau arqué, et l'étendue rostro-caudale du VL (Fig. 12 A-C). La visualisation simultanée des deux immunoréactivités dans la même cellule (Fig. 13 A-E) est facilitée par les localisations intracellulaires différentes des deux antigènes.

Bien que de nombreuses cellules IR-SOM et IR-RP soient détectées dans l'aire préoptique, cette région ne semble pas contenir de neurones doublement IR. Par contre, le noyau arqué présente sporadiquement des neurones IR-RP/SOM (Fig. 13 A et B). De nombreuses cellules cibles de la progestérone contenant de la SOM (Fig. 13 C et D) sont localisées dans l'étendue rostro-caudale du VL où elles apparaissent essentiellement en position ventro-médiane (Fig. 12 A-C). Des cellules doublement IR bordent également le noyau ventromédian aux niveaux rostral et médian du noyau (Fig. 12 A et B). De nombreuses varicosités IR pour la SOM sont situées à proximité de cellules IR-RP dans le VL et dans le noyau arqué; des appositions de boutons IR-SOM peuvent être observées sur des corps cellulaires IR-RP (Fig. 13E). La localisation des cellules IR-RP/SOM est identique chez les mâles et les femelles.

### **C – Estimation quantitative des cellules IR-RP/SOM**

L'analyse quantitative a été réalisée sur 8 hémisections dans chaque subdivision du VL chez tous les animaux expérimentés. Elle ne montre pas de différence significative entre mâles et femelles dans le nombre de cellules simplement et doublement IR dans les régions rostrale et médiane du VL (Tableau 4). Dans ces régions, les cellules IR-RP/SOM représentent environ 20% et 40% des cellules IR-SOM et environ 20% et 32% des cellules IR-RP (Tableau 4). Dans la région caudale, les mâles montrent significativement ( $p < 0,05$ ) plus de cellules IR-SOM (35 contre 21 cellules/hémisection) et de cellules IR-RP/SOM (14 contre 8 cellules/hémisection) que les femelles. Dans cette région, le pourcentage de cellules IR-RP sécrétant la SOM est significativement supérieur chez les mâles (37%) par rapport à celui obtenu chez les femelles (25%) alors que le pourcentage de cellules IR-SOM contenant le RP avoisine 40% chez les mâles et chez les femelles (Tableau 4). Dans le noyau arqué, où l'estimation a été réalisée sur 20 sections chez 4 femelles et 4 mâles, la population des cellules doublement IR représente moins de 1,5 % de la population des cellules IR-SOM et moins de 0,5 % de la population des cellules IR-RP (Tableau 4).

Fig. 12: Schémas d'hémisections frontales du VL de 16  $\mu$ m montrant la localisation des cellules IR-RP (points rouges), des cellules IR-SOM (cercles verts) et des cellules IR-RP/SOM (points rouges entourés de cercles verts) dans les subdivisions rostrale (A), médiane (B) et caudale (C) du noyau. Chaque symbole représente une cellule IR. AR: noyau arqué; f: fornix; VLr, VLm, VLc: subdivisions rostrale, médiane et caudale du VL; Vm: noyau ventromédian.



• Cellule IR-RP    ◉ Cellule IR-SOM    ● Cellule IR-RP/SOM

Fig. 13: Microphotographies de cellules IR pour le RP et la SOM dans le noyau arqué (A et B) et le VL (C-E). Les cellules doublement IR (grandes flèches) montrent à la fois une immunofluorescence nucléaire pour le RP (provenant du Texas red) et une immunofluorescence cytoplasmique pour la SOM (fluorescence jaune-vert associée au FITC). Ces cellules sont observées en passant du filtre N2.1 (A) au filtre L4 (B) ou au moyen du filtre B/G/R (C-E) qui permet la visualisation simultanée des deux immunoréactivités. Des boutons terminaux IR-SOM (petites flèches) entourent le péricaryon d'un neurone IR-RP (E). Barre de calibration: 20  $\mu\text{m}$  (A, B), 54  $\mu\text{m}$  (C), 30 $\mu\text{m}$  (D) et 12 $\mu\text{m}$  (E).

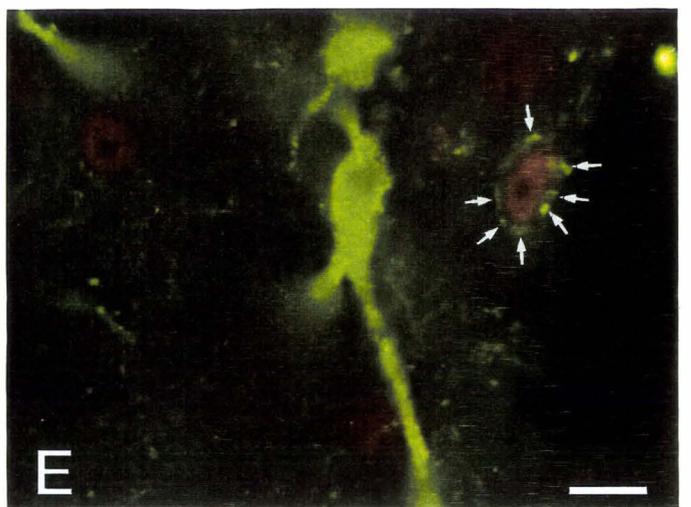
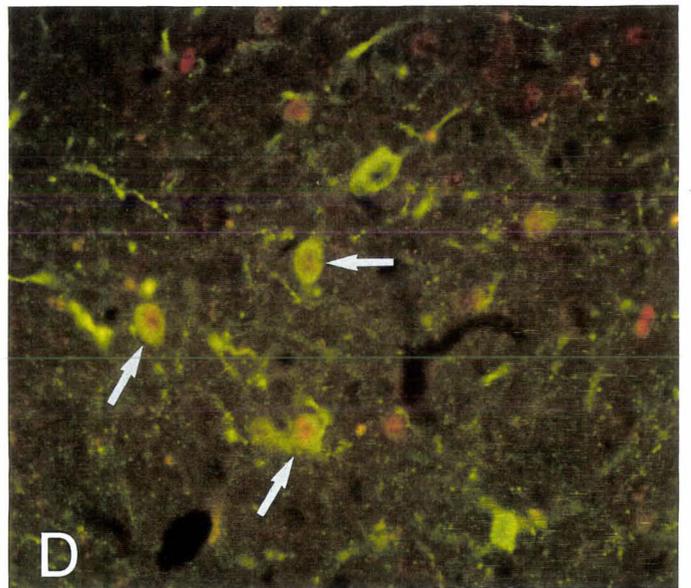
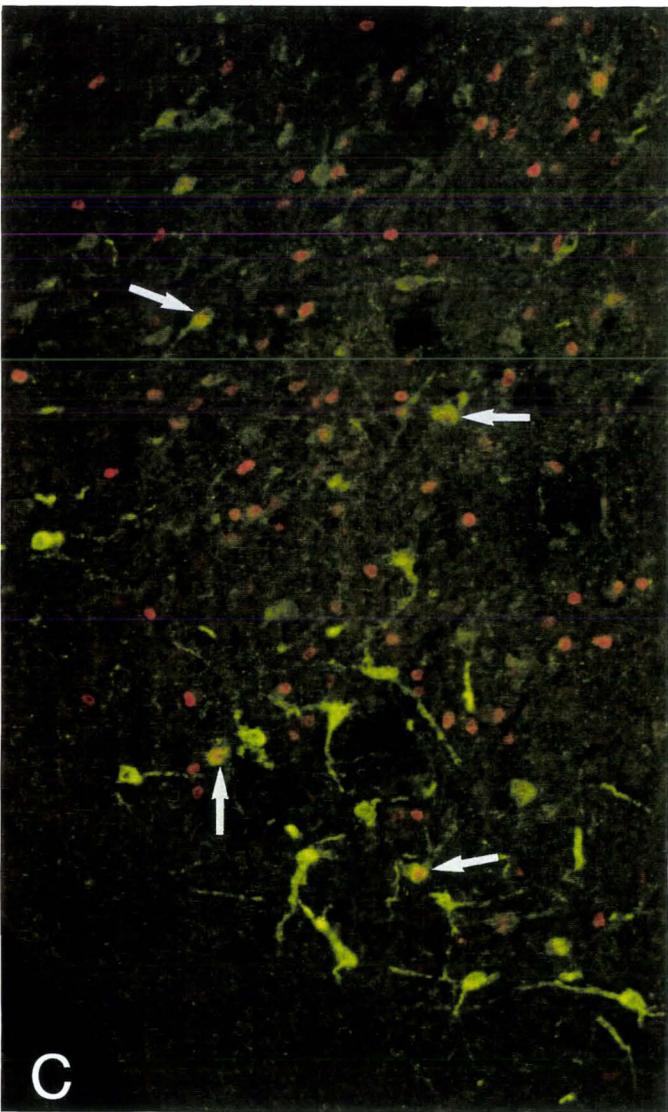
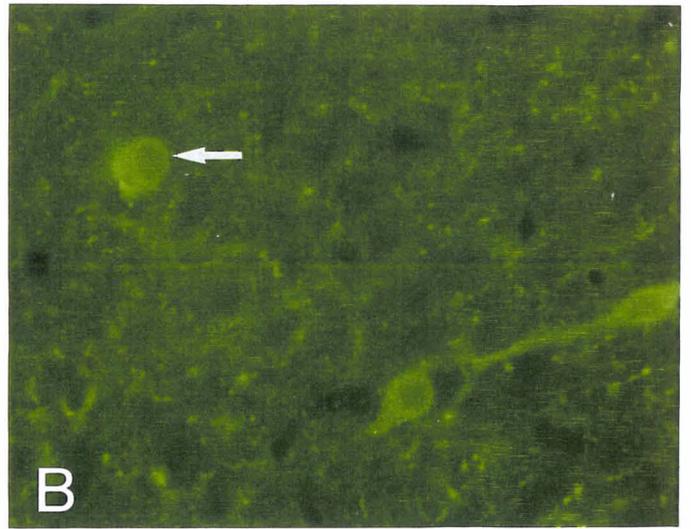
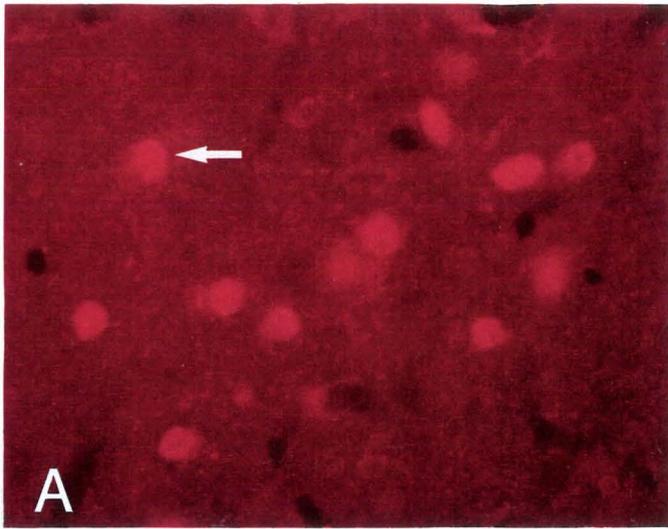


Tableau 4 : Estimation du nombre de neurones IR-RP, IR-SOM et doublement IR /hémisection dans le VL et le noyau arqué de cobayes femelles et de cobayes mâles.

Région	Sexe	Nombre de neurones IR-RP /hémisection	Nombre de neurones IR-SOM /hémisection	Nombre de neurones IR-RP/SOM /hémisection	% de neurones IR-SOM avec RP	% de neurones IR-RP avec SOM	
VL	rostrale	Femelles(n=8)	26,6±0,7	23,6±1,6	4,4±0,1	19,1±1,2	16,6±0,8
		Mâles (n=8)	23,4±1,1	25,4±1,0	5,1±0,4	20,3±1,4	22,3±1,9
	médiane	Femelles	48,5±1,1	37,9±2,5	15,5±1,0	41,2±2,2	31,9±2,1
		Mâles	47,5±2,1	39,9±1,5	15,6±1,2	38,9±1,7	32,9±2,0
	caudale	Femelles	32,2±3,5	21,3±1,1*	8,0±0,5*	37,6±1,6	25,8±2,5*
		Mâles	38,1±1,9	35,9±1,2*	14,5±1,4*	40,5±3,4	37,9±2,1*
AR	Femelles(n=4)	68,1±2,4	19,4±1,1	0,1±0,02	0,6±0,07	0,2±0,03	
	Mâles (n=4)	69,8±5,3	21,2±2,9	0,2±0,03	1,0±0,14	0,3±0,06	

Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules /hémisection ( $\pm$ SEM) comptées sur 8 hémisections dans chaque région du VL et sur 20 hémisections du noyau arqué (AR).

\* différence significative ( $p < 0,01$  ; test t de Student) entre mâles et femelles.

### **III - Projections des cellules IR–RP/SOM du VL en direction du mésencéphale**

Parmi les 60 cobayes femelles GDX+EB traités par la colchicine, utilisés dans cette étude, 26 ont reçu une injection de FG à 2 % (21 par microélectroiontophorèse, 5 par pression), 25 ont reçu du TB (1 par microélectroiontophorèse, 24 par pression) et 9 des BV (par pression uniquement).

#### **A – Localisation et aspect des sites d'injection**

##### 1) Localisation des sites d'injection

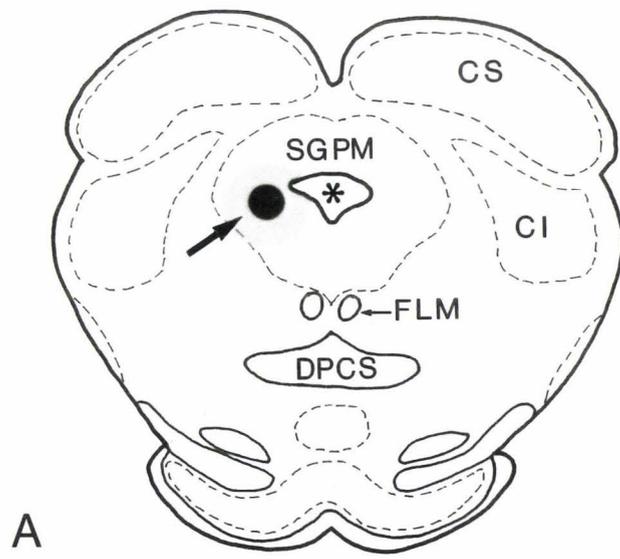
L'observation des sections du VL a été entreprise seulement chez les animaux possédant un site d'injection restreint à la région latérale de la SGPM et plus précisément au niveau de la subdivision médiane de son extension rostro-caudale (Fig. 14A). Parmi les 60 animaux expérimentaux, 10 ayant reçu le FG par microiontophorèse, 10 ayant reçu le TB par pression et 5 ayant reçu les billes de latex fluorescentes montrent un site d'injection localisé dans cette région de la SGPM. Quant aux 35 autres cobayes, 28 possèdent soit des sites localisés dans une région voisine de la SGPM telle que le colliculus supérieur, la formation réticulée ou le ventricule, soit des sites localisés à des niveaux trop rostraux ou trop caudaux à la subdivision médiane de la SGPM, et les 7 autres ne montrent pas de sites d'injection, le traceur étant visualisé uniquement le long du passage de l'aiguille.

##### 2) Aspect des sites d'injection

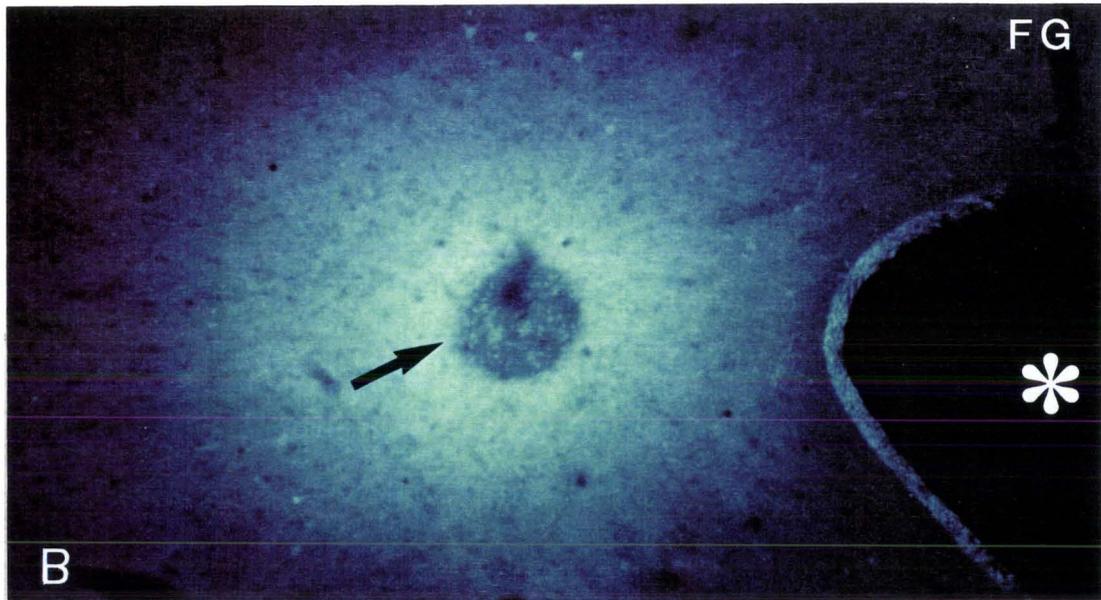
###### - Avec le FG

Les sites obtenus après injection de FG sont d'aspect concentrique (Fig. 14B). Leur diamètre est compris entre 400 et 900  $\mu\text{m}$ . Trois zones distinctes sont observées. Une petite zone de nécrose centrale, due à la présence de la microélectrode, est entourée par une région de forte fluorescence où quelques corps cellulaires apparaissent. A la périphérie de cette zone très brillante, quelques cellules gliales et quelques neurones faiblement marqués sont observés.

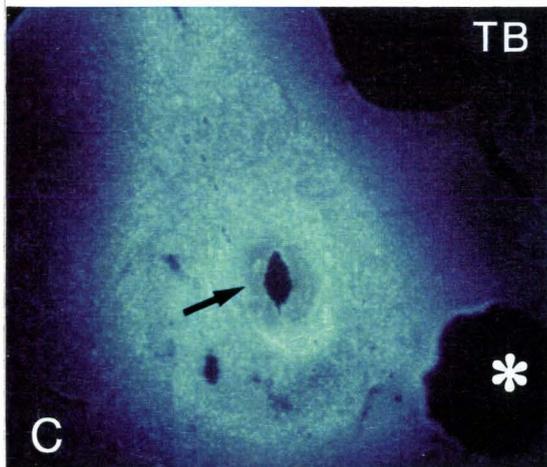
Fig. 14: Schéma d'une section mésencéphalique (A) et microphotographies de coupes du mésencéphale (B-E) montrant la localisation des sites d'injections (flèches) des traceurs, FG (B), TB (C et D) ou BV (E) dans la région latérale de la SGPM et plus précisément au niveau médian de son étendue rostro-caudale. Le traceur utilisé est soit du FG (B), soit du TB (C et D) soit des BV (E). CI : colliculus inférieur ; CS : colliculus supérieur ; DPCS : décussation du pédoncule cérébral supérieure ; FLM : faisceau longitudinal médian ; SGPM : substance grise périventriculaire mésencéphalique, \* : aqueduc de Sylvius. Barre de calibration : 120  $\mu\text{m}$  (B) et 240  $\mu\text{m}$  (C-E)



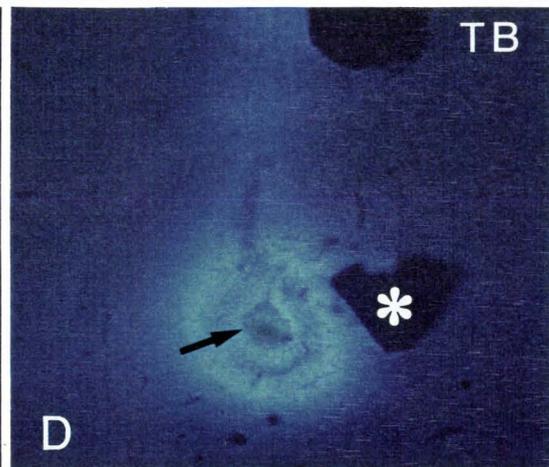
A



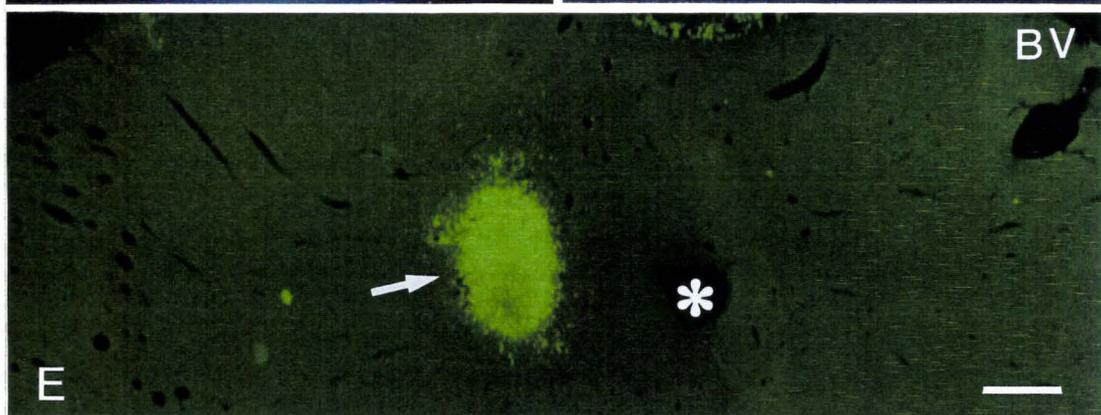
B



C



D



E

- Avec le TB

Les sites obtenus avec le TB possèdent également trois zones concentriques facilement observables avant coloration histologique des sections (Fig. 14C). Leur diamètre est compris entre 700 et 900  $\mu\text{m}$ . Leur aspect est similaire à celui décrit pour le FG. Après coloration des sections, seules les deux zones centrales restent visibles (Fig. 14D).

- Avec les BV

Après injection de la solution contenant les BV, les sites obtenus ont un diamètre d'environ 250  $\mu\text{m}$ . Les sites ne montrent que deux zones : une zone centrale nécrosée entourée par une région où la fluorescence est très brillante (Fig. 14E).

## **B – Description des régions marquées après injection de FG**

Les cellules contenant du FG (FG+) montrent dans leur cytoplasme et dans leurs prolongements cellulaires des granules fluorescents de couleur blanc-argenté. Le noyau n'est pas marqué mais le nucléole montre une fluorescence blanche diffuse non granulaire.

Des neurones et des cellules gliales FG+ sont observés dans le VL, la région périfornicale et la région antérieure du noyau ventromédian. Le nombre de neurones FG+/hémisection étant toujours inférieur ou égal à 5 sur toutes les sections de VL examinées, nous n'avons pas mis en œuvre l'immunocytochimie RP/SOM.

## **C – Description des régions marquées après injection de TB**

### 1) Aspect des cellules marquées

Les cellules contenant du TB (TB +) présentent un marquage granulaire cytoplasmique bleu foncé lorsque les sections sont observées sans montage dans du PBS. Comme ce dernier provoque une diffusion de la fluorescence, nous avons photographié les cellules TB+ avant l'étape immunocytochimique. La photographie permet d'éviter la superposition de la fluorescence du TB, qui est complètement

éliminée après exposition photographique, avec la fluorescence cytoplasmique associée à la SOM après immunocytochimie.

## 2) Localisation des cellules TB+ et des cellules TB/RP/SOM

Les cellules TB+ sont observées dans plusieurs régions hypothalamiques principalement du côté ipsilatéral au site d'injection. La plus grande concentration de cellules marquées est observée dans l'étendue du VL (Fig. 15 A-C). Des neurones TB+ apparaissent dans la région périventriculaire du noyau paraventriculaire (Fig. 15A), les régions basale, latérale et périventriculaire du noyau arqué (Fig. 15 A-C), le noyau ventromédian notamment en position ventrale ou en bordure du VL (Fig. 15 A et B), la région périfornicale (Fig. 15 A-C), l'aire latérale hypothalamique (Fig. 15 A-C) et plus postérieurement dans le noyau du tuber (Fig. 15C).

Les sections du VL contenant des cellules TB+, photographiées chez les 10 animaux sélectionnés, subissent la double immunofluorescence RP/SOM. Ces sections sont à nouveau observées et les mêmes régions photographiées. Les cellules TB+, les cellules IR-RP et les cellules IR-SOM ont des distributions superposables dans le VL (Comparer Fig. 16A et 16B). Des cellules triplement fluorescentes sont trouvées dans l'extension rostro-caudale du VL (Fig. 16C). Ces cellules montrent une fluorescence bleue cytoplasmique liée au TB (Fig. 17 A et C), une fluorescence rouge nucléaire du RP provenant du Texas red (Fig. 17 B et D) et une fluorescence verte cytoplasmique associée à la SOM due au FITC (Fig. 17 B et E). Trois autres populations doublement marquées sont détectées: les cellules RP/SOM (Fig. 17B), les cellules RP/TB (Comparer Fig. 17A avec 11B) et les cellules SOM/TB (Fig. 17 C-E).

## 3) Estimation des cellules TB+ et des cellules TB/RP/SOM

La diminution rapide de la fluorescence n'a pas permis une quantification précise sous microscope de la population totale des cellules TB+ du VL après réalisation des photographies. Cependant, une appréciation rapide avant photographie des sections donne 10 à 15 cellules TB+/hémisection dans le VL, 5 cellules TB+/hémisection dans le noyau arqué, le noyau ventromédian, et la région périfornicale, et entre 1 et 5 cellules marquées/hémisection dans le noyau paraventriculaire et l'aire hypothalamique latérale.

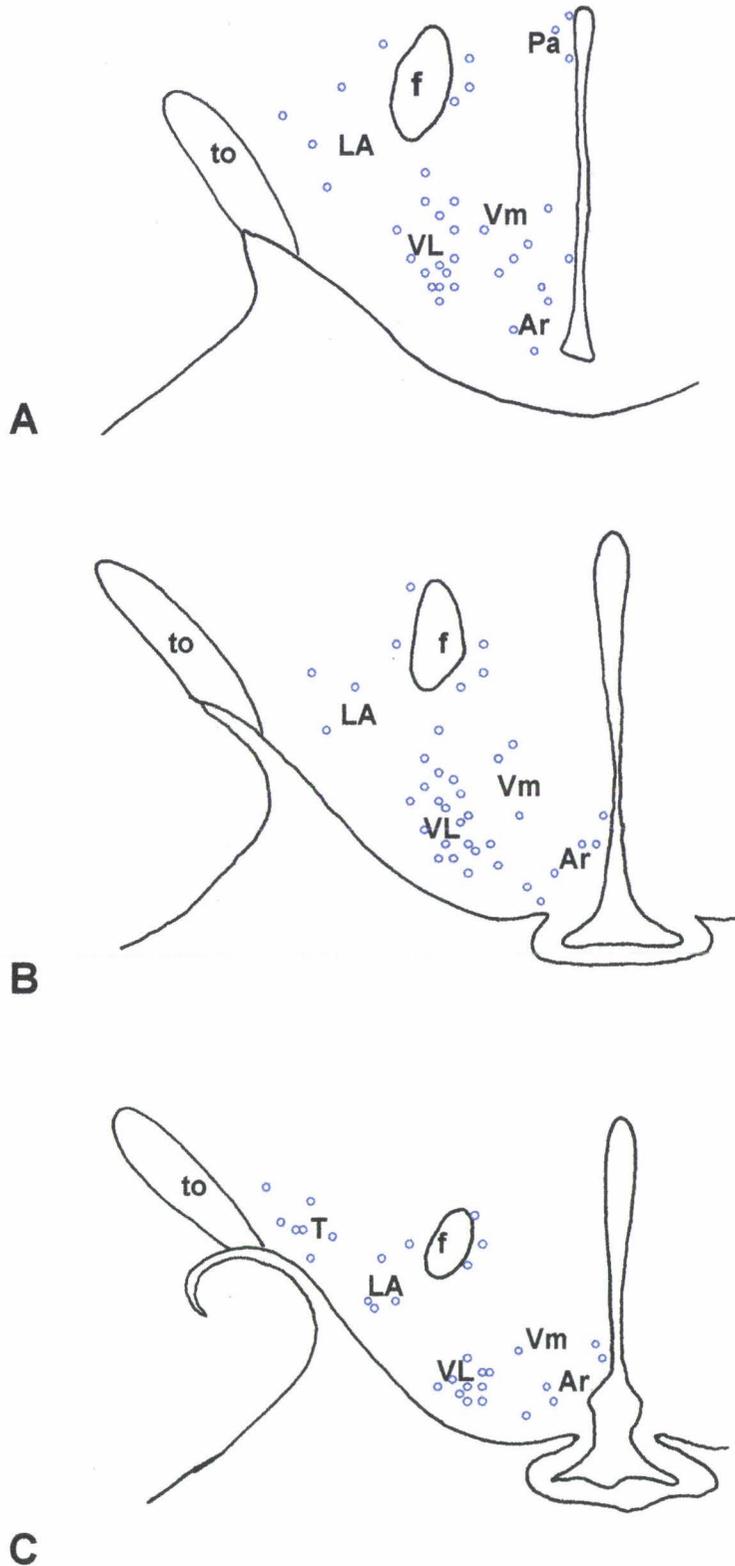
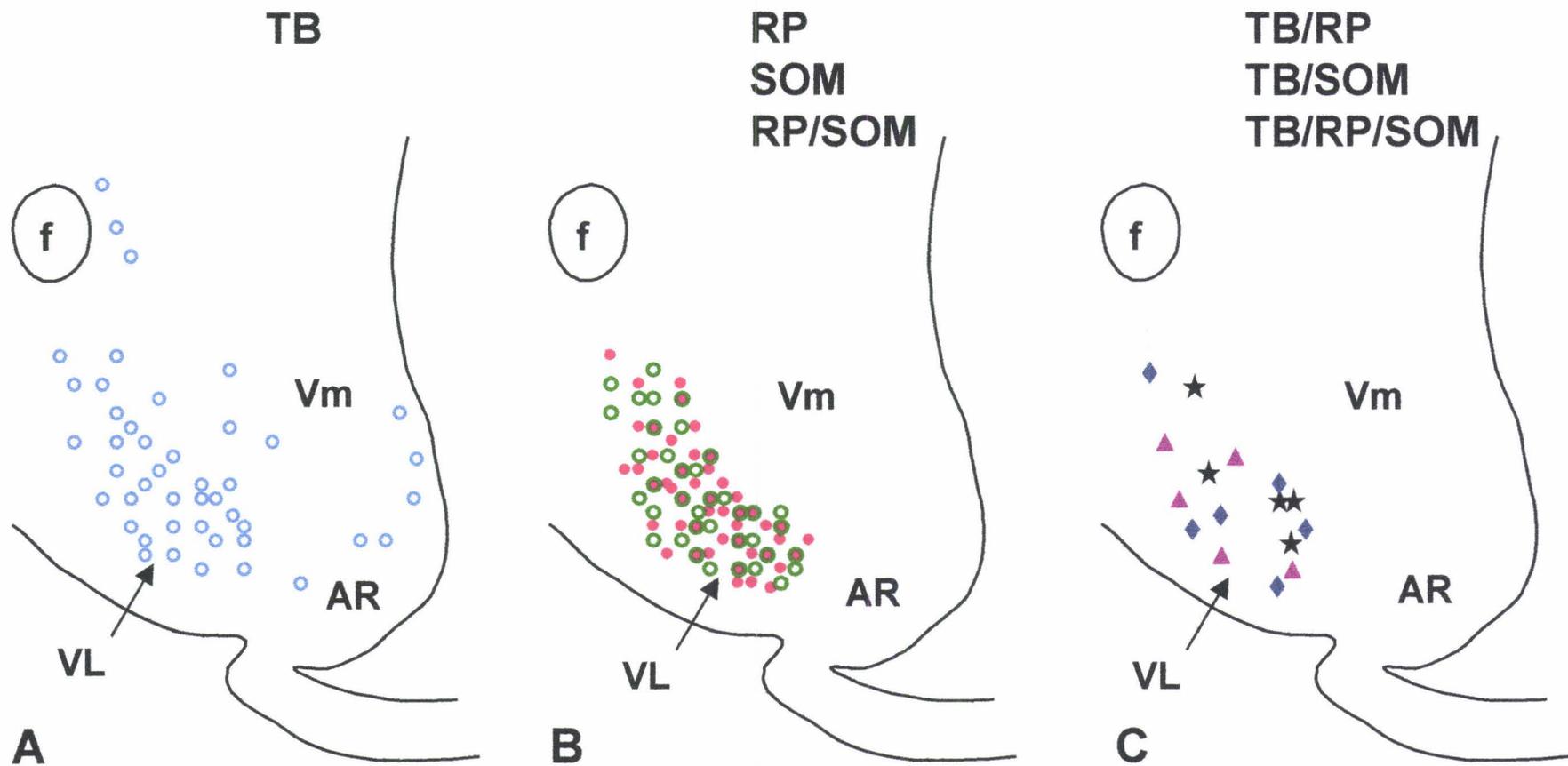


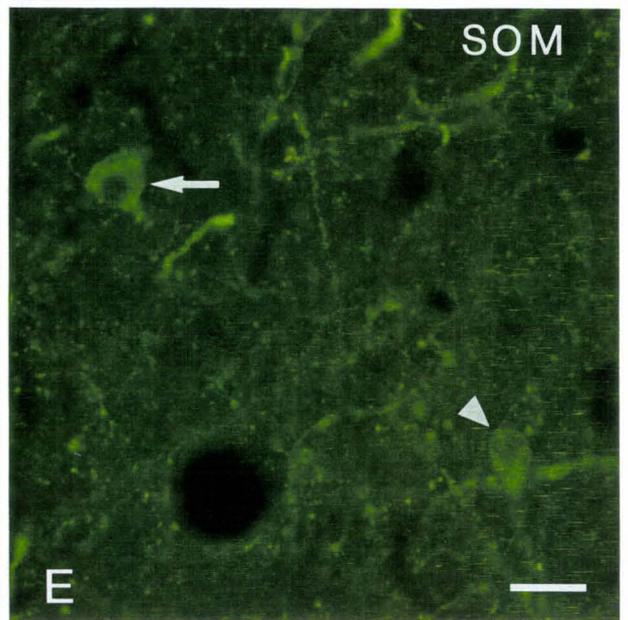
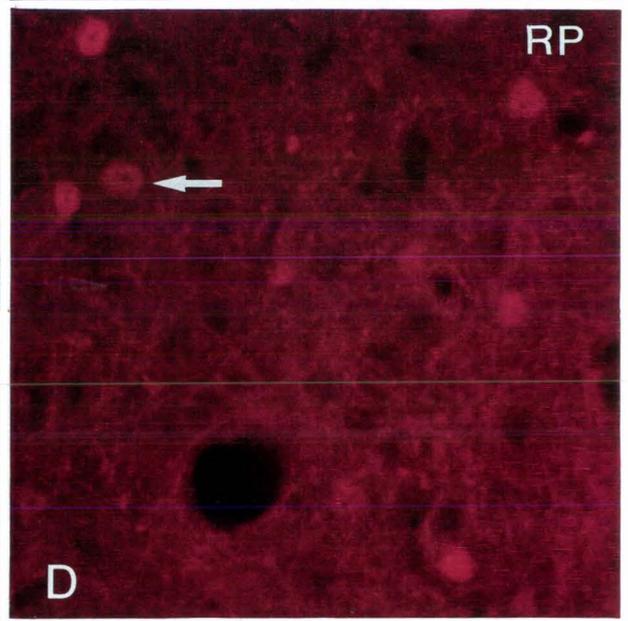
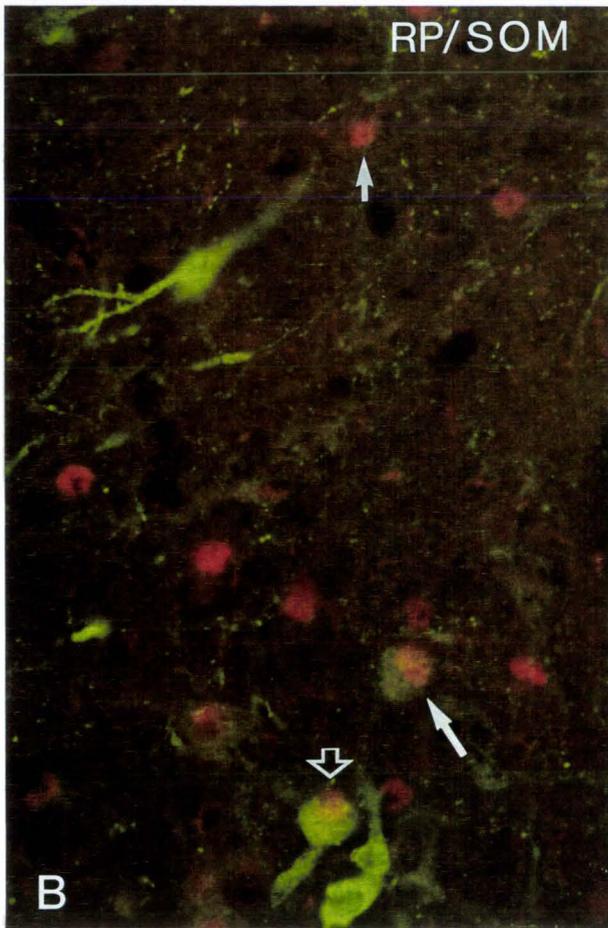
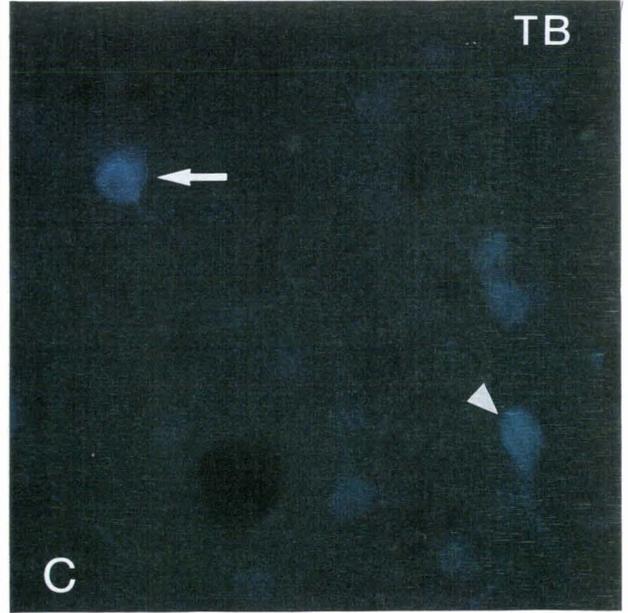
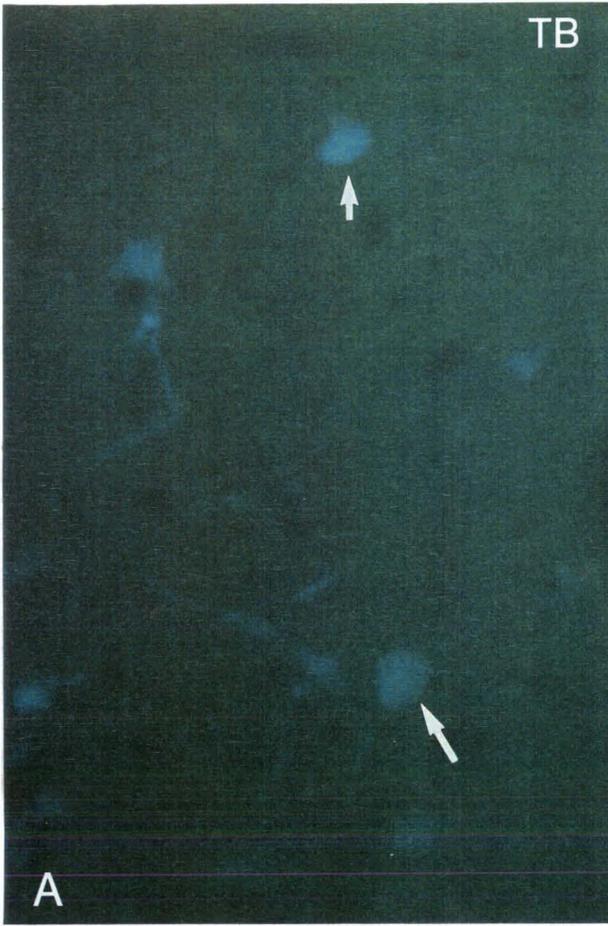
Fig 15: Schémas d'hémisection frontales (16  $\mu$ m) de l'hypothalamus du cobaye montrant la distribution des cellules TB+ (cercles bleus) dans les régions rostrale (A), médiane (B) et caudale (C) du VL. Chaque cercle correspond à une cellule marquée. Ar: noyau arqué; f: fornix; LA: aire latérale hypothalamique; Pa: noyau paraventriculaire; T: noyau du tuber; to: tractus optique; VL: noyau ventrolatéral; Vm: noyau ventromédian.

Fig. 16: Schémas d'une hémisection frontale (16  $\mu$ m) de la subdivision médiane du VL (A-C) montrant la localisation de cellules TB+ (A), des cellules RP, SOM, RP/SOM (B) et des cellules TB/RP, TB/SOM et TB/RP/SOM (C) chez des cobayes femelles GDX+EB traités par la colchicine. Chaque symbole représente une cellule marquée. AR: noyau arqué; f: fornix; VL: noyau ventrolatéral; Vm: noyau ventromédian.



- Cellule TB+
- Cellule RP
- Cellule SOM
- Cellule RP/SOM
- ◆ Cellule TB/RP
- ▲ Cellule TB/SOM
- ★ Cellule TB/RP/SOM

Fig. 17: Microphotographies de cellules du VL (A-E) marquées par le TB après transport axonal rétrograde (A et C) et immunofluorescentes pour le RP (B et D) et la SOM (B et E). Les cellules triplement marquées (grandes flèches) montrent la fluorescence bleue cytoplasmique du TB (A et C), la fluorescence rouge nucléaire associée au RP (B et D) et la fluorescence jaune-vert cytoplasmique associée à la SOM (B et E). Des cellules RP/SOM (flèches évidées, B), RP/TB (petites flèches; A et B) et TB/SOM (têtes de flèches; C-E) sont également détectées. Barre de calibration: 30  $\mu$ m.



Les cellules TB/RP/SOM ont été estimées seulement sur les sections de 5 animaux, l'observation de cellules IR-RP ou IR-SOM chez les 5 autres cobayes n'a pas été possible. Les résultats des comptages réalisés sur 50 à 110 paires de photographies/animal sont exprimés en nombre de cellules/mm<sup>2</sup> de surface de VL et révèlent la présence d'environ 8 cellules TB/RP/SOM /mm<sup>2</sup> (Tableau 5). Approximativement 12 % et 14 % des cellules IR-SOM et IR-RP du VL contiennent du TB (Tableau 6). Les cellules triplement fluorescentes représentent environ 9 % des cellules à SOM, 8 % des cellules contenant le RP et 29 % des cellules IR-RP/SOM (Tableau 6).

## **D – Description des régions marquées après injection de BV**

### 1) Aspect et localisation des cellules BV+ et des cellules BV/SOM/RP

Le marquage des cellules BV+, confiné au péricaryon des neurones, est très fin ce qui rend les cellules marquées peu fluorescentes. Elles sont observées dans les régions hypothalamiques essentiellement du côté ipsilatéral au site d'injection. Elles sont éparpillées dans le VL où leur distribution est superposable à celle des cellules IR-SOM (Fig. 18A) et des cellules IR-RP (Fig. 18B) précédemment décrites. De rares neurones BV+ sont observés dans le noyau arqué, le noyau ventromédian et la région périfornicale (Fig. 18 A). Les cellules doublement fluorescentes BV/SOM du VL sont photographiées puis l'immunocytochimie du RP est réalisée par un marquage à la peroxydase. Les régions sont à nouveau sélectionnées et photographiées. La comparaison des photographies révèle la présence, à travers l'étendue rostro-caudale du VL (Fig. 18C), de cellules triplement marquées (Fig. 19 A-F). Les cellules BV/SOM/RP montrent deux fluorescences cytoplasmiques associées aux BV (Fig. 19 A et B) et à la SOM (Fig. 19 C et D) et un précipité bleu-noir nucléaire, provenant de la réaction à la DAB intensifiée à l'imidazole, associé au RP (Fig. 19 E et F).

### 2) Estimation des cellules BV+ et des cellules BV/SOM/RP

Chaque hémisection du VL contient entre 2 et 12 cellules BV+ chez les 5 animaux sélectionnés en fonction de la localisation du site d'injection. Ce nombre

Tableau 5 : Estimation du nombre de cellules simplement (TB+, RP, SOM), doublement (RP/SOM, TB/RP, TB/SOM) et triplement marquées (TB/RP/SOM).

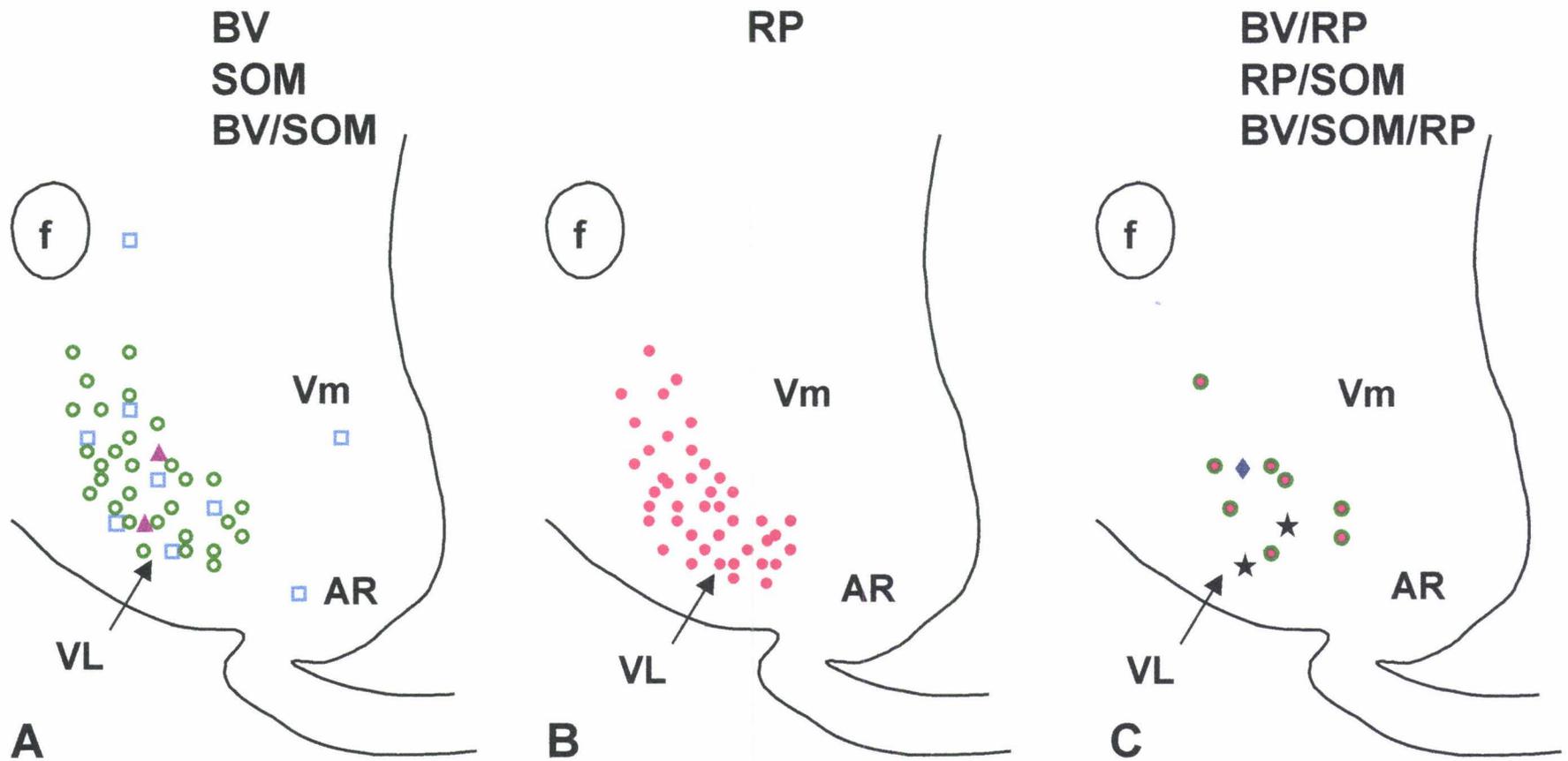
Cellules	TB+	RP	SOM	RP/SOM	TB/RP	TB/SOM	TB/RP/SOM
Nombre/mm <sup>2</sup>	57,07±10,92	112,33±7,80	91,04±9,41	29,85±2,45	19,58±3,51	15,28±2,46	8,51±2,67

Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules ( $\pm$ SEM), estimé sur les photographies du VL, qui est exprimé en nombre de cellules/mm<sup>2</sup> de surface de VL. Les comptages ont été réalisés sur 359 photographies (n=5).

Tableau 6 : Pourcentages ( $\pm$ SEM) de cellules RP/SOM, TB/RP, TB/SOM et TB/RP/SOM en fonction des population TB+, SOM, RP et RP/SOM du VL comptées sur photographies.

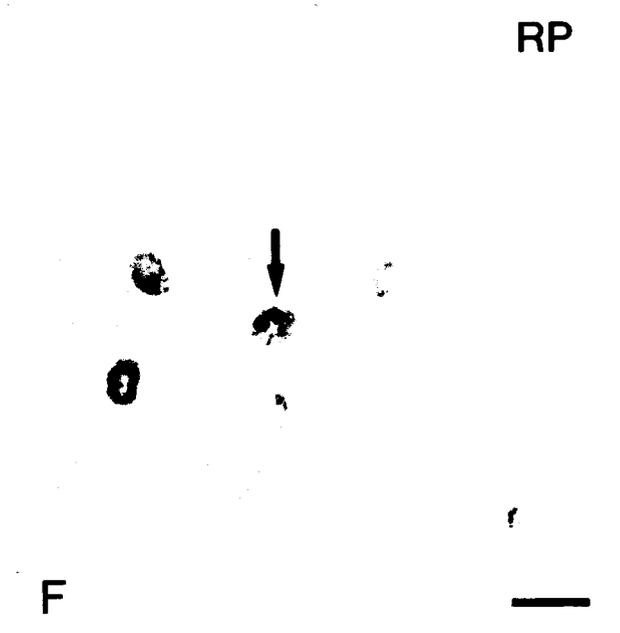
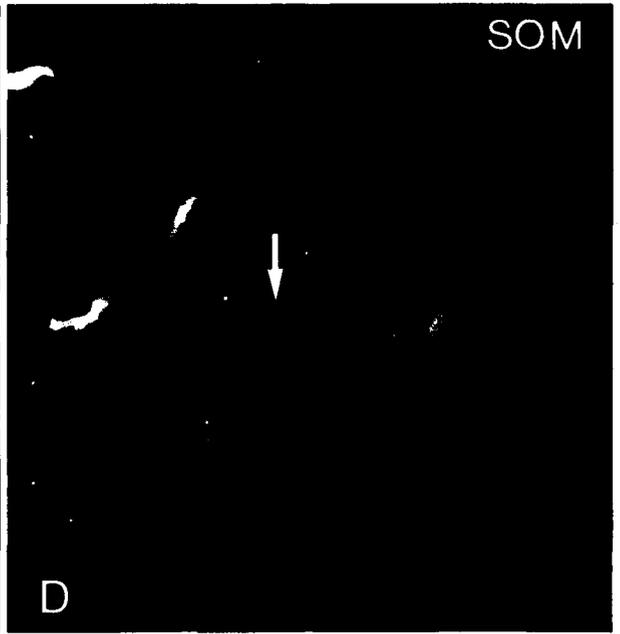
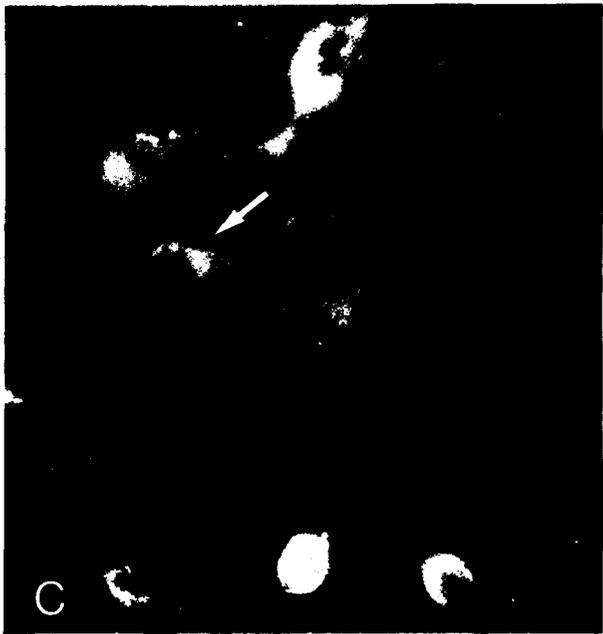
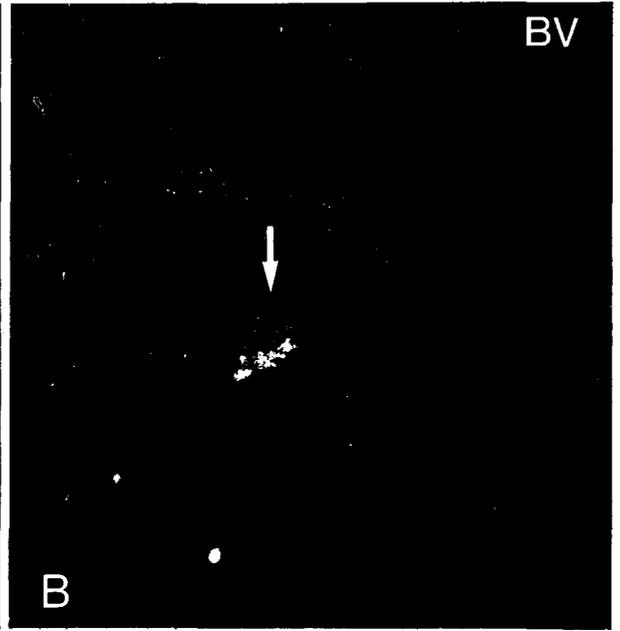
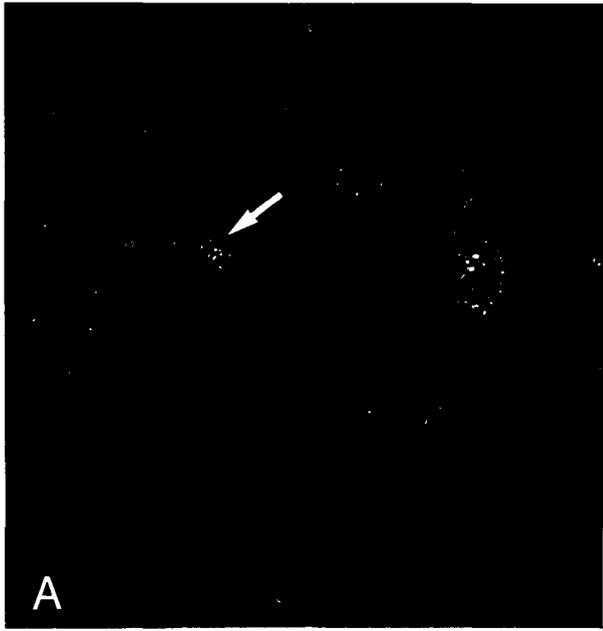
Cellules	En fonction des cellules TB+	En fonction des cellules SOM	En fonction des cellules RP	En fonction des cellules RP/SOM
RP/SOM	----	33,36±2,67	27,27±3,33	----
TB/RP	29,50±3,79	----	14,00±1,89	----
TB/SOM	21,80±3,02	12,60±0,91	----	----
TB/RP/SOM	16,42±3,31	9,37±1,08	7,64±1,05	28,91±4,41

Fig. 18: Schémas d'une hémisection frontale (16  $\mu$ m) de la subdivision médiane du VL (A-C) montrant la distribution des cellules BV+, des cellules à SOM, des neurones BV/SOM (A), des cellules contenant le RP (B) et des cellules BV/RP, RP/SOM et BV/SOM/RP (C) chez des cobayes femelles GDX+EB colchicinisés. Chaque symbole représente une cellule marquée. AR: noyau arqué; f: fornix; VL: noyau ventrolatéral ; Vm: noyau ventromédian.



- Cellule BV      ● Cellule SOM      ▲ Cellule BV/SOM      ● Cellule RP
- ◆ Cellule BV/RP      ● Cellule RP/SOM      ★ Cellule BV/SOM/RP

Fig. 19: Microphotographies des mêmes sections du VL (A-F) montrant la distribution de cellules BV+ (A et B), des cellules à SOM (C et D) et des neurones contenant le RP (E et F). La comparaison de A avec C et E et celle de B avec D et F révèlent la présence de cellules BV/SOM/RP (flèches). Barre de calibration : 21µm.



substantiel de cellules marquées nous a conduits à réaliser successivement l'immunofluorescence de la SOM puis l'immunocytochimie du RP.

Parmi les 5 animaux, 2 femelles ne montrent pas d'immunoréactivité associée à la SOM ou au RP. L'estimation quantitative est donc réalisée sur les photographies prises sur les sections de 3 femelles GDX+EB traitées par la colchicine. Environ 4 cellules BV/SOM/RP sont détectées par mm<sup>2</sup> de surface de VL (Tableau 7). Les cellules triplement marquées représentent environ 29 % des cellules IR-RP/SOM mais seulement 5 % à 7 % des cellules IR-RP et IR-SOM (Tableau 8).

#### **IV - Coexistence du RP, avec la SOM, la NT, et/ou la SP dans des cellules du VL.**

Les cellules IR-RP/SOM/NT, IR-RP/NT/SOM, IR-RP/SP/SOM et IR-RP/SP/NT ont été recherchées sur les sections de VL de 24 femelles GDX+EB colchicinisées. Pour cela, nous avons d'abord réalisé un double marquage immunofluorescent dirigé contre le RP et un neuropeptide, suivi après élimination d'une troisième réaction immunofluorescente dirigée contre un second neuropeptide. Le RP est toujours visualisé par le Texas red et les neuropeptides par le FITC.

##### **A –Distribution des cellules IR-SOM, IR-NT et IR-SP**

Les cellules à SOM montrent dans le VL (Fig. 20A) la distribution précédemment décrite au paragraphe II A. Les cellules IR-NT présentent une intensité de fluorescence homogène et sont éparpillées à travers l'étendue rostro-caudale du VL (Fig. 20B) conformément à la description rapportée par Warembourg et Jolivet (1994). Les cellules IR-SP sont observées dans l'étendue antéro-postérieure du VL (Fig. 20C) où elles présentent la même intensité de marquage. Dans la région rostrale, la majorité des cellules IR-SP sont groupées le long du noyau ventromédian, tandis que d'autres ont une localisation plus médiane. Quelques cellules sont observées dorsalement en direction du fornix. Dans la région médiane du VL, les cellules IR-SP sont réparties dans l'étendue ventro-dorsale, alors qu'au niveau caudal, elles sont éparpillées en position médio-basale. Ces résultats sont en accord avec les descriptions précédemment publiées (Nielsen et Blaustein, 1990 ; Olster et Blaustein, 1992 a, b)

Tableau 7 : Estimation du nombre de cellules simplement (BV+, SOM, RP), doublement (BV/SOM, RP/SOM, BV/RP) et triplement marquées (BV/RP/SOM).

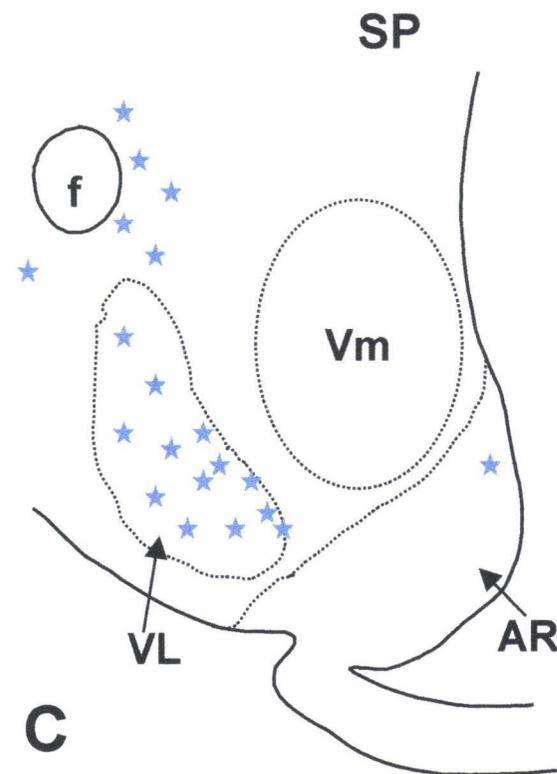
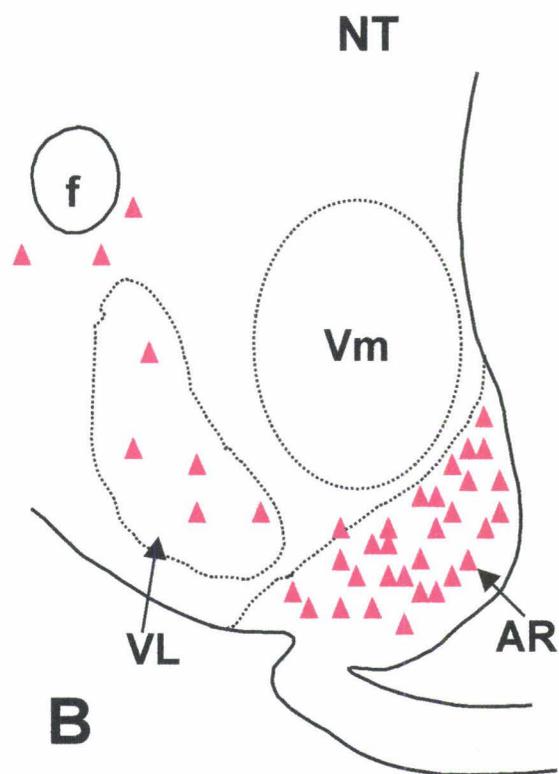
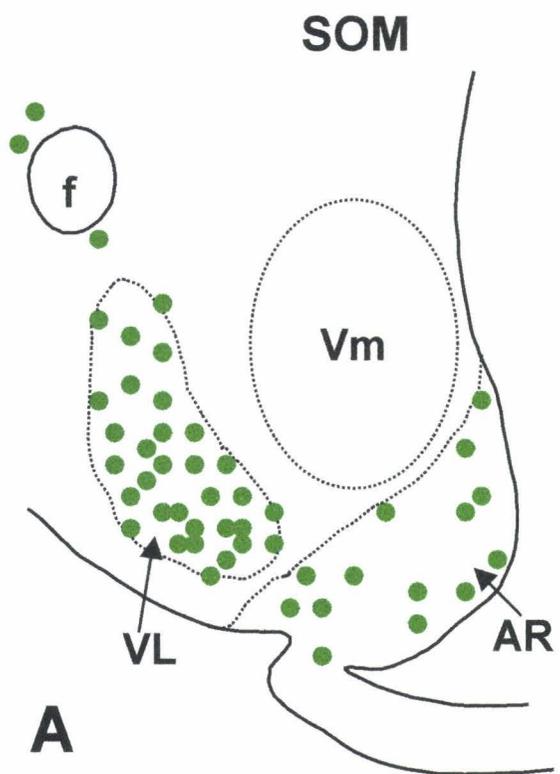
Cellules	BV+	SOM	BV/SOM	RP	RP/SOM	BV/RP	BV/RP/SOM
Nombre/mm <sup>2</sup>	12,94±2,77	60,76±4,04	7,48±0,08	79,62±3,28	15,32±2,28	6,45±0,61	4,45±0,51

Les valeurs représentent le nombre moyen de cellules (±SEM), estimé sur photographies, qui est exprimé en nombre de cellules /mm<sup>2</sup> de surface de VL. Les comptages ont été réalisés sur 165 photographies (n=3).

Tableau 8 : Pourcentages (±SEM) de cellules RP/SOM, BV/RP, BV/SOM et BV/RP/SOM en fonction des population BV+, SOM, RP et RP/SOM du VL comptées sur photographies.

Cellules	En fonction des cellules BV+	En fonction des cellules SOM	En fonction des cellules RP	En fonction des cellules RP/SOM
RP/SOM	----	24,96±2,24	19,16±2,39	----
BV/RP	42,06±4,82	----	9,04±0,65	----
BV/SOM	48,62±1,01	12,43±0,18	----	----
BV/RP/SOM	37,19±6,83	7,35±0,74	5,56±0,46	29,73±3,41

Fig. 20: Schémas d'hémisections frontales de 16  $\mu\text{m}$  de la subdivision médiane du VL de femelles GDX+EB traitées par la colchicine montrant la distribution des cellules IR-SOM (A), IR-NT (B) ou IR-SP (C). Chaque symbole représente une cellule IR. AR: noyau arqué; f: fornix; VL: noyau ventrolatéral ; Vm: noyau ventromédian.



● Cellule IR-SOM

▲ Cellule IR-NT

★ Cellule IR-SP

La comparaison des distributions de ces trois populations cellulaires révèle quelques différences à travers le VL. Au niveau rostral, les cellules à SOM, qui sont les plus fluorescentes, bordent l'aire hypothalamique latérale, alors que les cellules à SP sont observées principalement le long du noyau ventromédian et dorsalement en direction du fornix. Au niveau médian, les populations des cellules à SOM (Fig. 21A) et des neurones à SP (Fig. 21C) sont plus importantes que la population des neurones à NT (Fig. 21B). Les cellules à SOM représentent une population substantielle au niveau caudal, alors que les cellules IR-NT et IR-SP sont rarement visualisées.

## **B – Cellules doublement IR**

### 1) Localisation des cellules doublement IR

La localisation des cellules IR-RP/SOM (Fig. 22A) correspond à celle précédemment décrite. Les cellules IR-RP/NT sont distribuées à travers le VL (Fig. 22B) sans localisation privilégiée dans les subdivisions du noyau. Des neurones IR-RP/SP sont détectés dans l'étendue rostro-caudale du VL. Au niveau rostral, ils sont groupés le long du noyau ventromédian et dans la partie ventrale du noyau. Au niveau médian, les cellules doublement IR sont visualisées dans l'étendue ventro-dorsale du noyau où elles occupent préférentiellement le niveau médian (Fig. 22 C et D). Caudalement, les cellules IR–RP/SP sont peu nombreuses et souvent localisées en position basale.

### 2) Estimation des cellules doublement IR

L'analyse quantitative a été réalisée sous le microscope sur 24 à 28 hémisections/animal sur un total de 15 femelles GDX+EB traitées par la colchicine.

Les cellules IR-RP/SOM comptées sur les sections de VL chez 3 animaux représentent environ 33 % des cellules IR–SOM et 28 % des cellules IR–RP (Tableau 9). Approximativement un quart des cellules à NT du VL comptées chez 4 animaux sont doublement IR, alors que seulement 5 % de la population des cellules IR–RP contient la NT (Tableau 9). Environ 20 % des cellules IR-SP du VL estimées chez 8 femelles contiennent des RP ; ce qui représente environ 10 % des neurones IR–RP (Tableau 9).

Fig. 21: Microphotographies de cellules immunofluorescentes pour la SOM (A), la NT (B) ou la SP (C) dans le VL de cobayes femelles GDX+EB traités par la colchicine. Barre de calibration: 63  $\mu\text{m}$ .

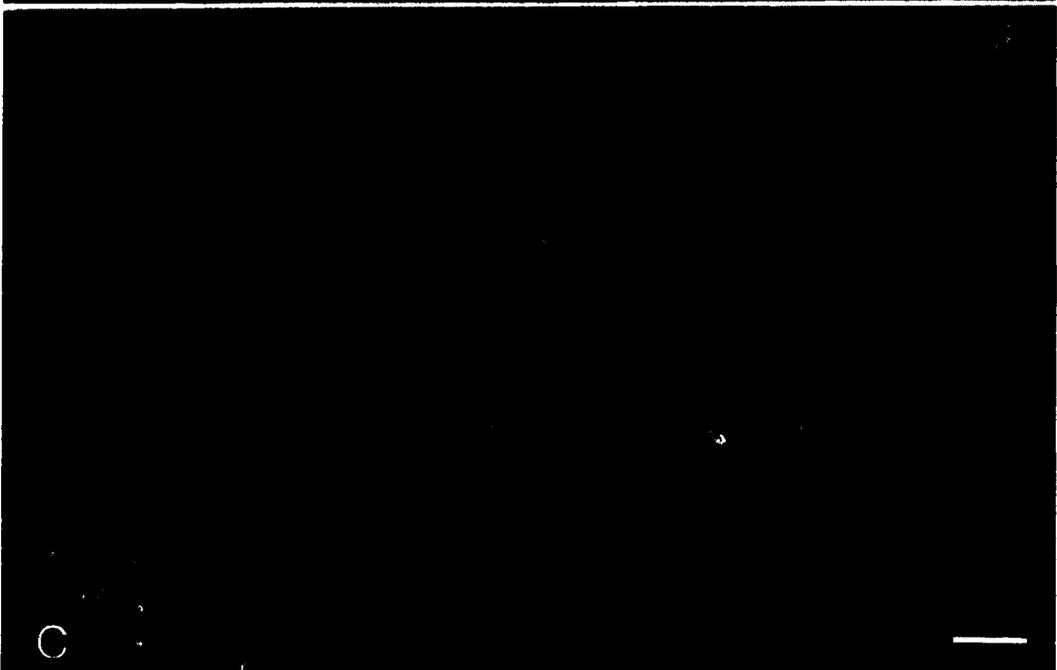
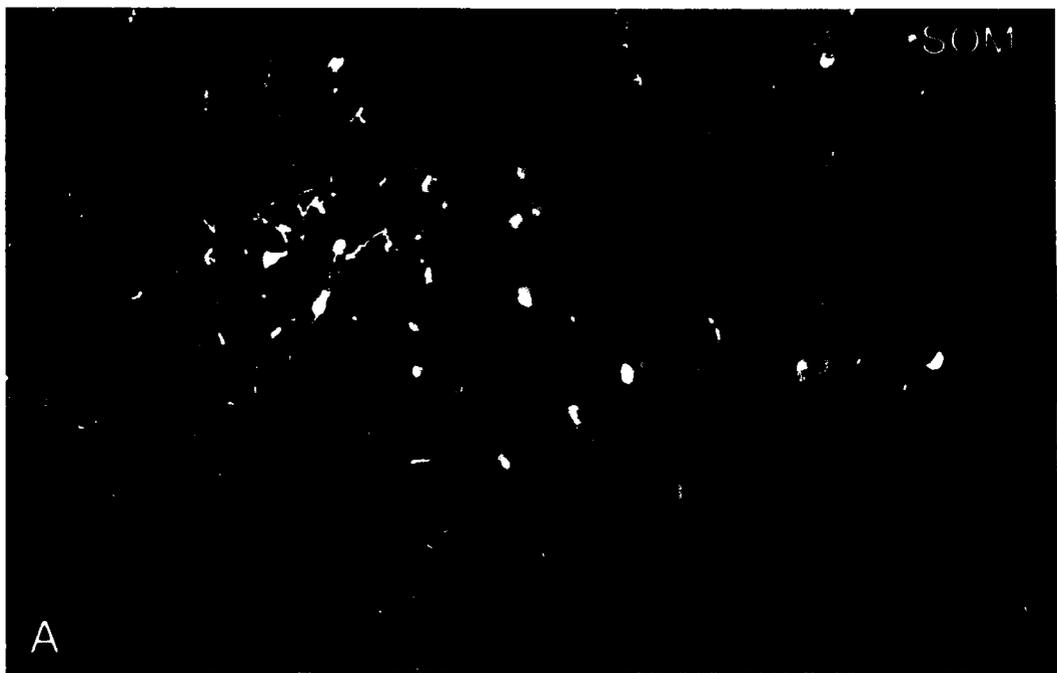
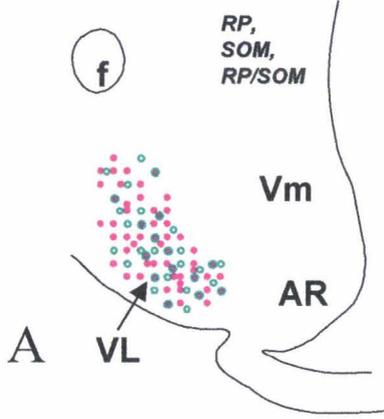
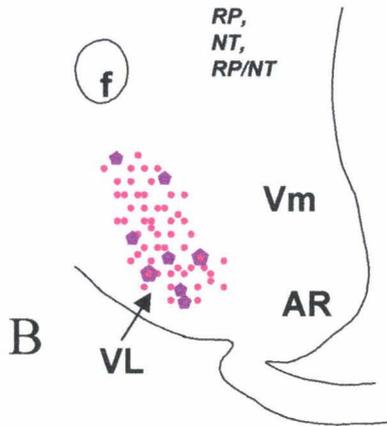
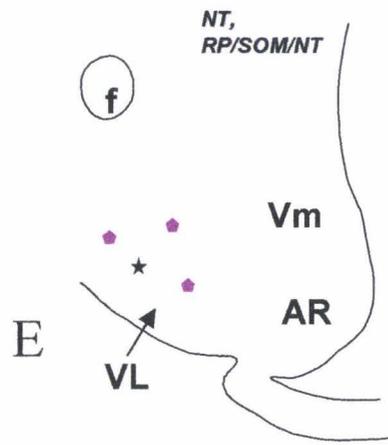


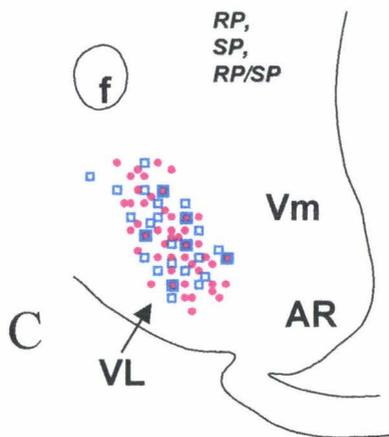
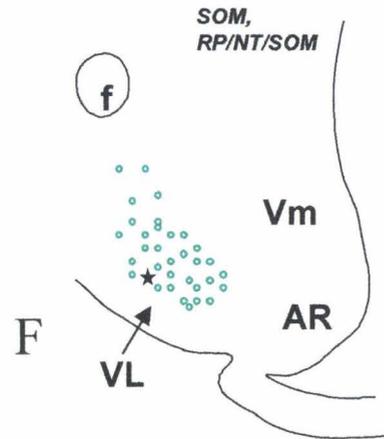
Fig. 22: Schémas d'hémisections frontales de VL (A-H) de 32  $\mu\text{m}$  d'épaisseur montrant la localisation des cellules IR-RP/SOM/NT (A et E), des cellules IR-RP/NT/SOM (B et F), des cellules IR-RP/SP/SOM (C et G) et des cellules IR-RP/SP/NT (D et H). Chaque symbole représente une cellule IR. AR: noyau arqué; Vm: noyau ventromédian; f: fornix; VL: noyau ventrolatéral.



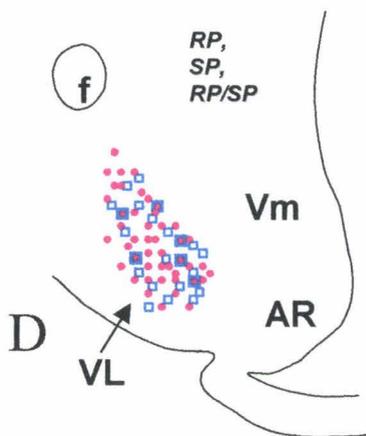
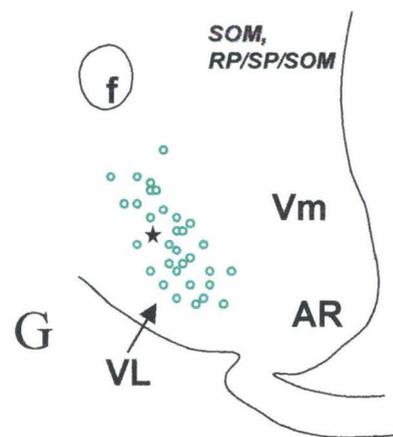
RP/SOM/NT



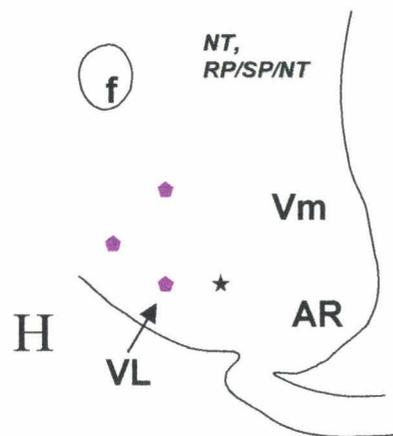
RP/NT/SOM



RP/SP/SOM



RP/SP/NT



• RP,    ◦ SOM,    ◐ RP/SOM,    ◆ NT,    ◆ RP/NT,

Tableau 9 : Estimation des cellules IR-RP, IR-SOM, IR-NT ou IR-SP, des cellules doublement IR du VL et des pourcentages de cellules doublement IR en fonction des populations simplement marquées.

	Nombre de cellules IR-RP /hémisection	Nombre de cellules IR-SOM /hémisection	Nombre de cellules IR-NT /hémisection	Nombre de cellules IR-SP /hémisection	Nombre de cellules doublement IR /hémisection	% de cellules IR-neuropeptide contenant le RP	% de cellules IR-RP contenant le neuropeptide
RP/SOM	29,67±3,08	25,19±2,87	-----	-----	8,90±2,54	33,77±6,86	28,73±6,07
RP/NT	24,79±2,83	-----	4,45±0,51	-----	1,10±0,13	24,90±2,05	4,68±0,84
RP/SP	23,76±1,98	-----	-----	12,20±1,27	2,79±0,29	20,19±0,84	10,31±1,03

Les valeurs représentent le nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules comptées sur 24 à 28 hémisections /animal dans le VL de cobayes femelles GDX+EB colchicinisés.

## C – Neurones triplement IR

La comparaison des photographies, prises après la double immunofluorescence (RP + premier neuropeptide) avec celles réalisées après l'immunocytochimie du second neuropeptide, révèle quelques cellules triplement IR (IR-RP/SOM/NT, IR-RP/SP/SOM et IR-RP/SP/NT), disséminées dans le VL (Fig. 22 E-H), qui montrent une fluorescence rouge nucléaire associée au RP et deux fluorescences vertes cytoplasmiques correspondant aux neuropeptides (Fig. 23 A-G). Les comptages des cellules triplement marquées ont été effectués sur les photographies de cellules du VL prises chez les 24 animaux expérimentés.

### *-Cellules IR-RP/SOM/NT et cellules IR-RP/NT/SOM*

Les cellules contenant à la fois le RP, la NT et la SOM (Fig. 22A, B, E et F), comptées sur photographies des sections de VL de 10 animaux, sont peu nombreuses (Tableau 10) quel que soit l'ordre de détection immunofluorescente des 2 neuropeptides (soit la SOM en premier et la NT en second, ou inversement). Une surface de 1 mm<sup>2</sup> de VL montre en moyenne 2 cellules triplement IR pour 70 et 110 cellules IR-RP (Tableau 10). Les cellules IR-RP/SOM/NT représentent 2 % des cellules IR-SOM et 5 % des cellules IR-RP/SOM (Fig. 24). Les neurones IR-RP/NT/SOM (Fig. 23 A-C) représentent 14 % des cellules à NT et 22 % des cellules IR-RP/NT (Fig. 24). Ces populations cellulaires triplement IR représentent environ 3 % des cellules IR-RP (Fig. 24).

### *-Cellules IR-RP/SP/SOM*

Les comptages sur photographies des sections de VL de 6 animaux mettent en évidence la présence d'environ 2 cellules IR-RP/SP/SOM par mm<sup>2</sup> de surface de VL (Fig. 22 C et G), pour 88 cellules IR-RP et 12 cellules IR-RP/SP (Tableau 10). Les cellules IR-RP/SP/SOM (Fig. 23 D et E) représentent 3 % des cellules IR-RP, 9 % des cellules à SP, 19 % des cellules IR-RP/SP et 5 % des cellules à SOM (Fig. 25).

### *-Cellules IR-RP/SP/NT*

L'analyse quantitative sur photographies des sections de VL de 8 cobayes révèle l'existence de seulement 1 cellule triplement IR par mm<sup>2</sup> (Fig. 22 D et H) pour

Fig. 23: Après photographie dans le VL (A-G) de la double réaction immunofluorescente dirigée contre le RP (A) et la NT (B) ou contre le RP et la SP (D et F), et élution, la SOM (C et E) ou la NT (G) sont détectées sur les mêmes sections. La comparaison de A avec B et C, celle de D avec E, et celle de F avec G révèlent la présence de cellules triplement IR (grandes flèches). Les têtes de flèches indiquent des cellules doublement IR. Barre de calibration : 30  $\mu\text{m}$  (A-C) et 35 $\mu\text{m}$  (D-G).

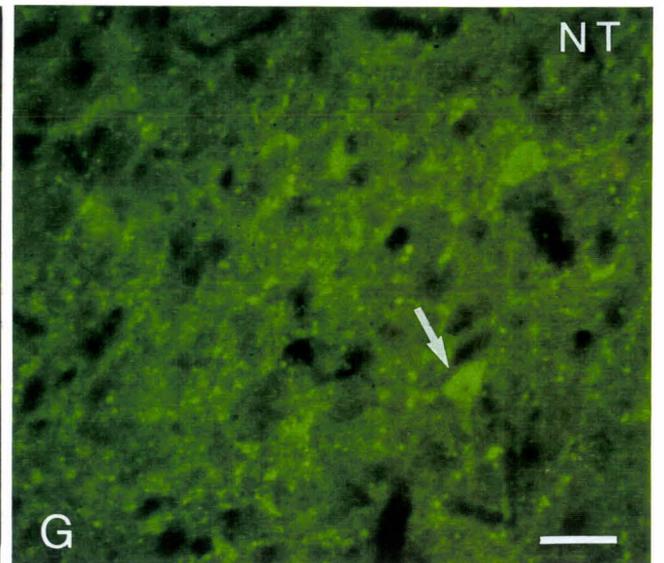
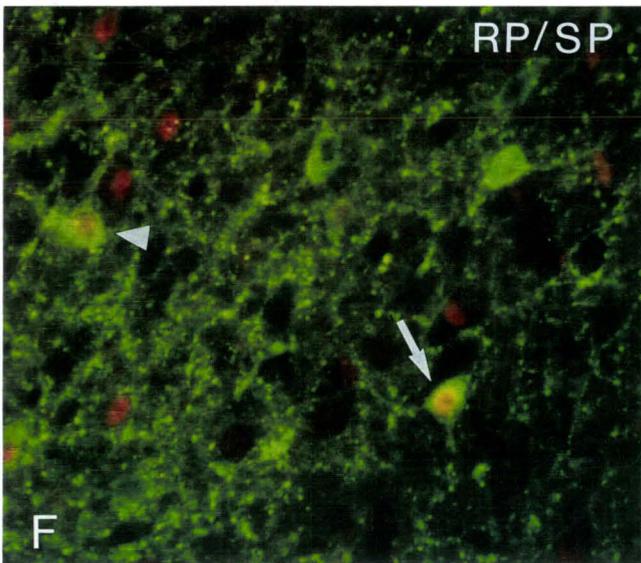
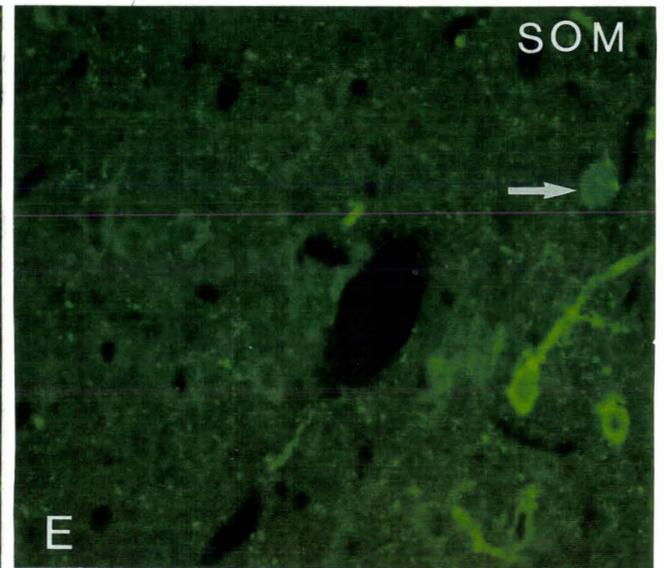
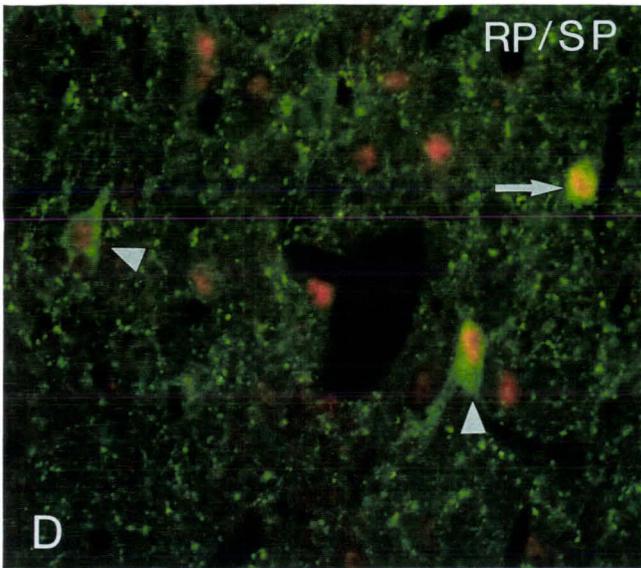
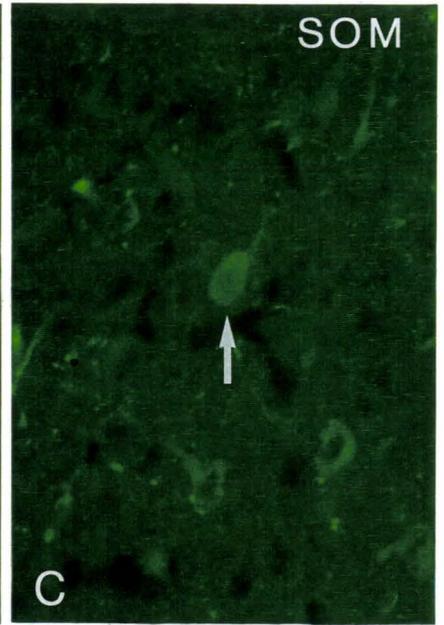
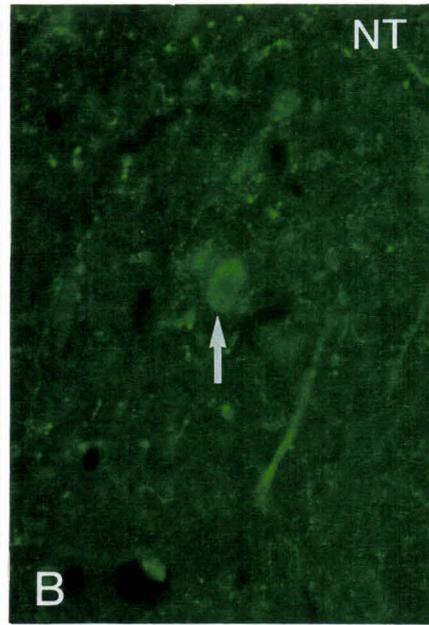
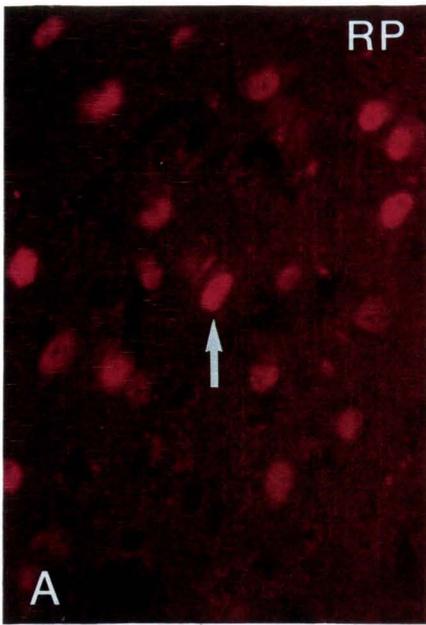


Tableau 10: Nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules simplement, doublement et triplement IR par  $\text{mm}^2$  de surface de VL.

RP/SOM/NT (n=5) : comptages sur 80 paires de photographies

Cellules IR-RP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SOM / $\text{mm}^2$	Cellules IR-RP/SOM / $\text{mm}^2$	Cellules IR-NT / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SOM/NT / $\text{mm}^2$	Cellules triplement-IR / $\text{mm}^2$
71,6 $\pm$ 6,2	70,4 $\pm$ 6,6	31,0 $\pm$ 6,3	8,4 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 1,4	1,5 $\pm$ 0,8

RP/NT/SOM (n=5) : comptages sur 85 paires de photographies

Cellules IR-RP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-NT / $\text{mm}^2$	Cellules IR-RP/NT / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SOM / $\text{mm}^2$	Cellules IR-NT/SOM / $\text{mm}^2$	Cellules triplement-IR / $\text{mm}^2$
113,3 $\pm$ 12,0	17,8 $\pm$ 2,4	10,3 $\pm$ 0,7	39,8 $\pm$ 5,1	2,7 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,5

RP/SP/SOM (n=6) : comptages sur 107 paires de photographies

Cellules IR-RP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-RP/SP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SOM / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SP/SOM / $\text{mm}^2$	Cellules triplement-IR / $\text{mm}^2$
87,9 $\pm$ 12,8	28,4 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 1,1	48,4 $\pm$ 6,0	3,4 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,3

RP/SP/NT (n=8) : comptages sur 104 paires de photographies

Cellules IR-RP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-RP/SP / $\text{mm}^2$	Cellules IR-NT / $\text{mm}^2$	Cellules IR-SP/NT / $\text{mm}^2$	Cellules triplement-IR / $\text{mm}^2$
76,0 $\pm$ 13,0	34,8 $\pm$ 4,2	12,9 $\pm$ 1,7	6,1 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,3

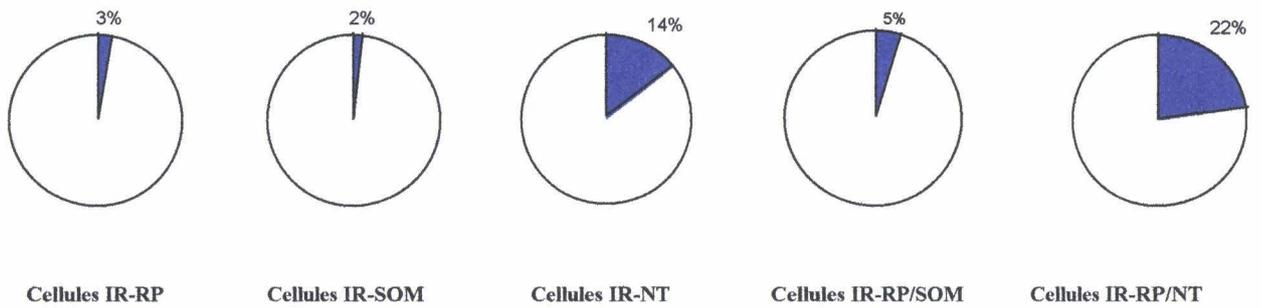


Fig 24: Cellules IR-RP/SOM/NT. La portion bleue des diagrammes circulaires représente le pourcentage de cellules triplement IR en fonction des cellules IR-RP, IR-SOM, IR-NT, IR-RP/SOM et IR-RP/NT.

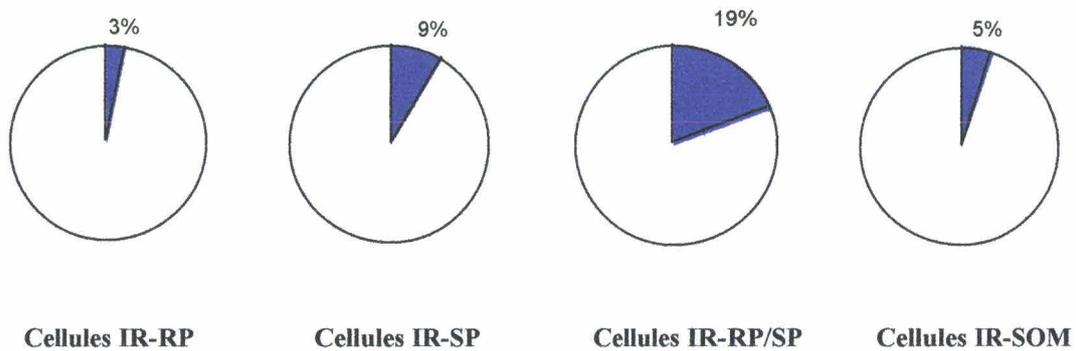


Fig 25: Cellules IR-RP/SP/SOM. La partie bleue des diagrammes circulaires représente le pourcentage de cellules triplement IR en fonction des cellules IR-RP, IR-SP, IR-RP/SP et IR-SOM.

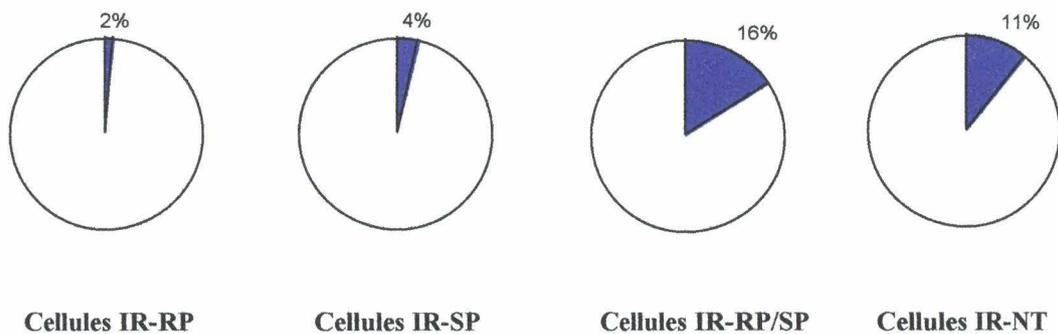


Fig 26: Cellules IR-RP/SP/NT. La partie bleue des diagrammes circulaires représente le pourcentage de cellules triplement IR en fonction des cellules IR-RP, IR-SP, IR-RP/SP et IR-NT.

76 neurones IR–RP et 35 cellules à SP (Tableau 10). Les cellules IR–RP/SP/NT (Fig. 23 F et G) représentent environ 2 % des cellules IR–RP, 4 % des cellules à SP, 16 % des neurones IR–RP/SP et 11 % des cellules à NT (Fig. 26).

L'analyse quantitative révèle qu'environ 3 % des cellules IR–RP contiennent de la SOM et de la NT (Fig. 24), 3 % de la SP et de la SOM (Fig. 25) et 2 % de la SP et de la NT (Fig. 26).

## **V - Influence des œstrogènes sur les immunoréactivités SOM, NT et SP dans le VL**

Les cellules IR-RP n'étant visualisables qu'après traitement des animaux par les œstrogènes, nous avons étudié les effets de ce traitement sur l'immunoréactivité de chaque population neuropeptidergique dans le VL et les avons comparé à ceux obtenus dans le noyau arqué. Pour cela, nous avons compté le nombre de cellules IR-SOM, IR-NT ou IR-SP dans 3 groupes d'animaux traités par la colchicine constitués de: 4 femelles GDX, 4 femelles GDX+EB et 4 femelles GDX+huile. Pour chaque peptide, l'analyse quantitative est réalisée sur 12 sections chez chaque animal.

L'intensité de l'immunomarquage associé à la SOM est constante dans le VL entre les 3 groupes d'animaux (Comparer Fig. 27A avec B). Cependant le nombre moyen de cellules IR–SOM /hémisection est supérieur chez les animaux GDX+EB (environ 27 cellules), par rapport à celui obtenu chez les animaux GDX ou GDX+huile (environ 14 cellules) (Fig. 28A). Cet effet des œstrogènes sur le nombre de cellules à SOM est significatif ( $p < 0,05$ ) et spécifique au VL puisque les comptages obtenus dans le noyau arqué ne mettent pas en évidence de variation significative entre les 3 groupes d'animaux (Fig 28 A).

La population des cellules à NT dans le VL n'est pas significativement influencée par les œstrogènes puisque d'une part l'immunomarquage est d'intensité constante entre les 3 groupes d'animaux (Comparer Fig. 27C avec D) et que d'autre part, on dénombre 4 cellules IR–NT/hémisection environ quel que soit le groupe d'animaux examinés (Fig. 28B). De la même façon, ni le nombre ni l'intensité du marquage des cellules IR-NT ne sont significativement modifiés par les œstrogènes dans le noyau arqué (Fig. 28B).

Fig. 27: Photographies de cellules IR pour la SOM (A et B), la NT (C et D) et la SP (E et F) dans le VL de femelles traitées par la colchicine GDX+EB (A, C et E) et GDX (B, D et F). Barre de calibration: 67  $\mu$ m.

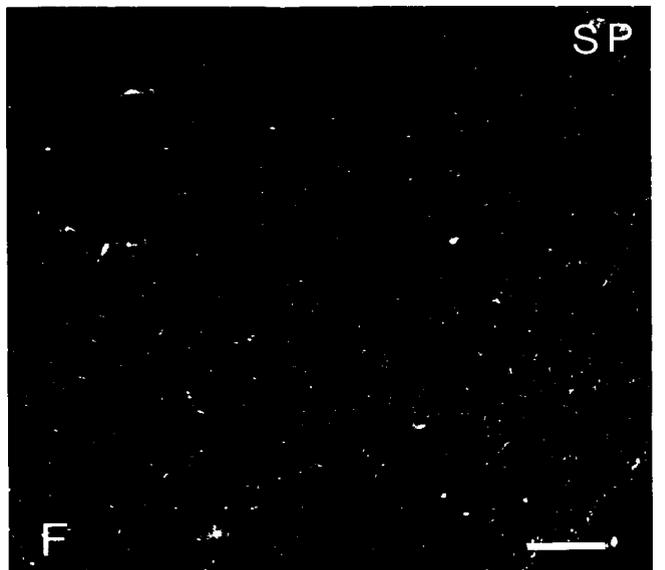
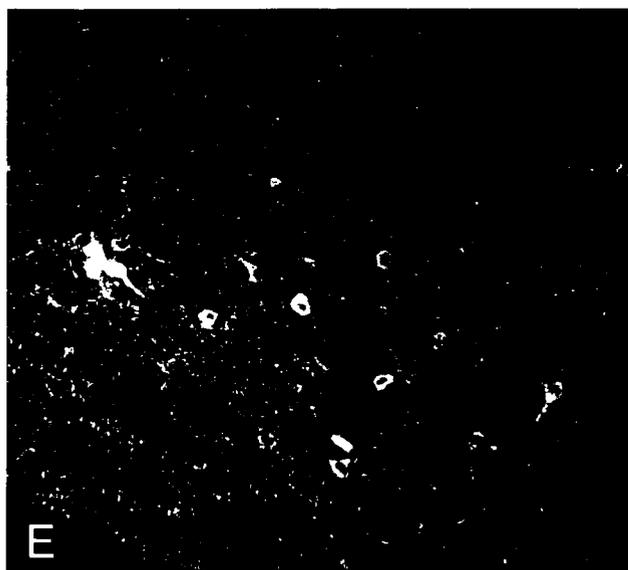
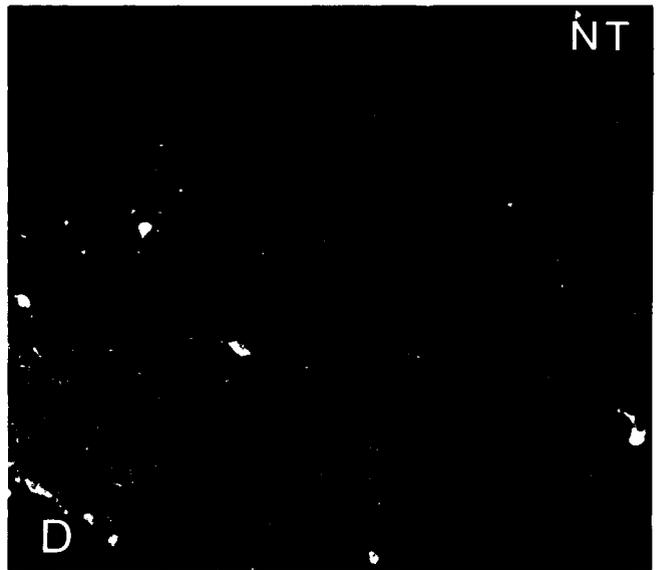
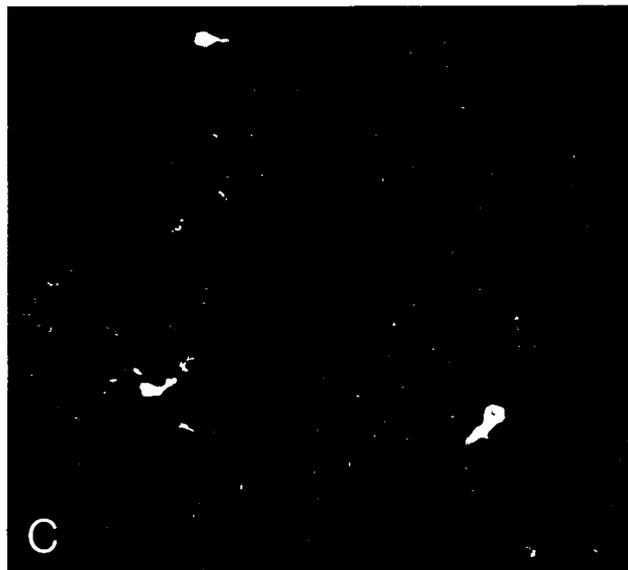
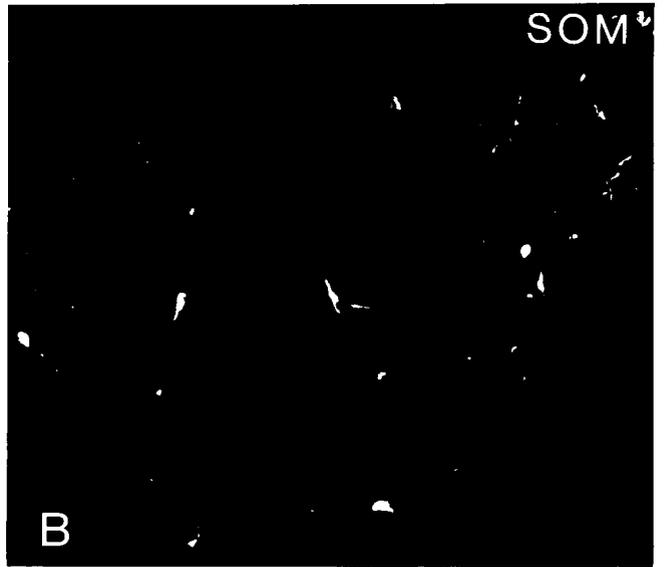
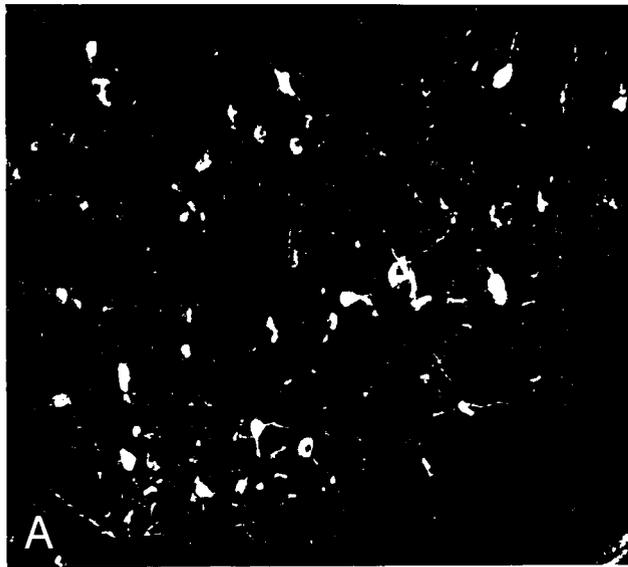
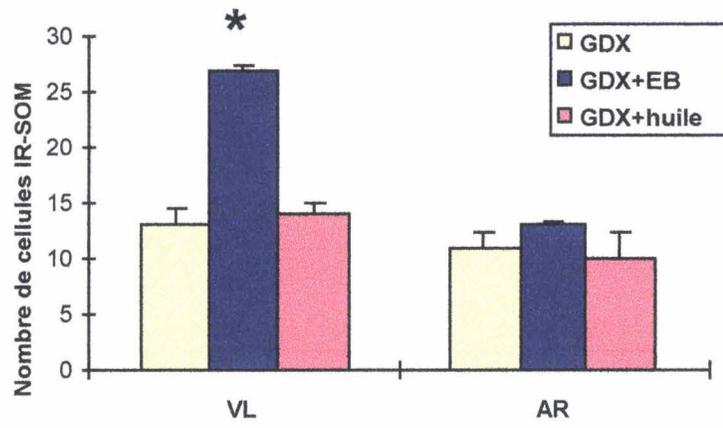


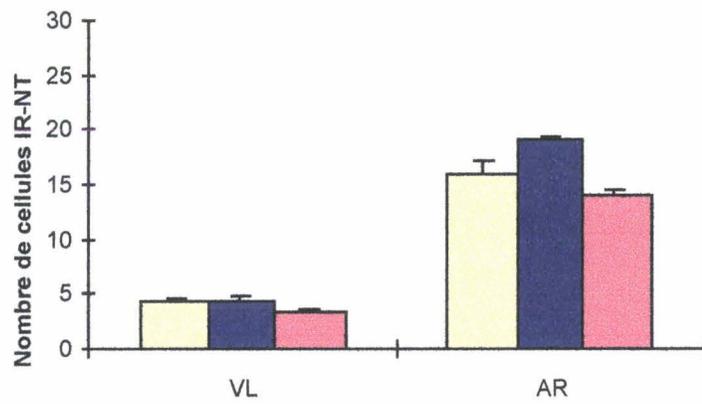
Fig. 28: Nombres de cellules IR-SOM (A), IR-NT (B) et IR-SP (C) par hémisection dans le VL et le noyau arqué (AR) de cobayes femelles colchicinisées : GDX, GDX+EB et GDX+huile. Les barres d'histogramme représentent les moyennes ( $\pm$ SEM) obtenues à partir de comptages réalisés sur 12 sections dans chaque région chez 4 cobayes/groupe. \* différence significative ( $p < 0.05$ ; ANOVA+ test de Student-Newman-Keuls) entre animaux GDX+EB et animaux GDX ou GDX+huile.

### SOM



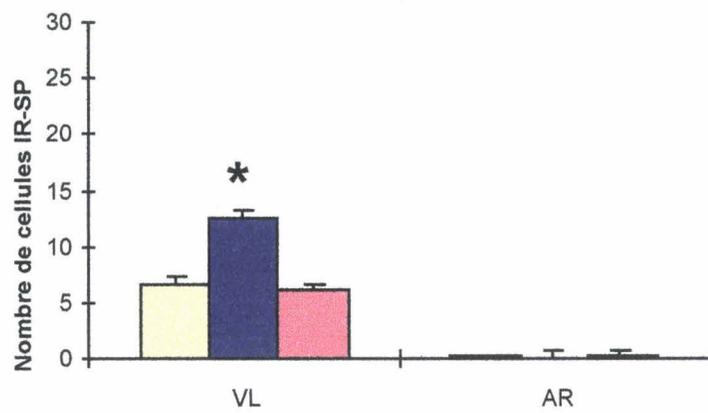
A

### NT



B

### SP



C

L'immunoréactivité associée à la SP semble sous le contrôle des œstrogènes dans le VL car d'une part, l'intensité du marquage des cellules IR-SP semble plus grande chez les animaux GDX+EB que chez les animaux GDX (Comparer Fig. 27E avec F). D'autre part, chez les animaux traités par les œstrogènes 12 cellules/hémisection sont comptées contre 6 cellules chez les groupes témoins (Fig. 28C). Le nombre moyen de cellules IR-SP/hémisection chez les animaux GDX+EB est donc pratiquement doublé. Cette augmentation est significative ( $p < 0,05$ ) et semble spécifique au VL puisque dans le noyau arqué, le nombre de cellules IR-SP est inférieur à 1 cellule/hémisection dans chacun des 3 groupes expérimentaux.

## **VI - Colocalisation du RP avec la NOS et avec l'un des neuropeptides précédemment étudiés dans des cellules du VL**

Cette colocalisation a été recherchée à travers l'étendue rostro-caudale du VL sur les sections de 12 femelles GDX+EB colchicinisées, au moyen d'un triple marquage immunocytochimique.

### **A – Cellules doublement IR (RP/NOS)**

Les cellules IR-NOS montrent une fluorescence vert-jaune cytoplasmique provenant du FITC (Fig. 29A). Leur localisation dans l'hypothalamus du cobaye, et en particulier dans le VL, a été décrite récemment (Warembourg et al., 1999). Dans les deux tiers antérieurs du VL, les cellules IR-NOS sont disséminées à travers son étendue ventro-dorsale alors que dans la région caudale, la plupart des cellules marquées sont groupées en position médio-basale (Fig. 30). Les cellules IR-RP, montrant la fluorescence rouge associée au Texas red (Fig. 29B), ont une distribution superposable à celle des cellules IR-NOS dans le VL (Fig. 30). Des neurones IR-RP/NOS (Fig. 29C) sont observés à travers l'étendue du VL (Fig. 30). Ils apparaissent moins nombreux dans les régions rostrale et médiane où ils représentent environ 35 % et 33 % de la population des cellules IR-NOS qu'au niveau caudal où environ 47% des cellules IR-NOS possèdent des RP (Tableau 11). La population IR-RP/NOS représente 22 % à 33 % des cellules cibles de la progestérone à travers l'étendue du VL (Tableau 11).

Fig. 29: Microphotographies de cellules du VL (A-C) IR pour la NOS (A et C) et le RP (B et C). Les cellules IR-RP/NOS (flèches) possèdent une fluorescence rouge nucléaire associée au RP et une fluorescence verte cytoplasmique pour la NOS. Barre de calibration: 30  $\mu\text{m}$

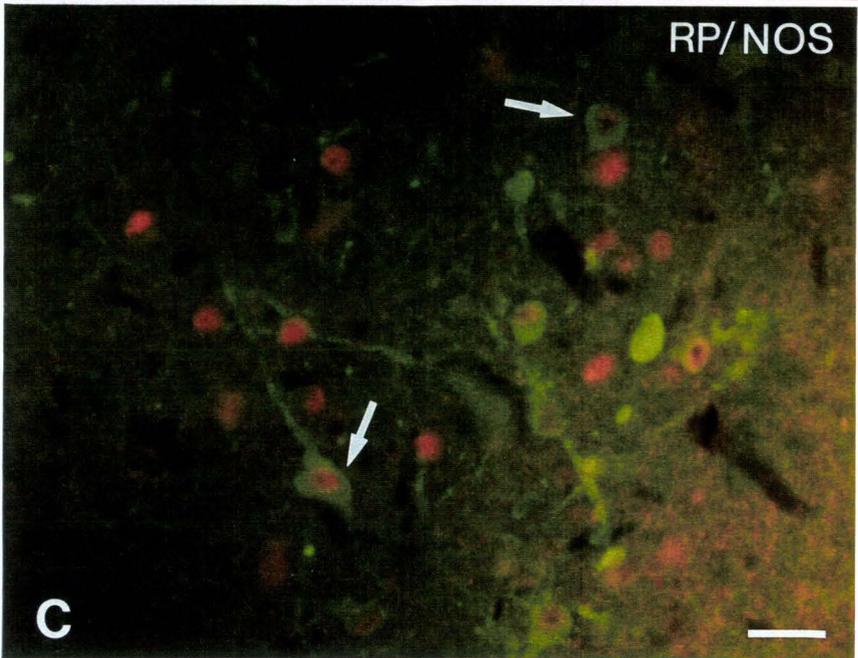
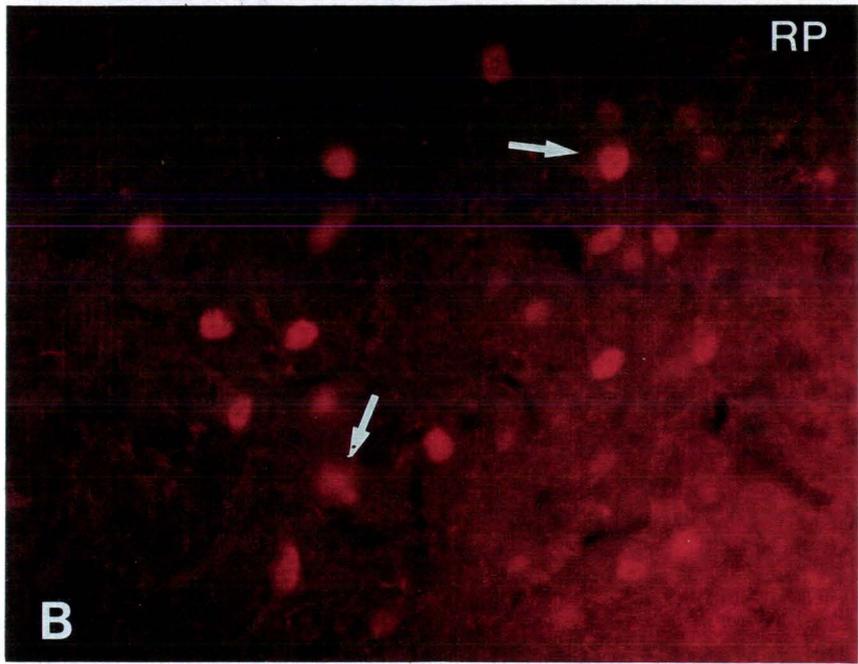
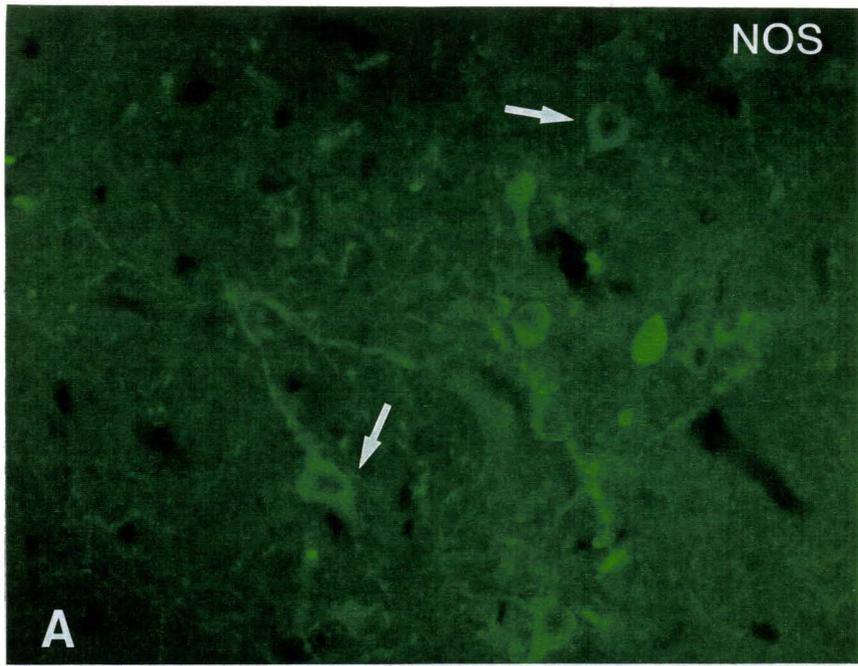
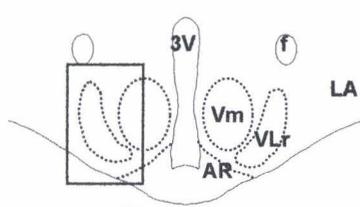
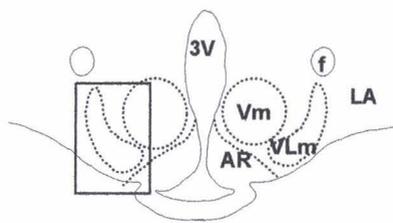


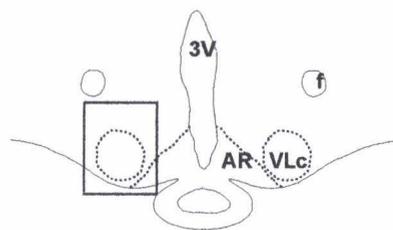
Fig. 30: Schémas d'hémisections frontales de 16  $\mu\text{m}$  montrant la localisation des cellules IR-RP/NOS/SOM (A, B et C), IR-RP/NOS/NT (D, E et F) et IR-RP/NOS/SP (G, H et I) dans les subdivisions rostrale (A, D et G), médiane (B, E et H) et caudale (C, F et I) du VL. La situation sur des coupes d'hypothalamus des subdivisions représentées dans les hémisections est signalée dans les cadres sur les schémas en haut de la figure. Chaque symbole représente une cellule IR. AR: noyau arqué; f: fornix; LA: aire hypothalamique latérale; VLr, VLm, VLc: subdivisions rostrale, médiane et caudale du noyau ventrolatéral; Vm: noyau ventromédian; 3V: troisième ventricule.



A

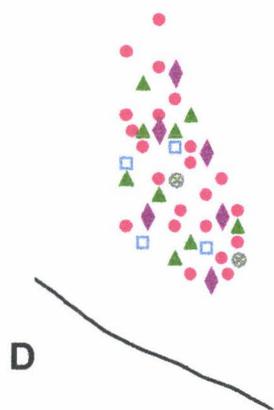


B

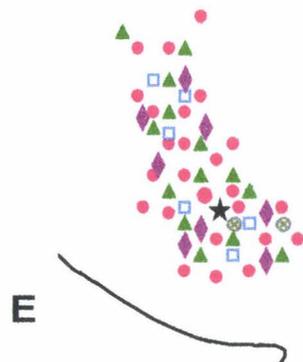


C

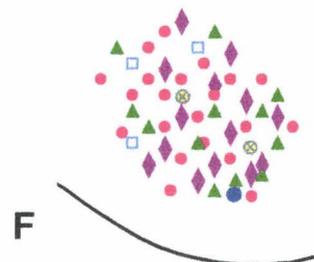
RP/NOS/SOM



D

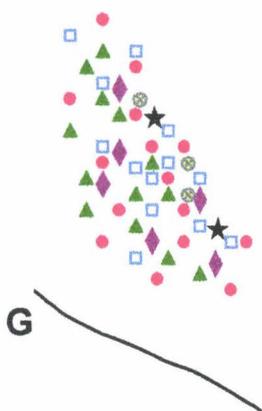


E

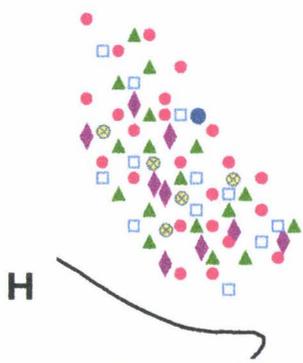


F

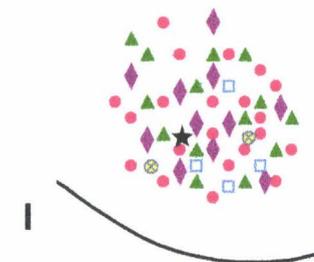
RP/NOS/NT



G



H



I

RP/NOS/SP

● RP; ▲ NOS; □ Neuropeptide; ◆ RP/NOS; ⊗ RP/Neuropeptide; ● NOS/Neuropeptide;  
★ RP/NOS/Neuropeptide.

Tableau 11 : Pourcentages de cellules IR-RP/NOS en fonction des populations de cellules IR-RP et IR-NOS dans le VL du cobaye.

Région du VL :	% de cellules IR-NOS avec RP	% de cellules IR-RP avec NOS
rostrale	35,77±2,60	22,05±2,71
médiane	33,81±2,43	22,98±1,84
caudale	47,67±2,75	33,41±2,45

Les cellules IR sont comptées sur 15 hémisection dans chaque région du VL. Toutes les valeurs représentent des moyennes ( $\pm$ SEM) obtenues pour 4 animaux.

## **B - Cellules triplement IR**

### 1) Cellules IR-RP/NOS/SOM

Les cellules IR-RP/NOS/SOM (Fig. 31 A-E) sont observées à travers l'étendue du VL (Fig. 30 A-C). Chaque hémisection de VL contient environ 1 cellule triplement IR dans les subdivisions rostrale et médiane, alors qu'au niveau caudal elle montre en moyenne 4 cellules (Tableau 12). Dans ces trois régions, la plupart des cellules IR-NOS/SOM sont triplement IR (Tableau 12). Les cellules IR-RP/NOS/SOM représentent environ 5 % des cellules IR-RP, 8 % des cellules IR-NOS et 7 % des cellules IR-SOM dans les deux tiers antérieurs du VL, alors qu'au niveau caudal, elles représentent respectivement 10 %, 15 % et 15,5 % de ces trois populations (Fig. 32). Selon les régions du VL, entre 23 % et 33 % des cellules IR-RP/NOS entre 30 % et 40 % des cellules IR-RP/SOM, et entre 75 % et 87 % des cellules IR-NOS/SOM sont triplement marquées (Fig. 32).

### 2) Cellules IR-RP/NOS/NT

Les cellules triplement IR sont observées uniquement dans les régions médiane et caudale du VL (Fig. 30 D-F) où elles sont sporadiquement détectées (Tableau 13). Les cellules IR-RP/NOS/NT représentent moins de 1 % des cellules simplement IR et IR-RP/NOS, et moins de 2 % des neurones IR-RP/NT dans les deux tiers postérieurs du VL (Fig. 33). Entre 5 % et 10 % des cellules IR-NOS/NT contiennent des RP dans ces régions (Fig. 33).

### 3) Cellules IR-RP/NOS/SP

Les cellules IR-RP/NOS/SP sont observées à travers le VL (Fig. 30 G-I). Elles sont plus nombreuses dans la région rostrale que dans les deux tiers postérieurs, mais leur nombre moyen/hémisection n'atteint jamais une cellule (Tableau 14). Elles représentent moins de 2 % des cellules simplement marquées dans chacune des subdivisions du VL (Fig. 34). Moins de 7 % des cellules IR-RP/NOS (Fig. 31 F) et IR-RP/SP (Fig. 31 F et G) sont triplement IR au niveau rostral, alors que dans les deux tiers postérieurs moins de 3 % sont IR-RP/NOS/SP. De 25

Fig. 31: Photographies de cellules du VL (A-G) après incubation des sections avec les anticorps anti-RP (A, C et F), anti-NOS (A, D et F), et anti-SOM (B et E) ou anti-SP (G). La comparaison de A avec B, et celle de C avec D et E révèlent la présence de cellules triplement IR (grandes flèches). Les cellules IR-RP/NOS (flèches évidées) sont détectées soit, avec le filtre B/G/R qui permet la détection simultanée des deux immunoréactivités (A et F) soit, en passant du filtre N2.1 au filtre L4 qui permettent respectivement l'observation du RP (C) et de la NOS (D). Les têtes de flèches indiquent des cellules IR-RP/SOM (C et E) ou IR-RP/SP (F et G). Barre de calibration: 28  $\mu\text{m}$ .

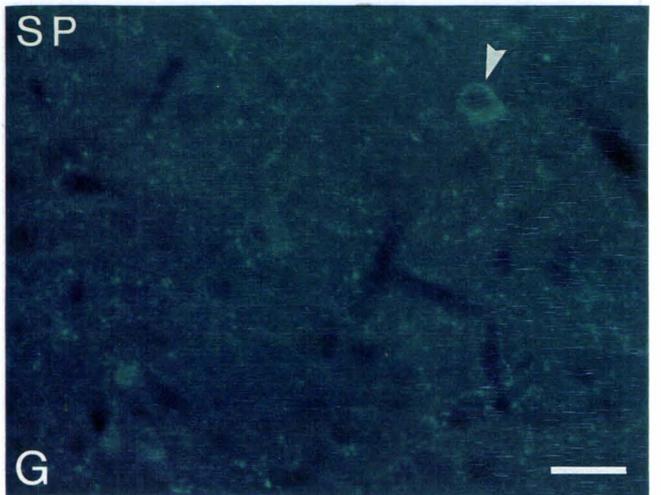
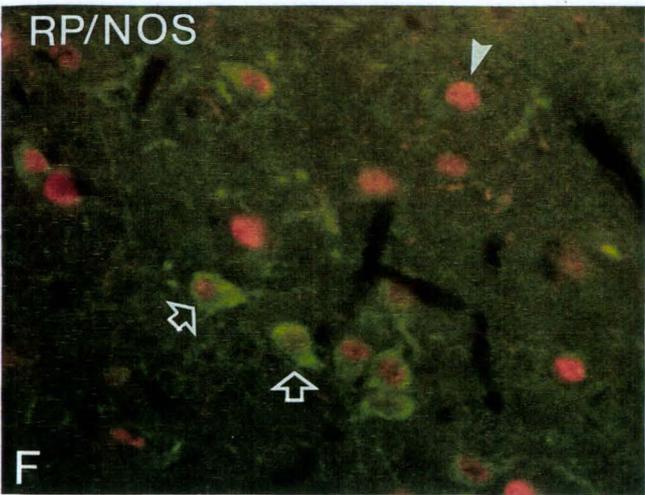
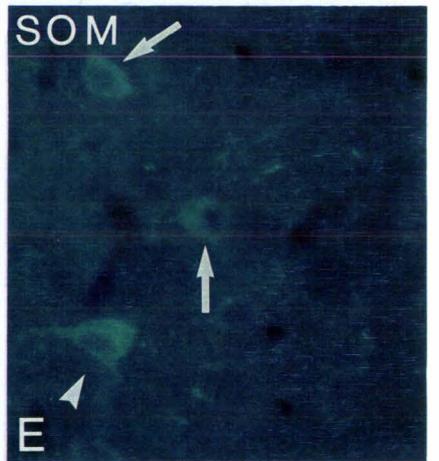
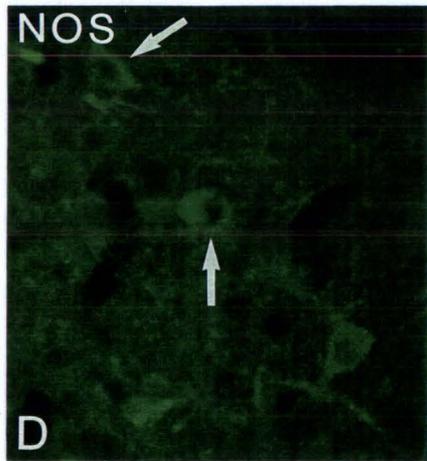
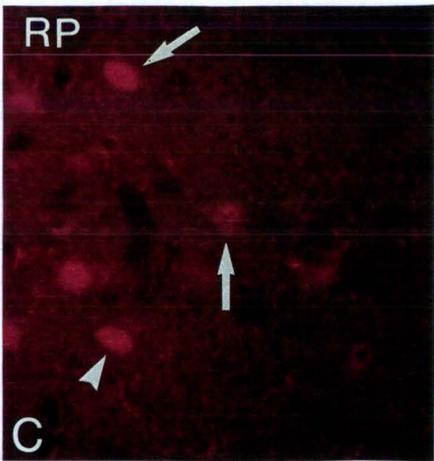
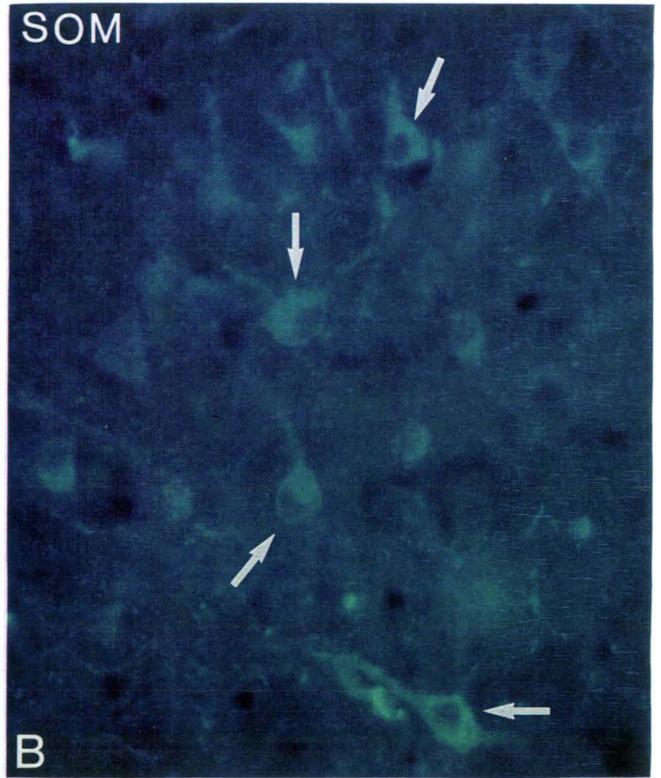
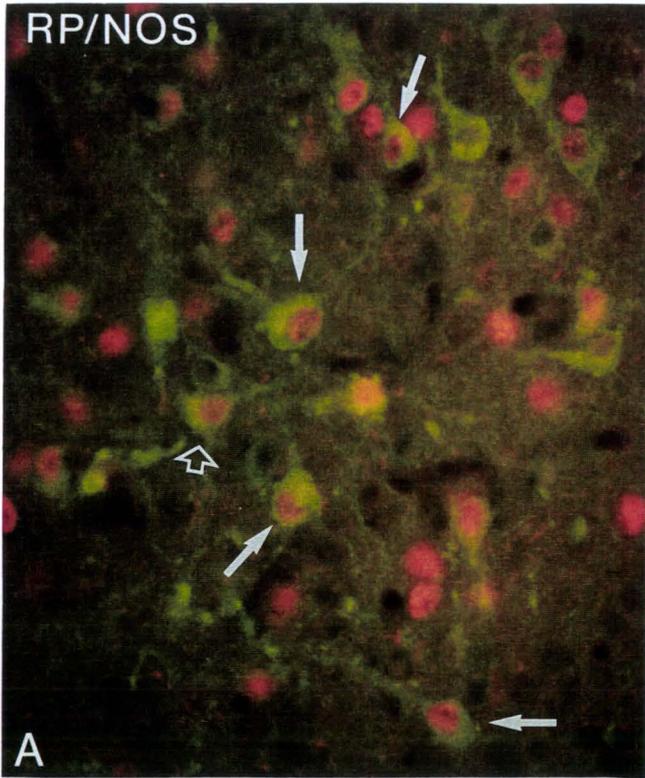


Tableau 12 : Détection des cellules IR-RP/NOS/SOM

Cellules IR	subdivisions		
	VLr	VLm	VLc
RP	29,37 ± 1,76	35,43 ± 2,88	38,84 ± 1,87
NOS	16,97 ± 1,18	22,18 ± 1,26	25,28 ± 2,51
RP/NOS	5,72 ± 0,55	7,93 ± 1,00	11,19 ± 1,28
SOM	18,72 ± 1,21	23,34 ± 3,07	25,17 ± 3,38
RP/SOM	3,97 ± 0,39	5,96 ± 0,98	9,85 ± 1,63
NOS/SOM	1,64 ± 0,15	2,23 ± 0,45	4,39 ± 0,69
RP/NOS/SOM	1,25 ± 0,15	1,63 ± 0,36	3,83 ± 0,64

Les valeurs représentent les nombres moyens ( $\pm$ SEM) de cellules simplement, doublement et triplement IR /hémisection dans les subdivisions rostrale (VLr), médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL du cobaye femelle (n=4). L'estimation est réalisée sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL.

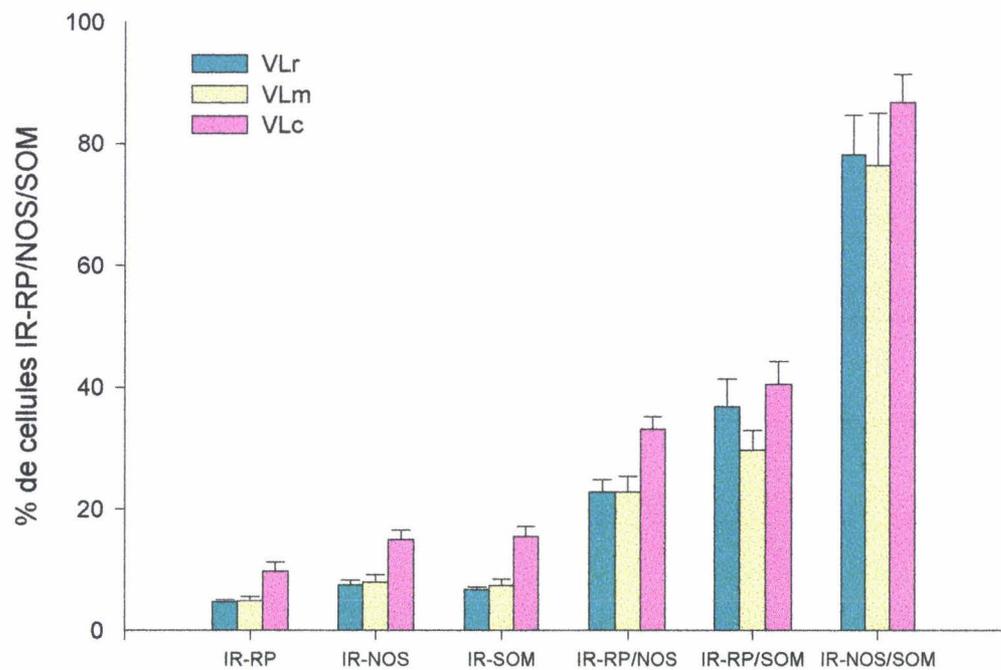


Fig. 32: Pourcentages de cellules IR-RP/NOS/SOM en fonction des populations totales de neurones IR-RP, IR-NOS, IR-SOM, IR-RP/NOS, IR-RP/SOM et IR-NOS/SOM dans les subdivisions rostrale (VLr), médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL.

Tableau 13 : Détection des cellules IR-RP/NOS/NT

Cellules IR	subdivisions		
	VLr	VLm	VLc
RP	30,25 ± 1,91	36,24 ± 2,02	35,93 ± 1,43
NOS	15,10 ± 1,46	22,96 ± 2,00	26,12 ± 0,88
RP/NOS	6,30 ± 0,63	8,74 ± 0,91	13,84 ± 0,57
NT	6,24 ± 0,43	9,36 ± 0,67	6,45 ± 0,22
RP/NT	1,96 ± 0,17	2,59 ± 0,18	1,76 ± 0,12
NOS/NT	0,12 ± 0,04	0,46 ± 0,19	0,31 ± 0,08
RP/NOS/NT	0	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Les valeurs représentent les nombres moyens ( $\pm$ SEM) de cellules simplement, doublement et triplement IR /hémisection dans les subdivisions rostrale (VLr), médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL du cobaye femelle (n=4). L'estimation est réalisée sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL.

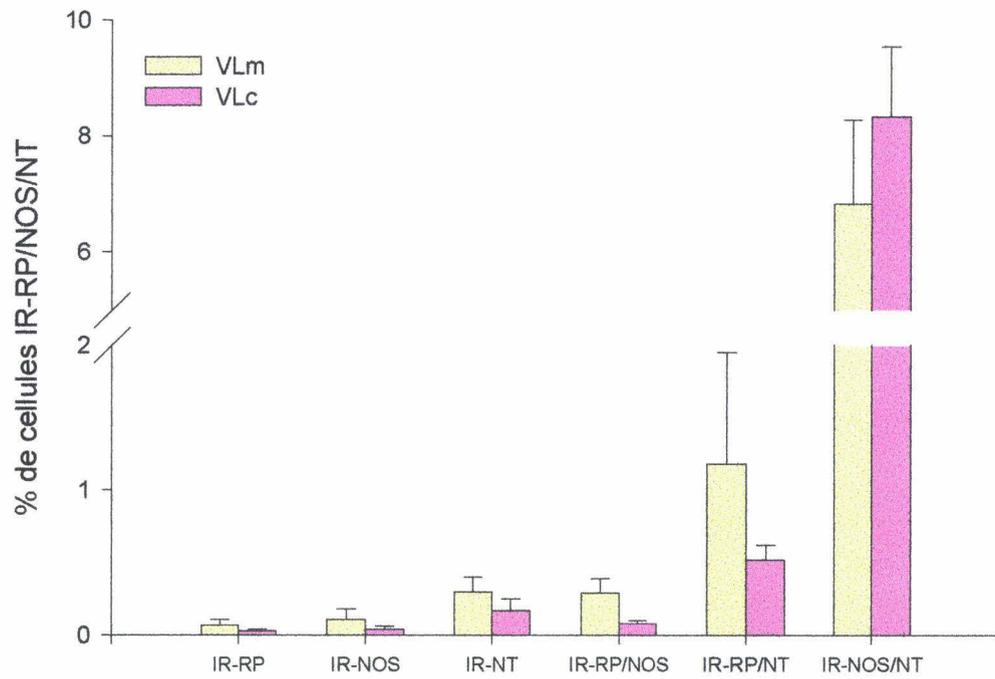


Fig. 33: Pourcentages de cellules IR-RP/NOS/NT en fonction des populations totales de neurones IR-RP, IR-NOS, IR-NT, IR-RP/NOS, IR-RP/NT et IR-NOS/NT dans les subdivisions médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL.

Tableau 14 : Détection des cellules IR-RP/NOS/SP

Cellules IR	subdivisions		
	VLr	VLm	VLc
RP	25,79 ± 1,54	36,71 ± 1,84	36,28 ± 2,63
NOS	19,41 ± 1,79	25,59 ± 0,60	26,63 ± 1,33
RP/NOS	6,40 ± 0,61	8,65 ± 0,55	12,29 ± 0,65
SP	17,20 ± 0,70	17,93 ± 0,94	7,45 ± 0,64
RP/SP	4,26 ± 0,31	5,39 ± 0,45	2,62 ± 0,31
NOS/SP	0,52 ± 0,13	0,35 ± 0,09	0,16 ± 0,04
RP/NOS/SP	0,28 ± 0,07	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,03

Les valeurs représentent les nombres moyens ( $\pm$ SEM) de cellules simplement, doublement et triplement IR /hémisection dans les subdivisions rostrale (VLr), médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL du cobaye femelle (n=4). L'estimation est réalisée sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL.

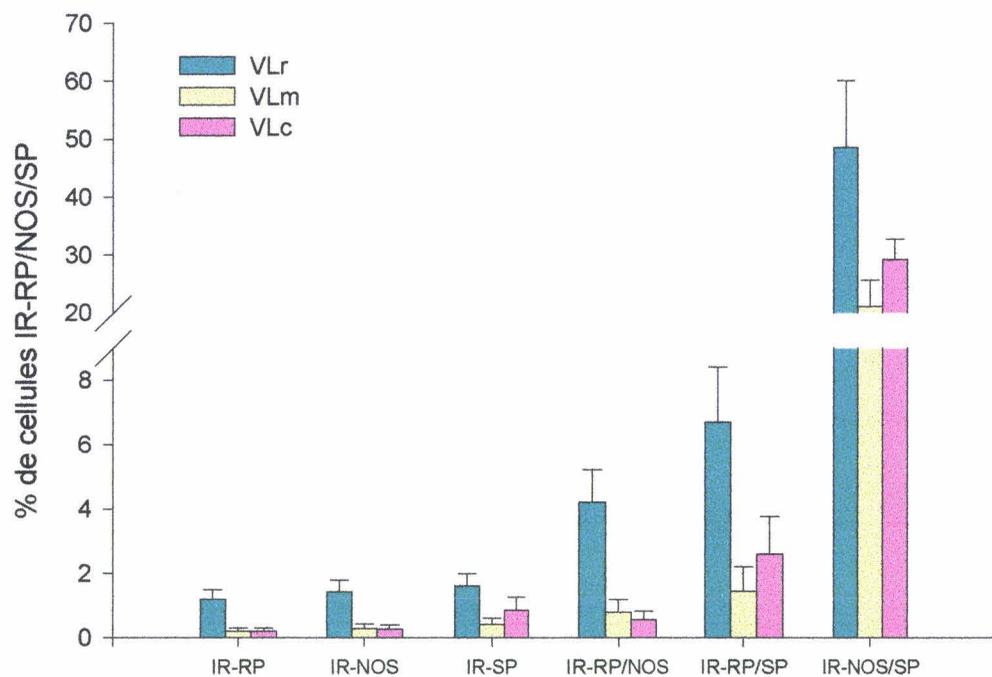


Fig. 34: Pourcentages de cellules IR-RP/NOS/SP en fonction des populations totales de neurones IR-RP, IR-NOS, IR-SP, IR-RP/NOS, IR-RP/SP et IR-NOS/SP dans les subdivisions rostrale (VLr), médiane (VLm) et caudale (VLc) du VL.

% à 50 % des cellules IR-NOS/SP selon les régions du VL contiennent des RP (Fig 34).

## **VII - Œstrogènes et colchicine: influences sur l'activité NADPHd et sur la coexistence du RP avec la NOS dans le VL**

### **A – Effet des œstrogènes sur l'activité NADPHd en fonction de la durée du traitement**

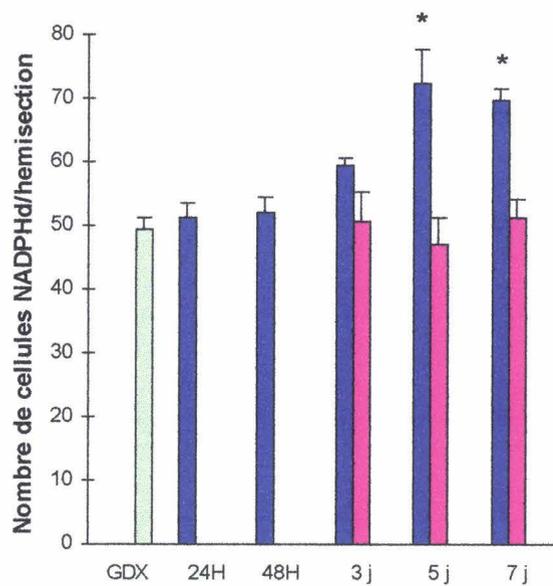
L'histochimie NADPHd a été effectuée sur des sections de 60 µm de cerveau de cobayes femelles répartis en 9 groupes: GDX, GDX+EB (24 H, 48 H, 3 jours, 5 jours, ou 7 jours) et GDX+huile (3 jours, 5 jours ou 7 jours). Chaque groupe est constitué de 4 animaux.

Les comptages mettent en évidence une augmentation du nombre de cellules NADPHd /hémisection dans le VL des cobayes GDX+EB à 3, 5 et 7 jours par rapport aux animaux GDX, GDX+huile, GDX+EB à 24 H et 48 H, mais l'effet est significatif ( $p < 0,05$ ) seulement chez les animaux traités pendant 5 et 7 jours (Fig. 35). Le nombre de cellules NADPHd/hémisection avoisine 72 et 69 respectivement chez les animaux GDX+EB à 5 et 7 jours alors que l'on obtient environ 50 cellules NADPHd dans les autres groupes (Fig. 35). Cet effet des œstrogènes sur l'activité NADPHd semble spécifique au VL puisque aucune différence significative n'est obtenue entre les différents groupes dans l'aire préoptique, le noyau paraventriculaire et la région caudale du noyau arqué où respectivement environ 19 cellules, 25 cellules et 30 cellules NADPHd/hémisection sont comptées (Fig. 35).

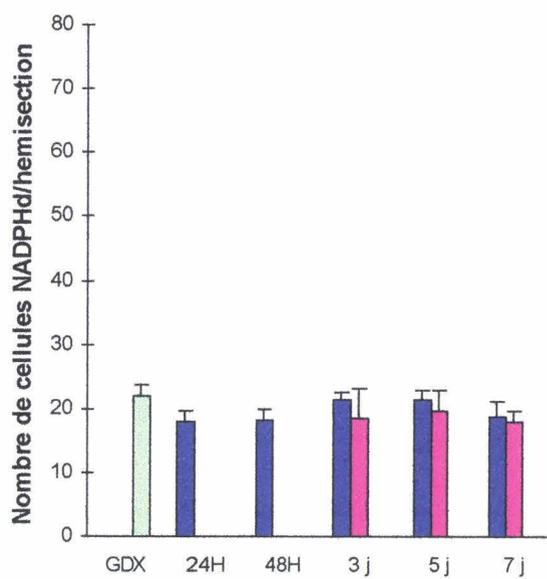
### **B - Effet de la colchicine sur l'activité NADPHd**

L'estimation quantitative a été réalisée sur des sections de 16 µm de cerveau après histochimie NADPHd.

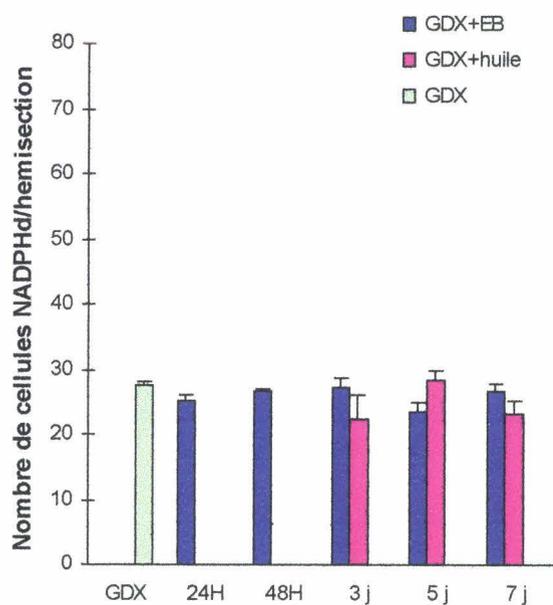
Fig. 35: Effets des œstrogènes en fonction de la durée du traitement sur le nombre de cellules NADPHd positives dans le VL, l'aire préoptique (APO), le noyau paraventriculaire (PV) et la subdivision caudale du noyau arqué (ARc). Les barres d'histogrammes représentent le nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules /hémisection dans les régions cérébrales de 9 groupes expérimentaux: femelles GDX, GDX+EB (24H, 48H, 3 jours, 5 jours, 7 jours), et GDX+huile (3 jours, 5 jours, 7 jours). Chaque groupe est constitué de 4 cobayes. Les comptages sont réalisés sur 10 hémisections de 60  $\mu$ m dans le VL, 9 dans l'aire préoptique, 4 dans le noyau paraventriculaire et 5 dans le noyau arqué. \* significativement ( $p < 0.05$ ; ANOVA+ test t de Bonferroni) différent des animaux GDX et GDX+huile.



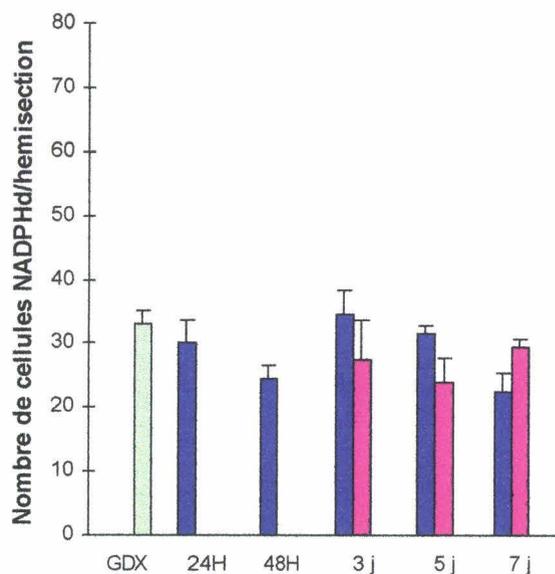
VL



APO



PV



ARc

### 1) chez des femelles non GDX+EB

L'effet de la colchicine sur l'activité NADPHd a été étudié dans un premier temps sur des cerveaux de femelles intactes réparties en 3 groupes expérimentaux constitués de : 4 animaux traités par la colchicine, 4 témoins ayant reçu une injection de sérum physiologique et 4 non-traités. Dans la région rostrale du VL, aucune différence significative du nombre de cellules NADPHd/hémisection n'est mise en évidence entre les 3 groupes d'animaux, alors que dans les deux tiers postérieurs, le nombre de cellules NADPHd chez les femelles colchicinisées est significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevé (Fig. 36). L'augmentation du nombre de cellules NADPHd chez les animaux colchicinisés est de 37 % dans la région médiane (Fig. 37 A et B) et de 26 % dans la région caudale (Fig. 37 C et D). L'action de la colchicine semble spécifique de ces 2 régions puisque dans l'aire préoptique, le noyau paraventriculaire et la région caudale du noyau arqué (Fig. 37 E et F), nous n'obtenons pas de différence significative entre les différents groupes d'animaux (Fig. 36).

### 2) chez des femelles GDX+EB

Afin d'évaluer l'influence de la colchicine sur l'activité NADPHd chez les femelles GDX+EB, une étude similaire à la précédente a été réalisée sur les cerveaux de femelles GDX+EB réparties en 3 groupes expérimentaux (traités par la colchicine, témoins injectés par le sérum physiologique et non-traités) constitués chacun de 4 animaux. L'analyse quantitative s'est limitée au VL.

Les femelles traitées par la colchicine montrent pratiquement le même nombre de cellules NADPHd /hémisection dans la région rostrale du VL que les non-traitées (Fig. 38), mais montrent significativement ( $p < 0,05$ ) plus de cellules positives dans les subdivisions médiane et caudale du VL (Fig. 38). L'augmentation du nombre de cellules est de 42 % dans la région médiane alors qu'elle est de 84 % dans la région caudale ce qui fait 58 % de plus par rapport aux résultats obtenus précédemment chez les animaux non GDX+EB.

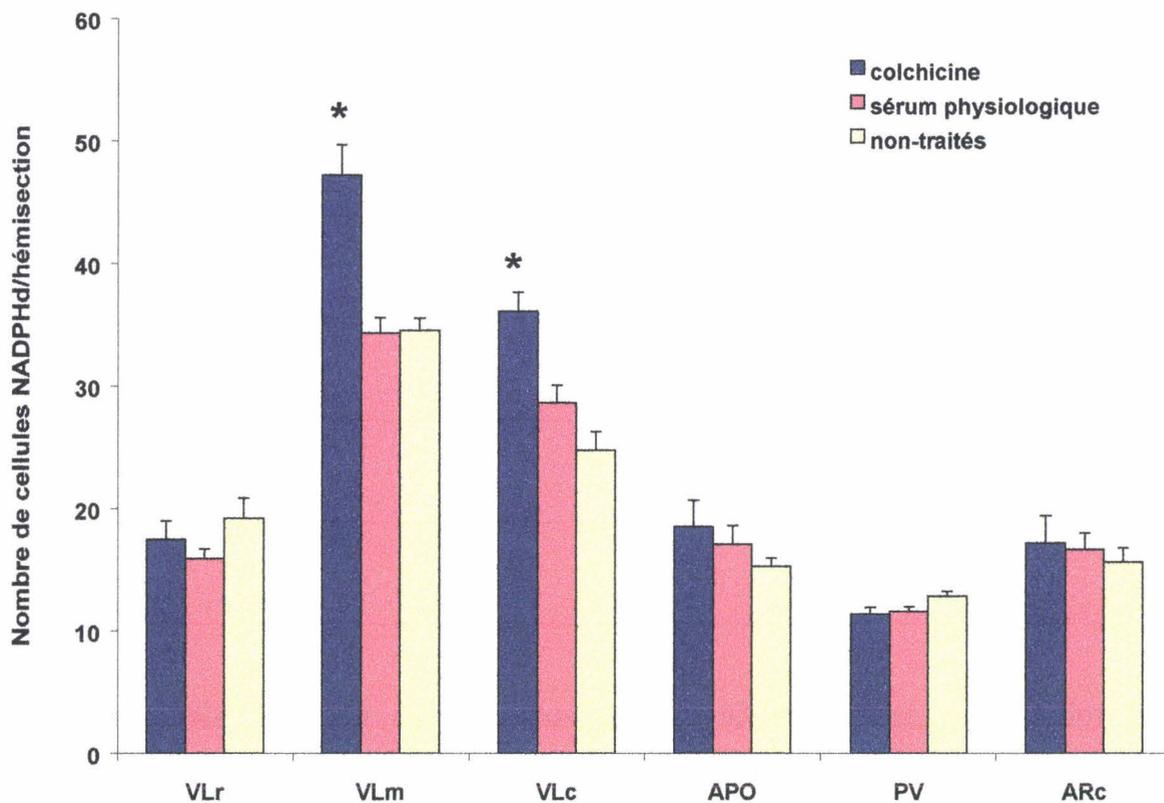
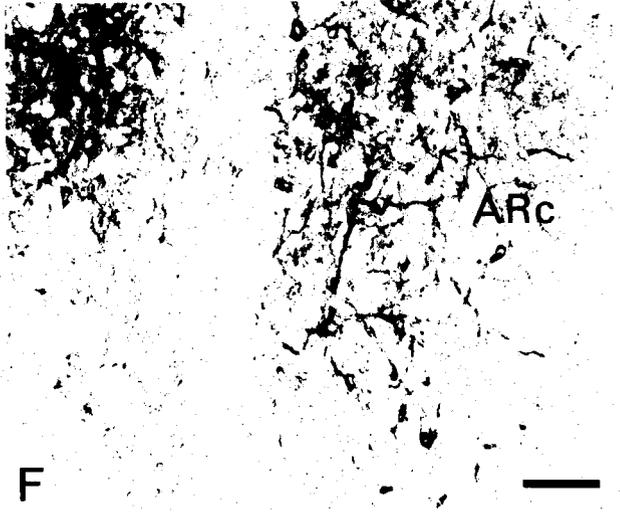
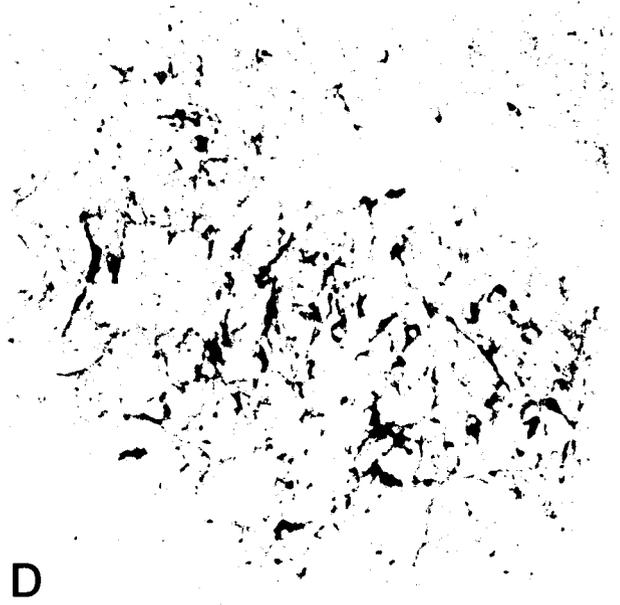
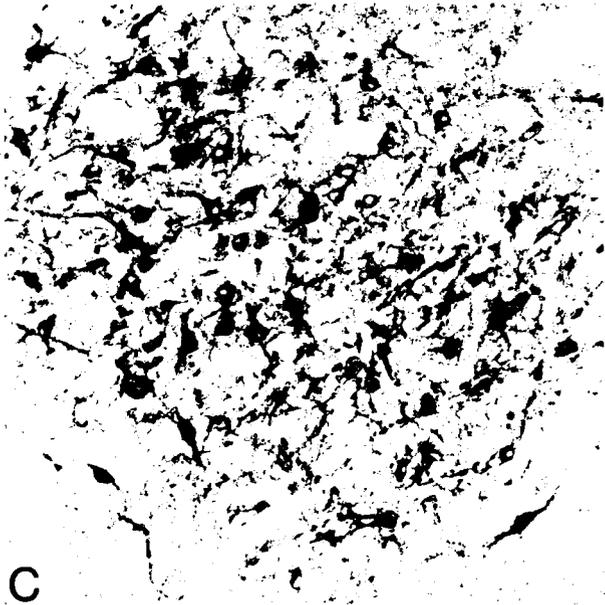
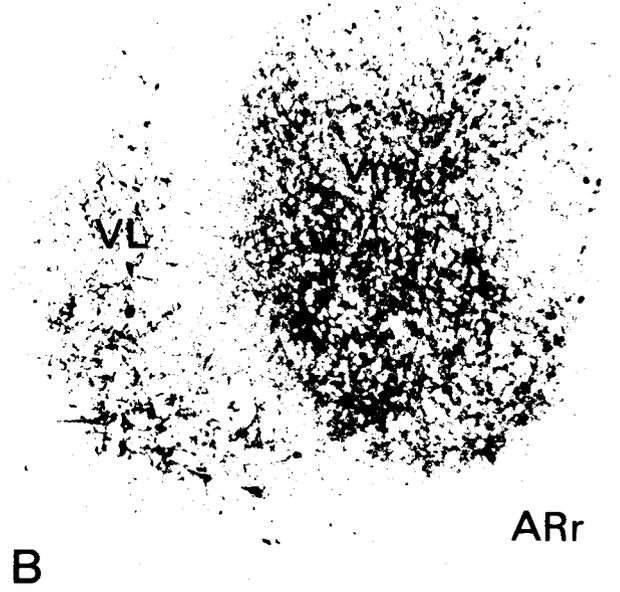
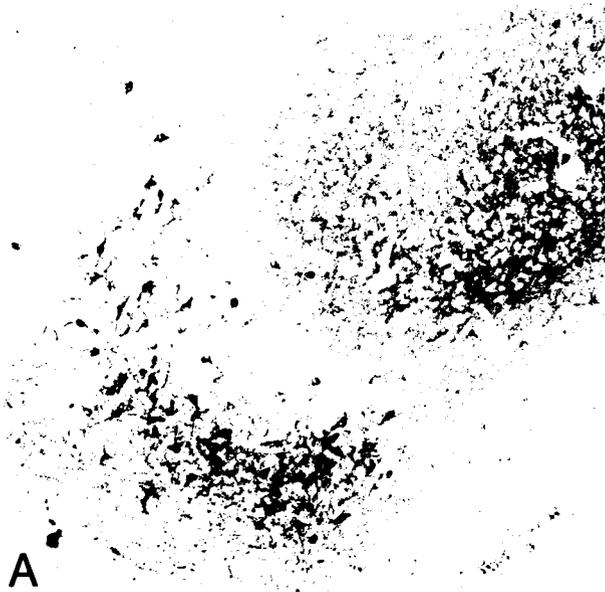


Fig. 36: Effet de la colchicine sur le nombre de cellules NADPHd positives aux niveaux rostral (VLr), médian (VLm) et caudal (VLc) du VL, dans l'aire préoptique (APO), le noyau paraventriculaire (PV) et la région caudale du noyau arqué (ARc). Les barres d'histogramme représentent le nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules/hémisection dans les régions cérébrales de 4 cobayes femelles non GDX colchicinisés, de 4 femelles non GDX ayant reçu une injection intracérébrale de sérum physiologique et de 4 femelles non GDX non-traitées. Les comptages sont réalisées sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL, 14 dans l'aire préoptique, 10 dans le noyau paraventriculaire et 13 dans la région caudale du noyau arqué. \*significativement ( $p < 0.05$ ; ANOVA+ test de Student-Newman-Keuls) différent des animaux intacts et des animaux ayant reçu du sérum physiologique.

Fig. 37: Distribution des cellules NADPHd positives dans les régions médiane (A et B), et caudale (C et D) du VL et dans la région caudale du noyau arqué (E et F) chez des animaux traités par la colchicine (A, C et E) et chez des animaux ayant reçu du sérum physiologique (B, D et F). ARr: subdivision rostrale du noyau arqué; Vm: noyau ventromédian; ARc: subdivision caudale du noyau arqué; VP: noyau ventral prémamillaire. Barre de calibration: 150  $\mu\text{m}$  (A, B) et 75  $\mu\text{m}$  (C-F).



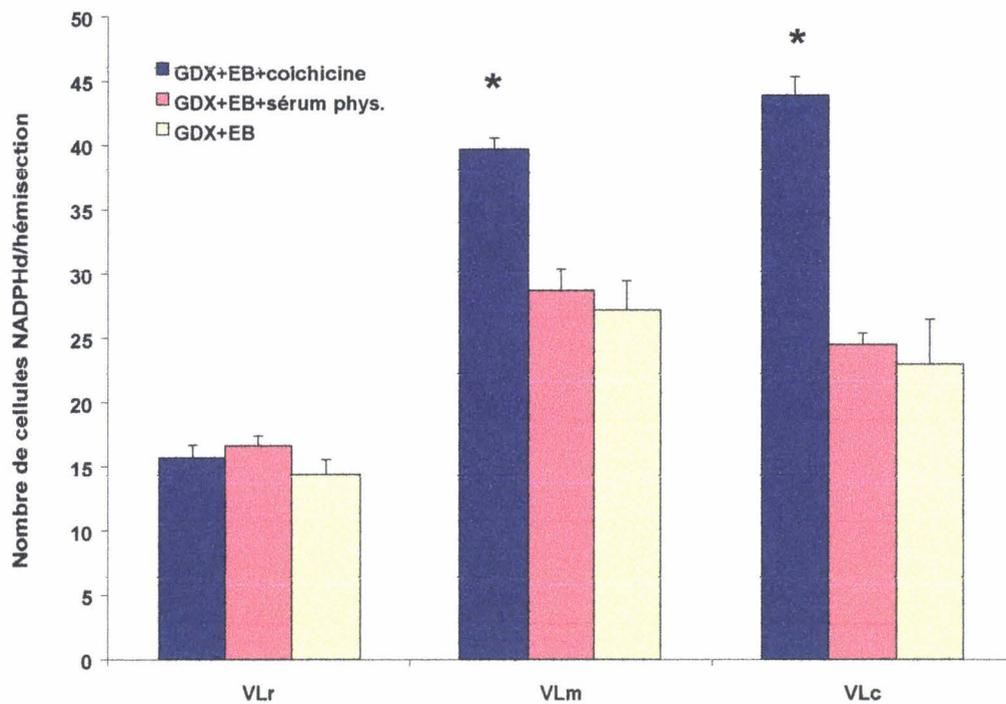


Fig. 38: Effet de la colchicine sur le nombre de cellules NADPHd positives dans le VL de femelles GDX+EB. Les barres d'histogramme représentent le nombre moyen ( $\pm$ SEM) de cellules/hémisection dans les régions cérébrales de 4 cobayes traités par les œstrogènes pendant 5 jours (GDX+EB), de 4 GDX+EB ayant reçu du sérum physiologique par stéréotaxie et de 4 GDX+EB traités avec 40  $\mu$ g de colchicine 25H avant le sacrifice. Les comptages sont réalisés sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL. \*significativement ( $p < 0.05$ ; ANOVA+ test de Student-Newman-Keuls) différent des animaux GDX et des animaux GDX+sérum physiologique.

## **C – Influence de la colchicine sur les cellules IR–RP/NOS**

Pour étudier l'influence de la colchicine sur les cellules IR-RP/NOS, les cellules doublement IR ont été comptées sur les sections du VL de 8 femelles GDX+EB (4 traitées par la colchicine et 4 non-traitées). Aucune variation significative du nombre de cellules IR–NOS n'est mise en évidence entre les deux groupes d'animaux dans la région rostrale. Par contre, ce nombre est fortement augmenté ( $p < 0,05$ ) dans les régions médiane et caudale chez les animaux traités par la colchicine. Ces derniers montrent que entre 30 % et 45 % des cellules IR-NOS contiennent le RP dans toutes les régions du VL (Tableau 15). Ces pourcentages sont significativement ( $p < 0,05$ ) inférieurs à ceux obtenus chez les femelles non-traitées qui sont compris entre 42 % et 53 % (Tableau 15). Les pourcentages des cellules cibles de la progestérone contenant la NOS ne varient pas significativement entre les deux groupes d'animaux dans les régions rostrale et médiane mais sont significativement différents (31 % et 24 %) dans la région caudale (Tableau 15).

Tableau 15: Nombre ( $\pm$ SEM) de cellules IR-RP, IR-NOS et IR-RP/NOS par hémisection dans les régions rostrale (VLr), médiane (VLM) et caudale (VLC) du VL chez des cobayes femelles GDX+EB non traités et traités par la colchicine et estimation du pourcentage ( $\pm$ SEM) de cellules doublement IR en fonction des populations simplement IR.

	Nombre de cellules IR-RP /hémisection	Nombre de cellules IR-NOS /hémisection	Nombre de cellules IR-RP/NOS /hémisection	% de cellules IR-NOS avec RP	% de cellules IR-RP avec NOS
VLr					
non-traités	23,37 $\pm$ 2,31	11,40 $\pm$ 1,57	4,49 $\pm$ 0,72	42,92 $\pm$ 1,41	14,55 $\pm$ 1,03
traités	28,26 $\pm$ 1,62	17,55 $\pm$ 1,44	5,43 $\pm$ 0,66	30,46 $\pm$ 1,73*	19,03 $\pm$ 1,77
VLM					
non-traités	35,64 $\pm$ 1,43	14,70 $\pm$ 1,99	7,76 $\pm$ 1,25	46,44 $\pm$ 2,29	21,71 $\pm$ 3,40
traités	37,37 $\pm$ 2,34	30,10 $\pm$ 1,36*	9,29 $\pm$ 0,71	34,18 $\pm$ 0,86*	24,60 $\pm$ 1,24
VLC					
non-traités	29,85 $\pm$ 2,34	15,51 $\pm$ 1,39	8,27 $\pm$ 0,66	53,21 $\pm$ 1,42	24,44 $\pm$ 1,79
traités	32,50 $\pm$ 2,26	25,60 $\pm$ 2,39*	11,28 $\pm$ 0,79	44,70 $\pm$ 1,46*	31,10 $\pm$ 0,97*

Les cellules IR sont comptées sur 15 hémisections dans chaque subdivision du VL.

\* significativement différent ( $p < 0.05$  test t de Student) entre cobayes traités et cobayes non-traités par la colchicine.

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

### **I - Les populations neuronales IR-RP, neuropeptidergiques et IR-NOS dans le VL: comparaison avec celles des autres régions hypothalamiques**

#### **A - Cellules IR-RP**

##### **- Dans le VL**

Le présent travail fournit une description précise des cellules IR-RP à travers l'étendue rostro-caudale du VL. La comparaison de cette population neuronale chez le cobaye mâle et chez le cobaye femelle révèle un nombre de cellules IR-RP significativement plus élevé chez le mâle. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions expérimentales par Olster et Blaustein (1990 a). Elle diffère de ceux obtenus par Brown et al. (1996) qui, utilisant la radioautographie, montrent un nombre plus élevé de cellules marquées chez la femelle après une seule injection d'EB. Elle est également en désaccord avec les travaux de Thornton et al. (1989) qui, effectuant des dosages de RP, obtiennent aucune différence significative entre les sexes chez des animaux traités 3 jours par l'EB. Cette différence peut résulter de la durée variable du traitement œstrogénique ou encore de la technique de détection des récepteurs utilisée. Il est possible que le VL de la femelle contient plus de RP que celui du mâle lors des traitements courts et que l'augmentation de la durée du traitement inverse cette tendance. La structure chimique du stéroïde injecté doit également intervenir dans l'induction du RP puisque la même quantité de cellules est trouvée chez le mâle et la femelle après traitement avec un autre dérivé, le  $17\beta$ -œstradiol (Olster et Blaustein, 1990 a).

##### **- Dans les autres régions hypothalamiques**

Contrairement au VL, nos résultats indiquent que l'aire préoptique chez la femelle contient plus de cellules IR-RP que chez le mâle, ce qui corrobore les données biochimiques obtenues chez des cobayes soumis aux œstrogènes pendant 3 jours (Thornton et al., 1989), et radioautographiques chez des cobayes après une seule injection d'EB (Brown et al., 1996). Par contre, ils sont en opposition avec ceux de Olster et Blaustein (1990 a) qui montrent par immunocytochimie un nombre

supérieur de cellules IR–RP chez le cobaye mâle traité par l'EB 40 H avant le sacrifice, ce qui suggère que l'induction du RP est fonction de la durée du traitement.

Dans l'extension rostro-caudale du noyau arqué, nous n'avons pas observé de différence significative entre mâles et femelles conformément aux résultats antérieurs obtenus chez le cobaye (Thornton et al., 1989 ; Olster et Blaustein, 1990 a ; Brown et al., 1996) et chez le rat (Brown et al., 1987 a ; Rainbow et al., 1982 b).

## **B – Cellules neuropeptidergiques**

La mise en évidence des populations cellulaires IR-SOM, IR-NT et IR-SP dans le VL (Fig. 39), n'a été possible qu'après l'injection intracérébroventriculaire de colchicine, et a toujours été réalisée dans les études de coexistence avec le RP après induction par les œstrogènes du récepteur. Aussi, l'influence du traitement œstrogénique sur ces 3 populations a été étudiée.

Les œstrogènes augmentent l'immunoréactivité associée à la SOM dans le VL de façon spécifique puisque dans le noyau arqué, nous ne détectons pas de modification significative du nombre ni de l'intensité du marquage des neurones à SOM. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par hybridation *in situ* dans le noyau périventriculaire (Werner et al., 1988 ; Zorilla et al., 1990) et dans le noyau ventromédian (Baldino et al., 1988) du rat où les œstrogènes augmentent la synthèse de SOM.

Le même traitement œstrogénique ne modifie pas significativement le nombre de cellules IR-NT aussi bien dans le VL que dans le noyau arqué du cobaye. Nos résultats diffèrent de ceux rapportés chez le rat pour lesquels les œstrogènes augmentent le nombre de cellules IR (Alexander et Leeman, 1994), et, le taux d'ARNm de la NT dans l'aire préoptique (Alexander et al., 1989 a) et dans la division dorso-médiane du noyau arqué (Alexander, 1993).

Les œstrogènes augmentent le nombre de cellules à SP dans le VL de la femelle, mais ne modifient pas l'immunoréactivité de la SP dans le noyau arqué où très peu de cellules IR–SP sont détectées. Ces résultats concordent en partie avec certaines données montrant chez le rat une stimulation de la synthèse de PPT par les œstrogènes dans l'hypothalamus (Brown et al., 1990), et plus précisément dans le noyau ventromédian (Priest et al., 1995), alors que d'autres ne rapportent pas de modification (Romano et al., 1989 a). Le nombre de cellules IR-SP est également

Fig. 39 : Représentation schématique des différentes populations neuronales mises en évidence dans le VL et de leurs interactions, connues ou hypothétiques, avec des neurones de l'aire préoptique (APO) et/ou de la SGPM. NT-R : récepteur de la NT ; SST1 : récepteur de type 1 de la SOM ; SST2A : récepteur de type 2A de la SOM. SP-R : récepteur de la SP.



significativement augmenté par ce traitement à la fois dans le noyau ventromédian (Akesson, 1994) et dans le noyau périventriculaire (Okamura et al., 1994 a).

Le choix d'espèces différentes peut expliquer l'opposition entre nos résultats et certaines données bibliographiques. La durée du traitement stéroïdien, comprise entre un jour et deux semaines selon les études et son mode d'administration, soit par injection sous-cutanée ou par implantation sous-cutanée d'une capsule Silastic, sont d'autres facteurs à considérer. La technique utilisée pour la détection des neuropeptides, souvent l'immunocytochimie ou l'hybridation *in situ*, intervient vraisemblablement dans ces différences ainsi que la délimitation suivant différentes nomenclatures des régions examinées.

Il est vraisemblable que les œstrogènes agissent directement sur l'activation de la synthèse peptidergique via leurs récepteurs et ainsi modulent la neurosécrétion dans les réseaux neurochimiques qui contrôlent l'expression des comportements.

Aucune variation significative de l'immunoréactivité des trois populations cellulaires (IR-SOM, IR-NT et IR-SP) n'est détectée dans le noyau arqué qui contient des cellules IR-RE (DonCarlos et al., 1991) et IR-RP (Warembourg et al., 1986 ; Blaustein et al., 1988) ne synthétisant pas la SOM ou la NT (Warembourg et Jolivet, 1994). On peut penser que les œstrogènes n'influencent pas directement la synthèse de NT et de SOM dans le noyau arqué, mais peuvent moduler l'activité de ces populations neuropeptidergiques par l'intermédiaire d'inter-neurones.

Puisque la colchicine provoque un blocage du transport axonal microtubulaire mais peut aussi stimuler la synthèse de neuropeptides comme il a été montré chez le rat pour la NT dans le noyau arqué (Kiyama et Emson, 1991) et pour la SP dans le noyau ventromédian (Boyer et al., 1994), l'augmentation de l'immunoréactivité peut aussi résulter, soit d'une synthèse accrue du neuropeptide, soit d'une diminution de sa libération.

### **C – Cellules NADPHd et cellules IR-NOS**

Après la mise en évidence des cellules NADPHd et IR-NOS dans le VL (Fig. 39), les influences des œstrogènes et de la colchicine sur ces populations cellulaires ont également été étudiées avant d'entreprendre des triples réactions immunocytochimiques.

### **-Effet du traitement œstrogénique sur l'activité NADPHd**

L'augmentation significative du nombre de cellules NADPHd dans le VL des cobayes soumis aux œstrogènes pendant 5 jours traduit une stimulation de l'activité NOS puisque Warembourg et al. (1999) ont récemment démontré que toutes les cellules NADPHd du VL sont IR-NOS. Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Weiner et al. (1994) qui montrent une influence des stéroïdes gonadiques sur l'activité NOS, mesurée par la production de L-citrulline, dans le système nerveux du cobaye et des études qui mettent en évidence dans le VMvl du rat une augmentation de l'activité NADPHd (Ceccatelli et al., 1996) et de la synthèse d'ARNm de la NOS dans les deux tiers postérieurs de ce noyau (Rachman et al., 1998).

Ces données laissent supposer que l'action des stéroïdes gonadiques sur l'activité NOS dans le VL s'exerce par l'intermédiaire des récepteurs stéroïdiens. Cette hypothèse semble confirmée par les travaux de Okamura et al. (1994 c) qui ont démontré la présence du RE dans 70 % des cellules NADPHd du VMvl, et par ceux de Warembourg et al. (1999) qui ont estimé que la moitié des cellules IR-NOS du VL sont cibles de la progestérone.

Contrairement aux résultats obtenus dans le VL, nous n'avons pas mis en évidence de variation significative de l'activité NADPHd sous l'influence des œstrogènes dans l'aire préoptique, le noyau paraventriculaire et le noyau arqué postérieur, ce qui suggère une action spécifique au VL des hormones gonadiques sur l'activité NOS. Nos résultats sont en accord avec ceux de Wang et Morris (1999) qui n'observent pas de variation du nombre de cellules NADPHd dans le noyau paraventriculaire du rat, mais par contre en contradiction avec ceux de Okamura et al. (1994 b) qui montrent une augmentation de l'activité NADPHd dans le noyau préoptique médian de rats ovariectomisés soumis aux œstrogènes pendant 2 jours. Cette disparité pourrait provenir selon l'espèce, d'une réceptivité des cellules NOS de l'aire préoptique différente pour les œstrogènes.

### **-Effet de la colchicine sur l'activité NADPHd**

L'injection intracérébrale de colchicine augmente de façon significative le nombre de cellules NADPHd dans les subdivisions médiane et caudale du VL. L'augmentation est plus importante chez les animaux GDX+EB que chez les animaux intacts ce qui suggère une addition des effets de la colchicine et des œstrogènes. L'effet de la colchicine sur l'activité NADPHd, et par conséquent sur l'activité NOS, semble spécifique au VL puisque nous n'obtenons pas de différence significative du nombre de cellules marquées dans l'aire préoptique, le noyau

paraventriculaire et le noyau arqué postérieur entre les animaux traités par la colchicine et les animaux non-traités. Dans le noyau arqué et dans le noyau périventriculaire hypothalamique, nos résultats concordent avec ceux obtenus chez le rat par Lumme et al. (1997) et par Vanhatalo et al. (1998) qui ne constatent pas de variation du nombre de cellules NADPHd. Par contre, dans le noyau paraventriculaire, ils sont en contradiction avec ceux de Lumme et al. (1997) qui trouvent un nombre supérieur de cellules NADPHd. Cette différence peut provenir soit d'une sensibilité des cellules NADPHd du noyau paraventriculaire supérieure à la colchicine chez le rat ou de la dose de colchicine administrée. L'influence de la colchicine sur l'activité NOS dans le VMvl n'a jusqu'à présent, fait l'objet d'aucune étude.

L'activation spécifique de l'activité NOS dans le VL, que nous montrons, ne semble pas associée à l'expression d'un stress, puisque le stress provoqué par l'injection de colchicine induit l'apparition de la protéine c-Fos principalement au niveau du noyau paraventriculaire (Ceccatelli et al., 1989). Si la colchicine est connue pour arrêter le transport axonal, en dissociant les microtubules, et permettre la rétention des produits synthétisés dans le péricaryon (Alonso, 1988), des travaux récents ont montré un effet de cette drogue sur la synthèse peptidergique dans des régions diencephaliques précises. Par exemple, la colchicine stimule chez le rat, la synthèse dans l'aire préoptique de galanine (Cortès et al., 1991), dans le noyau paraventriculaire de la NT (Kiyama et Emson, 1991), des enképhalines et de la corticolibérine (Ceccatelli et al., 1991), et dans le noyau ventromédian de la SP (Boyer et al., 1994). Il est possible que l'injection de colchicine augmente l'expression de la NOS dans le VL. On peut penser que la répartition des cellules réceptives à l'effet de la colchicine dans les subdivisions médiane et caudale du VL n'est pas aléatoire mais est en relation avec une implication fonctionnelle qui reste à démontrer.

La colchicine est un agent neurotoxique efficace (Goldschmidt et Steward, 1989), puisque sa liaison à la tubuline est quasiment irréversible (Goldschmidt et Steward, 1982). Une étude récente démontre qu'elle peut provoquer l'apoptose des neurones de la couche des grains de cervelet qui montrent une augmentation du marquage de la NOS et un accroissement de la production de NO (Bonfoco et al., 1995). De plus un « donneur » du NO tel que le S-nitroso-N-acétyl-pénicillamine (SNAP) peut induire l'apoptose dans des neurones de la couche des grains de cervelet (Bonfoco et al., 1996). L'apoptose résulte de l'altération de l'organisation du cytosquelette par fragmentation des protéines microtubulaires (Bonfoco et al., 1995)

et de la déamination de l'ADN et de ses constituants (Wink et al., 1991) sous l'effet du NO. Ce dernier stimule le système glutamatergique (Montague et al., 1994), qui à son tour augmente la production de NO (Bredt et Snyder, 1989). A partir de ces données, on peut envisager que la colchicine induit dans le VL la production de NO, à la fois par une augmentation de l'activité NOS et par une stimulation du système glutamatergique, qui pourrait entraîner l'apoptose.

## **II - Caractérisation neurochimique des populations IR-RP du VL.**

Les populations cellulaires IR-SOM, IR-NT, IR-SP et IR-NOS ayant des distributions superposables à celle des neurones IR-RP dans le VL, nous avons montré au moyen de doubles et de triples marquages immunocytochimiques la coexistence du RP avec 2 neuropeptides (SOM et NT, SP et SOM, SP et NT) et la présence de SOM, de NT ou de SP dans des neurones où le RP coexiste avec la NOS.

### **A - Considérations méthodologiques**

#### **- élution**

L'élution est nécessaire pour éviter les réactions croisées lors de la révélation, car tous les anticorps primaires anti-neuropeptides dont nous disposons sont réalisés chez le lapin. Pour éliminer totalement les immunoréactivités détectées au cours de la première étape et pour éviter l'altération des épitopes séquentiels ou conformationnels du second neuropeptide recherché, la concentration du mélange permanganate de potassium/acide sulfurique permettant l'élution, et le temps de rinçage des sections dans cette solution ont dû être déterminés avec précision. Nous avons toujours mis en évidence la SP au cours de la première étape car l'antigénicité de ce neuropeptide est détruite par l'élution. L'intensité du marquage du second neuropeptide est en général plus faible que celle du premier, et souvent accompagnée d'une augmentation de la fluorescence non-spécifique du tissu. De ce fait, la technique d'élution peut nous avoir conduits à sous-estimer le nombre de cellules IR dans la seconde étape et par conséquent le nombre et la proportion de cellules triplement marquées.

### - **triples marquages immunofluorescents**

Les anticorps primaires utilisés pour mettre en évidence la présence du RP, de la NOS et d'un neuropeptide (SOM, NT, ou SP) dans le VL provenaient d'espèces différentes. Leur visualisation a été assurée par des anticorps secondaires et des systèmes d'amplification liés à des fluorochromes différents, ce qui a facilité l'estimation sous microscope des populations doublement et triplement IR. De ce fait, les pourcentages des populations neuronales doublement et triplement marquées ont pu être calculés en fonction de toutes les populations cellulaires simplement et doublement IR.

## **B - Populations neuronales doublement et triplement IR identifiées (Fig. 39)**

### **-Cellules IR-RP/SOM**

Environ un tiers des cellules IR–RP observées dans le VL contiennent la SOM chez le cobaye mâle et chez le cobaye femelle. Cette population coexiste avec d'autres populations cellulaires, précédemment démontrées, cibles de la progestérone sécrétant de la NT (Warembourg et Jolivet, 1994), de la SP (Nielsen et Blaustein, 1990 ; Olster et Blaustein, 1992 a, b) ou des enképhalines (Olster et Blaustein, 1990 b). Comme toutes les cellules IR–RP contiennent le RE (Warembourg et al., 1989 ; Blaustein et Turcotte, 1989), nos résultats peuvent être comparés à ceux obtenus dans les études de colocalisations entre le RE et la SOM qui montrent qu'environ un tiers des cellules IR–RE du VMvl du rat sécrètent la SOM (Herbison, 1994).

Bien que la distribution des cellules IR–RP soit superposable à celle des neurones IR–SOM dans l'aire préoptique, nous n'avons pas trouvé de colocalisation. De la même façon, Herbison et Theodosis (1993) n'ont pas montré de coexistence entre le RE et la SOM dans la région périventriculaire chez le rat. Par contre, les trois quarts des cellules à SOM de la région périventriculaire hypothalamique chez le rat mâle contiennent des récepteurs de la testostérone (Huang et Harlan, 1994 ; Bingaman et al., 1994 ; Herbison, 1995) ce qui suggère un contrôle des androgènes sur l'expression de la SOM.

La coexistence très sporadique de la SOM et du RP, observée dans le noyau arqué du cobaye, témoigne en faveur d'une influence indirecte des stéroïdes gonadiques sur les cellules à SOM.

Nous avons constaté la présence de terminaisons à SOM au contact des corps cellulaires IR-RP. Ces neurones pourraient libérer du GHRH, puisque environ 30 % des neurones à GHRH du noyau arqué sont la cible des œstrogènes (Shirasu et al., 1990) qui modulent l'expression du GHRH dans l'hypothalamus du rat (Senaris et al., 1992). De plus, des boutons synaptiques contenant de la SOM ont été observés dans le noyau arqué au contact des cellules à GHRH (Liposits et al., 1988 ; Horvath et al., 1989) qui possèdent des récepteurs de la SOM (Bertherat et al., 1992 ; McCarthy et al., 1992). La coexistence du GHRH et du RP dans les neurones du noyau arqué reste cependant à démontrer.

### **-Cellules IR-RP/NT, IR-RP/SP, IR-RP/NOS et cellules triplement IR**

Environ 34 % des cellules IR-SOM, 25 % des cellules IR-NT et 20 % des cellules IR-SP contiennent des RP dans le VL ce qui confirme les données précédemment publiées (Nielsen et Blaustein, 1990 ; Olster et Blaustein, 1992 a ; Warembourg et Jolivet, 1994). Les cellules IR-RP/SOM représentent une population neuronale plus grande que celle des cellules IR-RP/SP qui sont plus nombreuses que les neurones IR-RP/NT. Bien que ces populations neuronales montrent des distributions superposables dans le VL, nous n'avons pas mis en évidence une population cellulaire substantielle qui contienne à la fois le RP et au moins deux neuropeptides (SOM et NT, SP et SOM, ou SP et NT), même si environ 5% des cellules IR-RP/SOM sécrètent de la NT, 22 % des neurones IR-RP/NT contiennent la SOM, environ 19 % et 16 % des cellules IR-RP/SP sécrètent respectivement de la SOM et de la NT. Le pourcentage de cellules IR-RP du VL possédant deux neuropeptides reste inférieur à 5 % : 3 % des cellules contiennent la SOM et la NT ou la SOM et la SP, et 2 % sécrètent à la fois la SP et la NT.

Les cellules IR-RP/NOS représentent 30 % à 45 % des cellules IR-RP chez les animaux colchicinisés. Ces pourcentages sont inférieurs à ceux estimés par Warembourg et al. (1999) qui obtiennent des taux de colocalisation supérieurs à 50 % pour toutes les subdivisions du VL, ce qui nous a conduit à examiner l'influence de la colchicine sur la coexistence RP/NOS. Dans les deux tiers antérieurs du VL, la colchicine diminue le pourcentage des cellules IR-NOS contenant le RP, mais ne modifie pas celui des cellules IR-RP contenant la NOS ce qui traduit une augmentation du nombre des cellules IR-NOS dépourvues de RP. Par contre, dans la région caudale, le pourcentage des cellules IR-RP contenant la NOS est significativement supérieur chez les animaux colchicinisés démontrant une augmentation de la synthèse de la NOS dans des cellules cibles de la progestérone.

Cette sélectivité de la colchicine pourrait être associée à des implications fonctionnelles différentes de subpopulations cellulaires dans le VL.

Ce travail est le premier à examiner la coexistence du RP et de la NOS avec un neuropeptide. Bien que les cellules IR-RP/NOS contenant la SOM s'observent dans toutes les subdivisions du VL, elles sont plus nombreuses dans la région caudale que dans les deux tiers antérieurs du noyau. La coexistence du RP et de la NOS avec de la NT est rarement observée. Une petite sous-population de cellules IR-RP/NOS/SP est mise en évidence dans la région rostrale du VL alors que ces cellules sont sporadiquement détectées dans les deux tiers postérieurs du noyau. Des études réalisées chez le rat ont montré des coexistences de la NOS ou de la NADPHd avec la SOM dans l'hypothalamus (Alonso et al., 1992 ; Yamada et al., 1996) et dans des structures télencéphaliques comme le striatum (Rushlow et al., 1995 ; Figueredo-Cardenas et al., 1996) et l'hippocampe (Dun et al., 1994). Environ 12 % des neurones IR-NOS sécrètent la SOM dans le VMvl du rat (Yamada et al., 1996), ce qui est en accord avec nos pourcentages (environ 11 %). Aucune étude concernant la coexistence de la NT avec la NOS ou la NADPHd n'avait été réalisée à ce jour. Yamada et al. (1996) ont montré qu'environ 11 % des neurones du VMvl contenant l'activité NADPHd présentent l'immunoréactivité associée à la NOS et à la SP. Ce pourcentage est très supérieur à celui que nous rapportons dans le VL du cobaye. Cette disparité pourrait provenir du contenu neurochimique des cellules IR-NOS différent selon les espèces ou être due à une distribution spécifique de la NOS à travers le VL qui est plus étendu que le VMvl. Elle ne peut pas être attribuée au traitement œstrogénique puisque celui-ci augmente le nombre de cellules IR-SP comme nous l'avons précédemment rapporté. La dose de 40 µg de colchicine que nous injectons, peut nous avoir conduits à sous-estimer le nombre de cellules triplement IR, mais une dose de 100 µg, souvent utilisée, qui favorise la visualisation d'un plus grand nombre de cellules neuropeptidergiques, diminue le nombre des cellules IR pour les récepteurs stéroïdiens (Axelson et Van Leewen, 1990 ; Yuri et Kawata, 1992 ; Warembourg et Jolivet, 1993).

### **III – Projections des neurones IR-RP/SOM du VL vers la SGPM**

Afin de mieux appréhender le rôle physiologique des cellules IR-SOM que nous trouvons en quantité substantielle dans le VL, nous avons déterminé leurs efférences, en particulier en direction du mésencéphale.

## **A - Considérations méthodologiques**

### **-Choix des traceurs**

Les résultats obtenus nous ont conduits à utiliser successivement trois traceurs différents. L'injection de FG par microélectroiontophorèse dans la SGPM a donné des sites de petits diamètres d'où un nombre très limité de neurones FG+ dans le VL. Suite à cet échec, un essai d'injection par pression du FG a été effectué, afin d'obtenir des sites plus étendus de façon à visualiser un nombre supérieur de cellules marquées. Cependant, la quantité élevée de cellules gliales et le faible nombre de neurones FG+ observés dans le VL nous ont contraints à utiliser d'autres traceurs fluorescents: le TB et les BV. Ces traceurs ont été injectés par pression pour favoriser l'obtention d'un site étendu. Le TB est le seul traceur ayant permis la mise en évidence d'un nombre conséquent de cellules marquées dans le VL. Il est probable que cette observation résulte de la structure chimique du TB. Ce traceur est en effet difficilement soluble d'où une diffusion et captation lentes par les cellules au niveau du site d'injection (Hökfelt et al., 1983). Comme le FG (Schmued et Fallon, 1986 ; Wessendorf, 1991), le TB pénètre dans la cellule par endocytose, au niveau des terminaisons nerveuses et des fibres lésées, mais aussi par diffusion à travers la membrane plasmique des fibres de passage au niveau du site d'injection (Sawchenko et Swanson, 1981 ; Condé et al., 1990). Il se lie ensuite aux acides nucléiques cytoplasmiques et nucléaires (Bentivoglio et al., 1979). Après passage des sections cérébrales dans du tampon, lors des réactions immunocytochimiques, le TB migre rapidement hors des cellules diminuant l'intensité du marquage (Sawchenko et Swanson, 1981 ; Hökfelt et al., 1983 ; Skirboll et al., 1984). Cette caractéristique rend nécessaire la photographie des cellules TB+ avant l'immunocytochimie. Contrairement aux traceurs cristallins, les BV diffusent peu (Katz et al., 1984), et montrent une fluorescence stable en phase aqueuse. Cependant, elles ne marquent qu'un nombre restreint de cellules marquées, probablement parce qu'elles sont exclusivement transportées dans des vésicules après endocytose (Katz et al., 1984) et ne traversent pas la membrane plasmique des fibres de passage au niveau du site d'injection.

### **-Temps de survie**

Le temps de survie a dû être fixé en tenant compte du fait que la colchicine, injectée 25 H avant le sacrifice des animaux, bloque la migration des traceurs et que

des cellules gliales TB+ apparaissent 8 à 10 jours après l'injection du TB (Skirboll et al., 1984). Il a dû être suffisamment long pour permettre la rétention du traceur dans le péricaryon, mais pas trop, pour éviter au maximum son apparition dans les cellules gliales.

## **B - Données anatomiques**

### **- Cellules IR-RP/TB et cellules IR-RP/BV**

Nous montrons que 14 % et 6 % des cellules IR-RP se projettent vers le mésencéphale respectivement après injection de TB et de BV. Ces pourcentages sont inférieurs à celui obtenu par Ricciardi et Blaustein (1994) qui montrent que 21 % des cellules IR-RP se projettent vers la SGPM après injection de FG. Cette différence pourrait provenir de la nature du traceur injecté. Par contre, nos résultats sont très proches de ceux obtenus chez le rat par DonCarlos et Morrell (1990) qui montrent qu'environ 15 % des cellules IR-RP sont FG+ dans le VMv

### **-Cellules IR-RP/SOM se projetant vers la SGPM (Fig. 39)**

Après l'injection de TB, nous montrons que 13 % et 29 % respectivement des cellules IR-SOM et IR-RP/SOM du VL se projettent vers la SGPM. Nous confirmons ces résultats après injection des BV puisqu'un peu moins d'un tiers des cellules IR-RP/SOM se projettent vers cette région. Par contre, avec ce traceur seulement 7 % des cellules IR-SOM du VL ont des projections vers le mésencéphale. La SGPM est donc un des sites de libération de la SOM sous l'influence de la progestérone.

## **IV - Implications du RP, des neuropeptides et du NO dans les fonctions de reproduction et en particulier dans la lordose**

### **A – Fonction du RP**

Nous avons mis en évidence des nombres différents selon le sexe de cellules IR-RP dans le VL et dans l'aire préoptique, deux régions impliquées dans la lordose. Le VL constitue un substrat anatomique pour les stéroïdes gonadiques qui contrôlent la réceptivité sexuelle (Morin et Feder, 1974 ; Delville et Blaustein, 1991). Les neurones de l'aire préoptique exercent une influence inhibitrice sur la lordose

(Rodriguez-Sierra et Terasawa, 1979 ; Yamanouchi et Arai, 1983 ; Takeo et al, 1993). Les RP présents dans ces deux régions agissent sur les gènes cibles contrôlant la libération ou l'expression de neuromodulateurs impliqués dans la lordose (Fig. 40). La présence de RP fonctionnels est en effet indispensable à l'expression de la réceptivité sexuelle puisque l'injection intracérébrale d'un inhibiteur compétitif de la progestérone (Brown et al., 1987 b) ou d'oligonucléotides antisens de l'ARNm du RP (Pollio et al., 1993 ; Mani et al., 1994 c ; Ogawa et al., 1994) bloque la lordose (Fig. 40). La progestérone n'est pas le seul "facteur" pouvant stimuler le RP (Fig. 40). En effet, l'addition de dopamine à des cellules transfectées par le gène du RP (Power et al., 1991) ou de GnRH à des cellules pituitaires en culture (Waring et Turgeon, 1992), ainsi que l'injection intracérébroventriculaire d'un agoniste du récepteur de la dopamine (Mani et al., 1994 a), provoque une activation du RP (Fig. 40), indépendante du ligand, qui est bloquée par le RU 486, un antagoniste de la progestérone (Fig. 40), ou par des oligonucléotides antisens de l'ARNm du RP (Mani et al., 1994 a). Auger et al. (1997) constatent également, sous l'effet de l'accouplement, une activation du RP indépendante du ligand (Fig. 40) qui peut jouer un rôle fonctionnel dans la lordose chez le rat ovariectomisé et adrénalectomisé. Ces auteurs suggèrent qu'après son activation, le RP stimule la synthèse de dopamine (Fig. 40) puisque le taux de dopamine augmente dans l'hypothalamus ventromédian après l'accouplement (Vathy et Etgen, 1989). Ces données montrent que la synthèse peptidergique induite par le RP est sous la dépendance de son activation par la progestérone mais aussi par des neurotransmetteurs, des neuromodulateurs et des stimuli comportementaux.

Le nombre supérieur de cellules IR–RP que nous montrons dans l'aire préoptique chez la femelle pourrait être associé au contrôle des stéroïdes gonadiques sur l'ovulation qui est dépendante de la sécrétion de la GnRH effectuée par des cellules spécifiques de l'aire préoptique chez le cobaye (Watson et al., 1992).

## **B- Actions possibles des neuropeptides**

La signification physiologique de la coexistence de plusieurs neuropeptides dans la même cellule n'est pas connue. Dans ce chapitre, nous discuterons du rôle que peut jouer chaque peptide.

RU 486

oligonucléotides antisens du RP

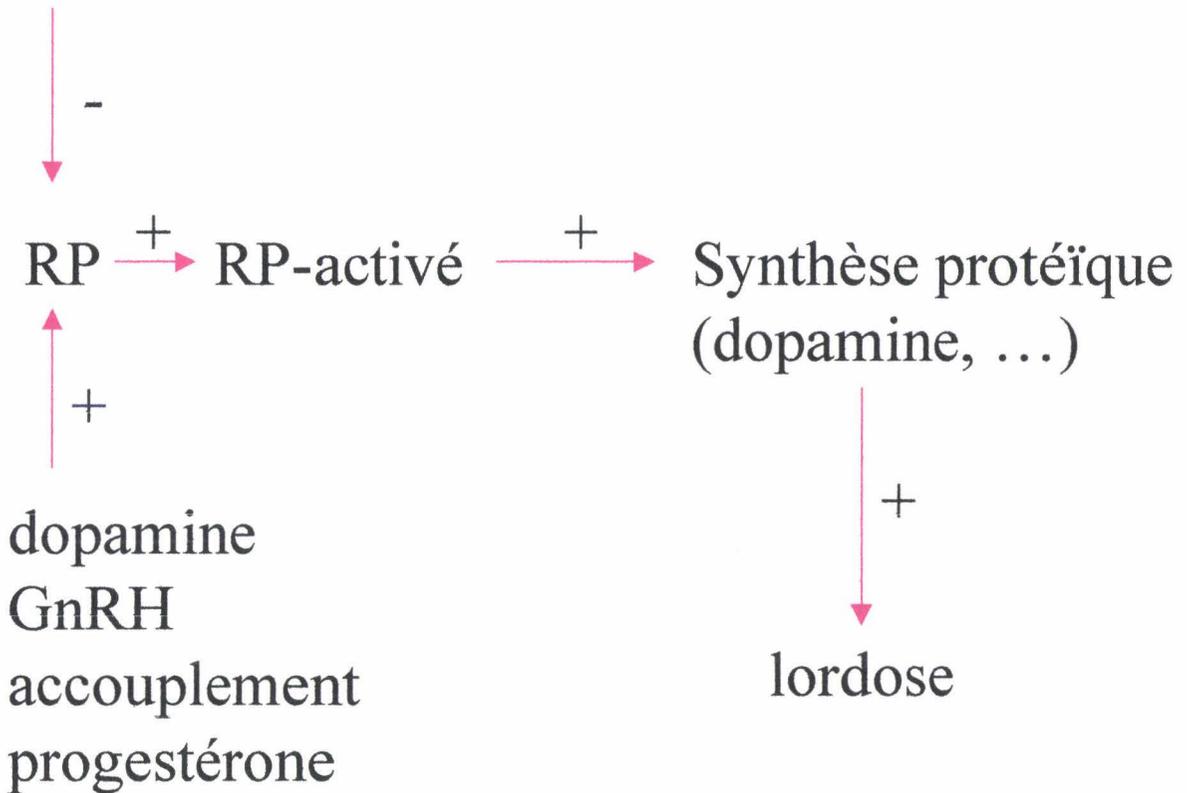


Fig. 40 : Actions sur le RP de différents facteurs modulant la lordose.

### **- Action de la SOM**

Le nombre de cellules IR-SOM augmente sous l'effet des œstrogènes dans le VL et environ un tiers des cellules IR-RP du VL sécrètent la SOM. La sécrétion de SOM par les neurones du VL est donc étroitement dépendante des stéroïdes gonadiques, ce qui suggère une implication de la SOM dans la réceptivité sexuelle. L'influence de la SOM sur la lordose n'est cependant pas déterminée. Kow et al. (1994) ont toutefois rapporté que la plupart des agents qui facilitent la lordose comme l'ocytocine, la prolactine ou la thyrolibérine, augmentent l'activité électrique des neurones et stimulent un système de messagers secondaires, par la voie des inositols phosphates. Par contre, les substances inhibant la lordose comme la dopamine, le neuropeptide Y ou la  $\beta$ -endorphine, freinent l'activité neuronale et diminuent la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), un autre messager secondaire, via une altération de l'adenylate cyclase (Kow et al., 1994). Or, la SOM inhibe l'activité électrique de neurones hypothalamiques (Renaud et al., 1976) et module certaines fonctions cérébrales par une inhibition de l'activité de l'adenylate cyclase (Epelbaum, 1986). Ces données sont donc en faveur d'une action inhibitrice de la SOM sur la lordose. Ceci reste à vérifier en calculant le quotient de lordose, qui correspond au nombre de dorsiflexions divisé par le nombre d'accouplements, après injection de SOM dans l'aire préoptique ou dans le mésencéphale, régions cibles des cellules du VL.

Nous montrons qu'environ un tiers des cellules IR-RP/SOM du VL se projettent vers la SGPM, ce qui constitue un argument supplémentaire en faveur d'une action de la SOM sur la lordose (Fig. 39). Le mésencéphale possède un rôle facilitateur sur la réceptivité sexuelle puisqu'une stimulation électrique de la SGPM provoque la lordose chez le rat (Sakuma et Pfaff, 1979 a) tandis qu'une lésion de cette région diminue ce réflexe (Sakuma et Pfaff, 1979 b). Le mésencéphale module aussi la réceptivité sexuelle en intégrant les informations en provenance de l'hypothalamus (Sakuma et Pfaff, 1982). En effet, la stimulation de l'hypothalamus ventromédian de rats ovariectomisés et traités aux œstrogènes facilite la lordose et augmente l'activité électrique des neurones de la SGPM (Pfeifle et al., 1980 ; Edwards et Pfeifle, 1981). Inversement, la section des connexions hypothalamo-mésencéphaliques altère le déroulement de la lordose (Manogue et al., 1980 ; Phelps et al., 1980 ; Edwards et Pfeifle, 1981). Les neurones mésencéphaliques cibles des neuropeptides contrôlent la dorsiflexion associée à la lordose puisqu'une stimulation électrique des neurones du noyau gigantocellulaire, qui reçoit des afférences de la SGPM chez le rat, provoque une réponse des muscles dorsaux

impliqués dans la position lordotique (Robbins et al., 1990). L'effet de la SOM pourrait s'exercer de façon directe dans des neurones de la SGPM par l'intermédiaire de récepteurs SST1 (Breder et al., 1992) et/ou SST2A (Dournaud et al., 1998), couplés à des protéines G (Epelbaum, 1986). Ces dernières stimulent des systèmes de messagers secondaires et modifient la conductance de canaux calciques et potassiques qui perturbent l'activité électrique des neurones cibles (Reisine, 1995). En diminuant l'activité électrique des neurones mésencéphaliques, par régulation des conductances ioniques, la SOM exercerait une influence inhibitrice sur la lordose.

La lordose peut aussi être modulée par les neurones IR–RP/SOM du VL qui ne se projettent pas vers la SGPM. La démonstration récente de la projection d'une sous-population de neurones IR-RE/SOM du noyau ventromédian du mouton en direction de l'aire préoptique rostrale (Goubillon et al., 1999) suggère que les cellules IR-RP/SOM du VL pourraient avoir des efférences vers l'aire préoptique (Fig. 39). La SOM inhibe la libération de GnRH à partir de fragments hypothalamiques (Rotsztein et al., 1982). Or, la GnRH facilite la réceptivité sexuelle via une action qui est indépendante de l'éminence médiane (Moss et McCann, 1973 ; Pfaff, 1973). La lordose est en effet stimulée par l'injection de GnRH dans le mésencéphale chez des rats ovariectomisés traités par les œstrogènes, inversement, elle est supprimée par l'application d'un anticorps anti-GnRH dans cette région (Riskind et Moss, 1979 ; Sakuma et Pfaff, 1983). La SOM sécrétée par les neurones du VL du cobaye cibles de la progestérone pourrait inhiber la libération de GnRH au niveau de l'aire préoptique et par conséquent freiner le déroulement de la lordose au niveau du mésencéphale.

### **-Action de la NT**

L'influence de la NT sur la réceptivité sexuelle n'est pas encore établie. La NT stimule l'activité électrique de neurones télencéphaliques (Sawada et al., 1980) et mésencéphaliques (Jolas et Aghajanian, 1996) en agissant sur la voie des inositols phosphates (Erwin et Radcliffe, 1993 ; Wu et al., 1995). Ces arguments sont en faveur d'une influence stimulatrice de la NT sur la réceptivité sexuelle d'après les données de Kow et al. (1994) que nous avons précédemment mentionnées. Les projections des cellules IR–NT du VL ne sont pas encore connues. Ces cellules pourraient constituer, comme les neurones à SOM, une population neuronale, vraisemblablement impliquée dans la lordose, se projetant vers le mésencéphale où quelques récepteurs à NT sont décrits chez le rat (Fig. 39; Young et Kuhar, 1981 ; Moyses et al., 1987).

Etant donné que l'administration intracérébrale de NT dans l'aire préoptique du rat en proœstrus stimule la sécrétion de LH (Ferris et al., 1984), elle pourrait faciliter indirectement la réceptivité sexuelle en agissant sur la sécrétion de la GnRH. La projection des cellules IR-RP/NT du VL vers l'aire préoptique reste à vérifier (Fig. 39) et la mesure du quotient de lordose chez des animaux ayant reçu une injection intracérébrale de NT dans l'aire préoptique ou dans le mésencéphale permettrait de préciser son influence stimulatrice.

#### **- Action de la SP**

L'application de SP au niveau de la SGPM du cobaye (Blaustein et al., 1991) ou du rat (Dornan et al., 1987) ovariectomisés stimule la lordose. Inversement, l'injection d'un anticorps anti-SP dans cette région bloque la réceptivité sexuelle chez le rat (Dornan et al., 1987). La SP est donc un agent facilitant la lordose.

Etant donné qu'une proportion substantielle de cellules IR-SP du VMvl chez le rat (Dornan et al., 1990) et du VL chez le cobaye (Ricciardi et al., 1994) émettent des prolongements en direction de la SGPM qui contient des récepteurs de la SP (Quirion et Dam, 1985), il est possible que les neuropeptides co-synthétisés par les neurones du VL, sous l'influence de la progestérone, soient libérés simultanément à proximité de neurones de la SGPM contenant le RE comme il a été décrit pour la SP (Fig. 39 ; Turcotte et Blaustein, 1997).

### **C – Rôle du NO**

#### **- Considérations sur la fonction du NO dans la lordose**

La présence de NOS dans une proportion substantielle de cellules IR-RP suggère une action directe de la progestérone sur la production de l'enzyme (Fig. 39). La NOS en produisant le NO facilite le réflexe de lordose puisque l'injection intracérébrale d'un inhibiteur de la NOS réduit l'intensité et la durée du réflexe chez le rat (Fig. 41 ; Mani et al., 1994 b ; Chu et al., 1999). Nous constatons que la colchicine augmente, comme les œstrogènes, l'activité NOS dans le VL (Fig. 41). Or, la colchicine retarde l'apparition de la lordose induite par les œstrogènes chez le rat (Fig. 41 ; Harlan et al., 1982 ; Meyerson, 1982). L'injection intracérébrale d'inhibiteurs de la synthèse protéique bloque la réceptivité sexuelle (Whalen et al., 1974 ; Rainbow et al., 1982 b ; Meisel et Pfaff, 1984, 1985) ce qui suggère que la colchicine bloque, dans un premier temps, le transport axonal empêchant la libération des

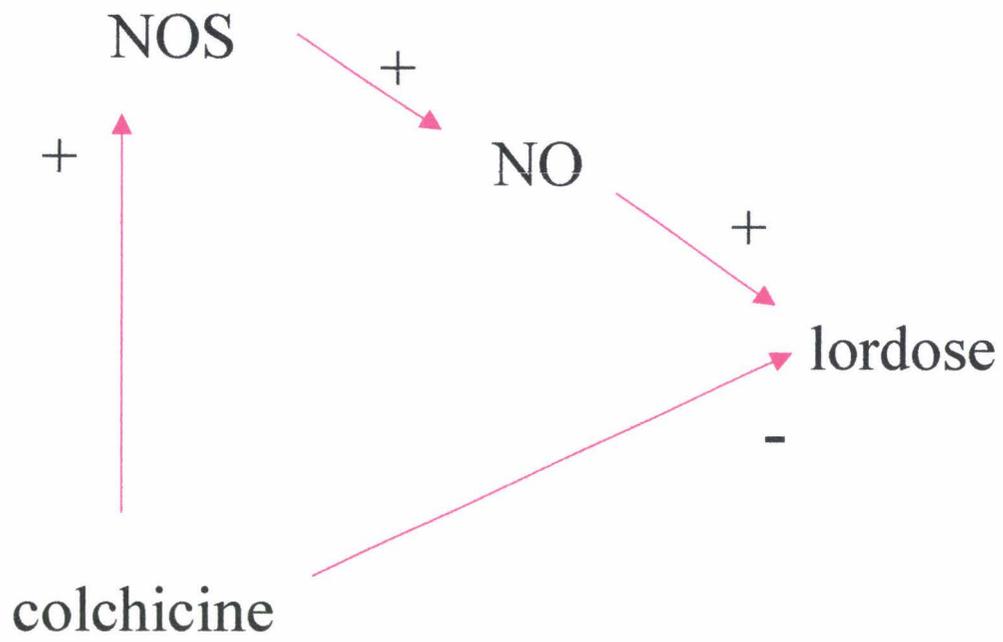


Fig. 41 : Actions du NO et de la colchicine sur la lordose.

neuromodulateurs et/ou des neurotransmetteurs synthétisés sous l'influence des stéroïdes gonadiques. La colchicine, comme nous l'avons déjà rapporté, exerce une action stimulatrice sur l'expression de neuropeptides comme la NT (Kiyama et Emson, 1991) qui peuvent avoir une influence inhibitrice sur la lordose. Ces deux actions intracellulaires provoqueraient un blocage temporaire de la lordose. Dans un deuxième temps, la colchicine stimulerait la synthèse de la NOS dans le VL. L'intégration de signaux peptidergiques inhibant la lordose conduirait alors à une altération de la réceptivité sexuelle qui serait suivie dès la réversibilité de l'action de l'alcaloïde sur le cytosquelette, par une stimulation de la lordose à la fois sous l'effet de la libération des neuropeptides produits sous l'action des stéroïdes et de l'augmentation de la synthèse du NO.

Le GMPc est l'un des médiateurs chimiques des effets du NO, parce qu'un "donneur" du NO augmente le taux de GMPc alors qu'un "chélateur" du NO le diminue dans l'hypothalamus de rats femelles (Bhat et al., 1996). La présence de l'enzyme produisant le GMPc, la guanylate cyclase, stimulée par le NO de façon dose dépendante, est nécessaire pour la mise en place du comportement sexuel (Chu et Etgen, 1997). L'élévation du taux de GMPc stimule la lordose alors que sa diminution l'inhibe. Récemment, les mêmes auteurs (Fig. 42 ; Chu et al., 1999) ont suggéré que l'augmentation de la production de GMPc sous l'effet du NO provoque l'excitation d'une protéine kinase spécifique dont l'activité est dépendante du GMPc (Fig. 42). Cette kinase est indispensable puisque son inhibition empêche l'apparition du réflexe (Chu et al., 1999). Le GMPc appartient donc avec l'AMPc (Beyer et Canchola, 1981) et la guanosine triphosphate (GTP ; Beyer et al., 1982) au groupe de molécules permettant la modulation de la lordose par l'intermédiaire d'une kinase (Fig. 42). La lordose induite par ces messagers chimiques peut être bloquée par le RU 486 (Chu et al., 1999) ce qui montre la nécessité de RP fonctionnels. Ces données conduisent à l'hypothèse de l'existence de phosphorylations de facteurs, restant à déterminer, qui transmettent à leur tour des groupements phosphates au RP permettant son activation indépendamment de la présence du ligand (Fig. 42) selon un mécanisme identique à celui rapporté pour la dopamine (Power et al., 1991 ; Mani et al., 1994 a). Cette activation du récepteur aboutirait à une facilitation de la lordose. La colocalisation du RP et de la NOS plaide en faveur d'une modulation de la lordose par le NO qui stimule le RP aussi bien par voie autocrine que par diffusion sur des cellules voisines IR-RP ne contenant pas la NOS.

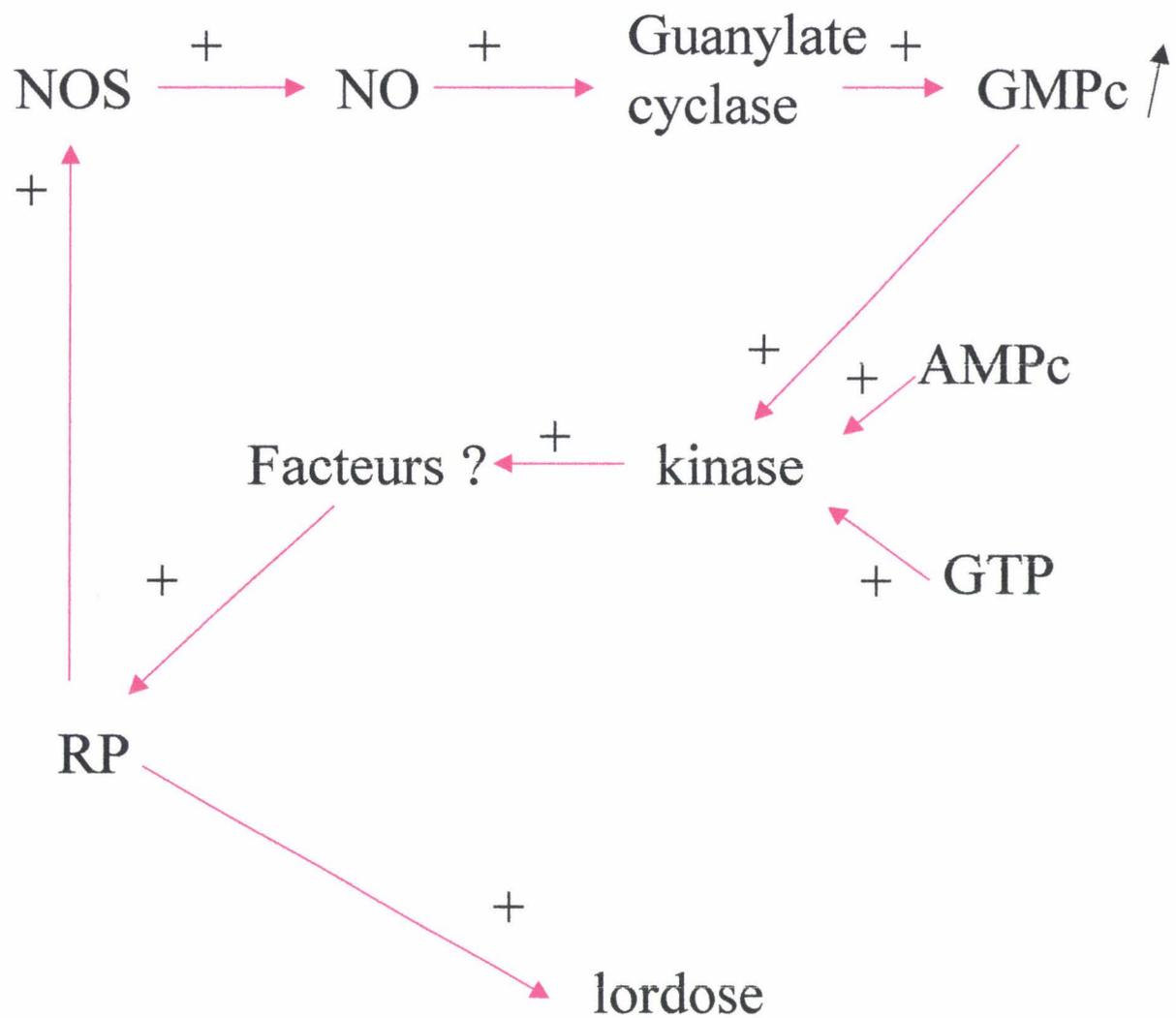


Fig. 42 : Interactions du RP et de la NOS dans le contrôle de la lordose.

### **- Coexistence du RP avec la NOS et un neuropeptide : implications fonctionnelles**

La NOS est trouvée dans 30 % à 40 % des cellules IR-RP/SOM et dans quelques neurones IR-RP/SP du VL. Elle est rarement observée dans les cellules IR-RP/NT. La production du NO par la NOS et la libération de SOM et de SP dans le VL semblent donc sous l'influence de la progestérone. Le NO facilite la libération de SOM (Aguila, 1994 ; Rettori et al., 1994 a) tandis que son action sur la SP et la NT n'est pas connue. Ce messenger diffusible, produit dans les cellules IR-RP du VL contenant la NOS, peut stimuler la lordose en orchestrant la libération de la SOM ou de la SP contenues dans les mêmes neurones ou agir sur la sécrétion des peptides produits dans des cellules voisines comme les cellules à NT (Fig. 39).

Les cellules IR-RP/NOS/SOM et IR-RP/NOS/SP peuvent aussi moduler la lordose en agissant sur la libération de GnRH puisque la NOS est synthétisée du péricaryon aux terminaisons nerveuses (McCann et Rettori, 1996), et que l'apport de NO stimule la libération de GnRH (Moretto et al., 1993 ; Rettori et al., 1993, 1994 b ; Lopez et al., 1997). Si des neurones IR-RP/NOS/SOM ou IR-RP/NOS/SP du VL se projettent à proximité des cellules à GnRH de l'aire préoptique, ils pourraient contrôler la sécrétion de GnRH en augmentant localement la concentration du NO ou en permettant la libération de SOM ou de SP à proximité des cellules à GnRH (Fig. 39). La GnRH libérée sous l'influence du NO et/ou des neuropeptides pourrait stimuler la lordose au niveau du mésencéphale.

Comme la synthèse de la GnRH diminue dans des cultures cellulaires suite à une augmentation de la concentration du NO dans le milieu (Belsham et al., 1996), le NO produit par les cellules IR-RP/NOS du VL pourrait aussi stimuler la réceptivité sexuelle en diminuant l'expression de neuropeptides inhibant la lordose comme le neuropeptide Y (Clark et al., 1985 ; Kalra et al., 1988) ou la cholecystokinine (Bloch et al., 1987 ; Babcock et al., 1988).

## **V - Fonctions possibles des neurones du VL dans d'autres comportements et dans l'intégration de la douleur**

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux influences des populations neuronales du VL sur la lordose, mais, d'après les données de la littérature concernant essentiellement le VMvl du rat, d'autres implications peuvent être envisagées par « extrapolation »..

### **- Influence sur le comportement alimentaire**

Une lésion bilatérale de l'hypothalamus ventromédian du rat provoque une augmentation du poids, et de l'absorption d'aliments (Weingarten et al., 1985 ; Funahashi et al., 1995) ainsi qu'une stimulation de la sécrétion de leptine (Sato et al., 1997) associée à une augmentation de l'expression du gène *ob* (Funahashi et al., 1995 ; Sato et al., 1997). Le comportement alimentaire est soumis à l'influence des stéroïdes gonadiques puisqu'un traitement œstrogénique, par injections sous cutanées, provoque une diminution du poids et de la prise alimentaire chez des cobayes ovariectomisés (Czaja et al., 1983). Les mêmes effets sont observés quand l'œstradiol est implanté dans une région hypothalamique comprenant le noyau ventromédian et l'aire hypothalamique latérale du cobaye (Butera et Czaja, 1984) ou du rat (Wade et Zucker, 1970 ; Jankowiak et Stern, 1974 ; Donohoe et Stevens, 1982). Un lien étroit existe entre comportement alimentaire et comportement sexuel puisque le quotient de lordose et le nombre de cellules IR-RE dans le VMvl du hamster sont diminués par une privation alimentaire (Wade et al., 1997). De plus, la leptine potentialise la lordose induite par les stéroïdes gonadiques dans les conditions normales d'alimentation (Wade et al., 1997). L'injection intrahypothalamique de SOM (Ho et al., 1989) ou de NT (Beck et al., 1995) diminue l'absorption alimentaire. Le même effet est observé après injection intracérébrale d'un inhibiteur de la NOS (De Luca et al., 1995 ; Stricker-Krongrad et al., 1996). A partir de ces données, l'hypothèse d'une implication dans le comportement alimentaire de cellules IR-RP du VL, contenant de la NOS et/ou de la SOM ou de la NT est envisageable. En modulant la production de NO et/ou la sécrétion des neuropeptides, les stéroïdes gonadiques pourraient modifier le déroulement de la prise alimentaire.

### **- Influence sur le comportement maternel**

Les neurones du VMvl exercent un rôle inhibiteur sur le comportement maternel puisque la lésion du VMvl provoque une facilitation du comportement maternel chez des rats ovariectomisés soumis aux œstrogènes (Bridges et al., 1999). Cette inhibition pourrait être assurée chez le cobaye par des neurones du VL contenant de la SOM, de la NT ou de la SP qui se projettent vers des régions de l'aire préoptique, du septum latéral et de l'amygdale impliquées dans le comportement maternel (Numan, 1990).

### **- Influence sur l'agressivité**

La différence dans le nombre de cellules IR-RP entre cobayes mâles et cobayes femelles dans le VL et dans l'aire préoptique pourraient être associée à des comportements agressifs spécifiques qui sont peu étudiés chez le cobaye. La stimulation électrique d'une région ventrale au fornix incluant l'aire hypothalamique latérale et le VMvl du rat induit un comportement d'attaque (Kruk et al., 1983 ; Lammers et al., 1988). Inversement, après lésion de ces régions, Hansen (1989) rapporte une disparition de l'agressivité maternelle chez des rats femelles. De plus, des sections parasagittales provoquent une diminution simultanée du quotient de lordose et de l'agressivité caractérisée par le désir de mordre, l'attaque ou la posture d'intimidation qui semblent sous la dépendance du taux d'hormones stéroïdiennes chez le mâle comme chez la femelle. En effet, pour provoquer l'attaque, un courant stimulant la région doit être d'intensité plus grande chez des rats mâles castrés que chez des animaux traités par la testostérone (Bermond et al., 1982 ; Albert et al., 1987). De la même façon, des taux d'œstrogènes élevés sont également nécessaires pour induire l'agressivité en l'absence de stimuli externes, tels que la présence des nouveaux-nés chez la femelle (Mayer et Rosenblatt, 1987). Ces arguments nous laissent supposer une implication dans l'agressivité des cellules du VL cibles des stéroïdes gonadiques.

### **- Influence sur l'analgésie**

L'injection intra-cérébrale de SOM au niveau de la SGPM inhibe chez le rat la transmission nociceptive au niveau de la moelle épinière (Helmchen et al., 1995). De ce fait, la SOM libérée par des terminaisons de neurones du VL au niveau de la SGPM à proximité de récepteurs SST2A pourrait moduler l'analgésie (Schindler et al., 1998).

**CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le VL représente un substrat anatomique pour les signaux hormonaux et neurochimiques contrôlant l'expression de la réceptivité sexuelle femelle, caractérisée chez les rongeurs par le réflexe de lordose nécessaire à l'accouplement. Il possède des relations réciproques avec l'aire préoptique et le mésencéphale également impliqués dans le comportement sexuel. La caractérisation dans le VL du contenu neurochimique des cellules IR-RP, l'étude des projections de ces cellules vers le mésencéphale en particulier vers la SGPM, et l'estimation quantitative de l'influence des œstrogènes et/ou de la colchicine sur les cellules peptidergiques et sur les neurones IR-NOS du VL, ont fait l'objet de nos recherches réalisées au moyen de techniques immunocytochimiques, histochimiques et de transport axonal rétrograde.

Nous démontrons des différences significatives dans la répartition et le nombre de cellules IR-RP dans le VL et dans l'aire préoptique entre cobayes mâles et cobayes femelles. Ces différences sont à mettre en relation avec l'importance de l'action des stéroïdes gonadiques sur la sécrétion de GnRH chez la femelle au niveau de l'aire préoptique et nous laisse supposer que la progestérone exerce un contrôle préférentiel selon le sexe sur les populations cellulaires neuropeptidergiques du VL impliquées dans la réceptivité sexuelle.

La présente étude met en évidence, pour la première fois, la présence de SOM dans environ 30 % des cellules IR-RP du VL (Fig. 39). Cette colocalisation n'est pas observée dans les cellules IR-RP du noyau arqué. Ces résultats suggèrent que la SOM sécrétée par les neurones du VL cibles de la progestérone serait impliquée dans la mise en place de la lordose et que la progestérone n'a pas d'action directe sur les cellules IR-SOM du noyau arqué. L'observation de terminaisons IR-SOM autour de cellules IR-RP dans le noyau arqué laisse penser que ces cellules pourraient contenir du GHRH, ce qui reste à vérifier par double marquage immunocytochimique.

Dans notre étude, environ 30 % des cellules IR-RP/SOM du VL se projettent en direction de la SGPM (Fig. 39). L'existence de cette projection plaide en faveur d'une action de la SOM, peut-être par l'intermédiaire de récepteurs SST2A ou SST1,

au niveau de la SGPM qui est un centre intégrateur des signaux hypothalamiques déclenchant le réflexe de lordose (Fig. 39). Il s'avère que d'autres neurones IR-RP/SOM du VL se projettent vers d'autres régions cérébrales (Fig. 39) qui restent à déterminer par des techniques de traçage axonal. Comme la SOM semble impliquée dans le comportement sexuel, il serait maintenant intéressant de réaliser des mesures de quotient de lordose après injection de SOM ou d'oligonucléotides antisens de la SOM au niveau du mésencéphale et également dans l'aire préoptique où des cellules IR-RP/SOM du VL sont susceptibles de se projeter. Des études analogues pourraient être réalisées avec la NT afin de préciser ses effets physiologiques sur la lordose et de déterminer les sites de projection des cellules IR-RP/NT du VL.

Trois populations cellulaires neuropeptidergiques (SOM, NT et SP) sont présentes dans le VL. Certaines de ces cellules contiennent le RP. Nous démontrons dans ce travail que ces trois neuropeptides ou même deux d'entre eux sont très peu souvent synthétisés par un même péricaryon cible de la progestérone (Fig. 39).

L'étude des effets des œstrogènes sur les immunoréactivités SOM, NT et SP montre une augmentation, spécifique au VL, du nombre de cellules IR-SOM et IR-SP tandis que le nombre des cellules IR-NT reste inchangé. Ces observations suggèrent que la synthèse de SOM et celle de SP sont stimulées, ce qui pourrait être vérifié par hybridation *in situ*.

Nous détectons la présence de NOS dans 30 % à 40 % des cellules IR-RP/SOM du VL alors qu'elle est nettement moins fréquente dans les cellules IR-NT et IR-SP. On peut penser que le NO synthétisé par les cellules IR-RP/NOS/SOM et IR-RP/NOS/SP module la libération de SOM et de SP de façon autocrine et celle de NT par une action paracrine (Fig. 39). Nos résultats concernant les effets des œstrogènes et/ou de la colchicine sur l'activité NADPHd du VL laissent supposer que ces substances stimulent la synthèse de la NOS neuronale. Des mesures ampérométriques de NO après addition de nitroprussiate de sodium, une substance stimulant la libération du NO, ou de N<sup>G</sup>-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), un inhibiteur de la NOS, dans le milieu de survie d'explants hypothalamiques de VL, réalisées simultanément avec des dosages de la SOM, de la SP et de la NT libérées dans ce milieu pourraient préciser l'action de NO sur la libération des neuropeptides

dans le VL. Par ailleurs, la stimulation de la synthèse de la NOS sous l'influence de la colchicine pourrait être confirmée par hybridation *in situ*.

Cette étude fournit une caractérisation neurochimique qui peut contribuer à la compréhension des interactions complexes entre diverses substances neuroactives impliquées vraisemblablement dans les mécanismes de régulation par la progestérone du comportement sexuel femelle.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G, Brann DW (1996). Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology* 64:449-455
- Aguila MC (1994). Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:782-786
- Akesson TR (1994). Gonadal steroids regulate immunoreactive tachykinin in the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 341:351-356
- Akesson TR, Micevych PE (1988). Estrogen concentration by substance P-immunoreactive neurons in the medial basal hypothalamus of the female rat. *J Neurosci Res* 19:412-419, 470-471
- Akesson TR, Ulibarri C, Truitt S (1994). Divergent axon collaterals originate in the estrogen receptive ventromedial nucleus of hypothalamus in the rat. *J Neurobiol* 25:406-414
- Albert DJ, Dyson EM, Walsh ML (1987). Intermale social aggression: reinstatement in castrated rats by implants of testosterone propionate in the medial hypothalamus. *Physiol Behav* 39:555-560
- Alexander MJ (1993). Estrogen-regulated synthesis of neurotensin in neurosecretory cells of the hypothalamic arcuate nucleus in the female rat. *Endocrinology* 133:1809-1816
- Alexander MJ, Leeman SE (1992). Neurotensin gene expression in the rat preoptic area. Implications for the regulation of reproduction. *Ann NY Acad Sci* 668:70-89

- Alexander MJ, Leeman SE (1994). Estrogen-inducible neurotensin immunoreactivity in the preoptic area of the female rat. *J Comp Neurol* 345:496-509
- Alexander MJ, Dobner PR, Miller MA, Bullock BP, Dorsa DM, Leeman SE (1989 a). Estrogen induces neurotensin/neuromedin N messenger ribonucleic acid in a preoptic nucleus essential for the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 125:2111-2117
- Alexander MJ, Mahoney PD, Ferris CF, Carraway RE, Leeman SE (1989 b). Evidence that neurotensin participates in the central regulation of the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 124:783-788
- Alexander MJ, Miller MA, Dorsa DM, Bullock BP, Melloni RH Jr, Dobner PR, Leeman SE (1989 c). Distribution of neurotensin/neuromedin N mRNA in rat forebrain: unexpected abundance in hippocampus and subiculum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5202-5206
- Alonso G (1988). Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res* 453:191-203
- Alonso JR, Sanchez F, Arevalo R, Carretero J, Vazquez R, Aijon J (1992). Partial coexistence of NADPH-diaphorase and somatostatin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 148:101-104
- Anderson CH, Shen CL (1980). Efferents of the medial preoptic area in the guinea pig: an autoradiographic study. *Brain Res Bull* 5:257-265
- Anderson CR, Furness JB, Woodman HL, Edwards SL, Crack PJ, Smith AI (1995). Characterisation of neurons with nitric oxide synthase immunoreactivity that project to prevertebral ganglia. *J Auton Nerv Syst* 52:107-116
- Arai Y, Gorski RA (1986). Effect of anti-estrogen on steroid induced sexual receptivity in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 3: 351-353.

- Arisawa M, De Palatis L, Ho R, Snyder GD, Yu WH, Pan G, McCann SM (1990). Stimulatory role of substance P on gonadotropin release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 51:523-529
- Auger AP, Moffatt CA, Blaustein JD (1997). Progesterone-independent activation of rat brain progesterin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology* 138:511-514
- Axelsson JF, Van Leeuwen FW (1990). Differential localization of estrogen receptors in various vasopressin synthesizing nuclei of the rat brain. *J Neuroendocrinol* 2 : 209-216
- Axelsson JF, Shannon W, Van Leeuwen FW (1992). Immunocytochemical localization of estrogen receptors within neurotensin cells in the rostral preoptic area of the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 136:5-9
- Babcock AM, Block GJ, Micevych PE (1988). Injections of cholecystinin into the ventromedial hypothalamic nucleus inhibit lordosis behavior in the rat. *Physiol Behav* 43:195-199
- Baldino F Jr, Fitzpatrick-McElligott S, O'Kane TM, Gozes I (1988). Hormonal regulation of somatostatin messenger RNA. *Synapse* 2:317-325
- Barfield RJ, Chen JJ (1977). Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate. *Endocrinology* 101:1716-1725
- Bayliss DA, Millhorn DE (1991). Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Mol Brain Res* 10:167-172
- Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857
- Beck B, Nicolas JP, Burlet C (1995). Neurotensin decreases with fasting in the ventromedian nucleus of obese Zucker rats. *Metabolism* 44:972-975

- Belsham DD, Wetsel WC, Mellon PL (1996). NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression. *EMBO J* 15:538-547
- Bentivoglio M, Kuypers HG, Catsman-Berrevoets CE, Dann O (1979). Fluorescent retrograde neuronal labeling in rat by means of substances binding specifically to adenine-thymine rich DNA. *Neurosci Lett* 12:235-240
- Bermond B, Mos J, Meelis W, van der Poel AM, Kruk MR (1982). Aggression induced by stimulation of the hypothalamus: effects of androgens. *Pharmacol Biochem Behav* 16:41-45
- Bertherat J, Dournaud P, Berod A, Normand E, Bloch B, Rostene W, Kordon C, Epelbaum J (1992). Growth hormone-releasing hormone-synthesizing neurons are a subpopulation of somatostatin receptor-labelled cells in the rat arcuate nucleus: a combined in situ hybridization and receptor light-microscopic radioautographic study. *Neuroendocrinology* 56:25-31
- Bethea CL, Widmann AA (1996). Immunohistochemical detection of progesterin receptors in hypothalamic beta-endorphin and substance P neurons of steroid-treated monkeys. *Neuroendocrinology* 63:132-141
- Bethea CL, Brown NA, Kohama SG (1996). Steroid regulation of estrogen and progesterin receptor messenger ribonucleic acid in monkey hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 137:4372-4383
- Beyer C, Canchola E (1981). Facilitation of progesterone induced lordosis behavior by phosphodiesterase inhibitors in estrogen primed rats. *Physiol Behav* 27:731-733
- Beyer C, Fernandez-Guasti A, Rodriguez-Manzo G (1982). Induction of female sexual behavior by GTP in ovariectomized estrogen primed rats. *Physiol Behav* 28:1073-1076
- Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, Ping L, Aguan K, Brann DW (1995). Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with

gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology* 62:187-197

Bhat G, Mahesh VB, Aguan K, Brann DW (1996). Evidence that brain nitric oxide synthase is the major nitric oxide synthase isoform in the hypothalamus of the adult female rat and that nitric oxide potently regulates hypothalamic cGMP levels. *Neuroendocrinology* 64:93-102

Bingaman EW, Baeckman LM, Yracheta JM, Handa RJ, Gray TS (1994). Localization of androgen receptor within peptidergic neurons of the rat forebrain. *Brain Res Bull* 35:379-382

Blaustein JD (1982). Alteration of sensitivity to progesterone facilitation of lordosis in guinea pigs by modulation of hypothalamic progestin receptors. *Brain Res* 243:287-300

Blaustein JD, Wade GN (1977). Concurrent inhibition of sexual behavior, but not brain [3H]estradiol uptake, by progesterone in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 91:742-751

Blaustein JD, Feder HH (1979). Cytoplasmic progestin receptors in female guinea pig brain and their relationship to refractoriness in expression of female sexual behavior. *Brain Res* 177:489-498

Blaustein JD, Turcotte JC (1989). Estradiol-induced progestin receptor immunoreactivity is found only in estrogen receptor-immunoreactive cells in guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 49:454-461

Blaustein JD, Turcotte JC (1990). Down-regulation of progestin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *J Neurobiol* 21:675-685

Blaustein JD, Ryer HI, Feder HH (1980). A sex difference in the progestin receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 31:403-409

- Blaustein JD, King JC, Toft DO, Turcotte J (1988). Immunocytochemical localization of estrogen-induced progesterin receptors in guinea pig brain. *Brain Res* 474:1-15
- Blaustein JD, Nielsen KH, Delville Y, Turcotte JC, Olster DH (1991). Neuroanatomical relationships of substance P and sex steroid hormone-sensitive neurons involved in sexual behavior. *Ann NY Acad Sci* 632:314-331
- Bleier R (1983). The hypothalamus of the guinea pig . A Cytoarchitectonic Atlas. Madison, University of Wisconsin Press.
- Bloch GJ, Babcock AM, Gorski RA, Micevych PE (1987). Cholecystokinin stimulates and inhibits lordosis behavior in female rats. *Physiol Behav* 39:217-224
- Bohlen P, Brazeau P, Benoit R, Ling N, Esch F, Guillemin R (1980). Isolation and amino acid composition of two somatostatin-like peptides from ovine hypothalamus: somatostatin-28 and somatostatin-25. *Biochem Biophys Res Commun* 96:725-734
- Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1993). Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:2481-2487
- Bonfoco E, Ceccatelli S, Manzo L, Nicotera P (1995). Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp Cell Res* 218:189-200
- Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1996). Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 67:2484-2493
- Boyer PA, Trembleau A, Leviel V, Arluison M (1994). Effects of intranigral injections of colchicine on the expression of some neuropeptides in the rat forebrain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res Bull* 33:541-560
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Lino N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1972). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 129 : 77-79

- Breder CD, Yamada Y, Yasuda K, Seino S, Saper CB, Bell GI (1992). Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci* 12:3920-3934
- Bredt DS, Snyder SH (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9030-9033
- Bredt DS, Snyder SH (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-685
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-624
- Bridges RS, Mann PE, Coppeta JS (1999). Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behaviour in the rat: inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas. *J Neuroendocrinol* 11: 259-266
- Brown ER, Harlan RE, Krause JE (1990). Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 126:330-340
- Brown TJ, MacLusky NJ (1994). Progesterone modulation of estrogen receptors in microdissected regions of the rat hypothalamus. *Mol Cell Neurosci* 5:283-290
- Brown TJ, Clark AS, MacLusky NJ (1987 a). Regional sex differences in progestin receptor induction in the rat hypothalamus: effects of various doses of estradiol benzoate. *J Neurosci* 7:2529-2536
- Brown TJ, Moore MJ, Blaustein JD (1987 b). Maintenance of progesterone-facilitated sexual behavior in female rats requires continued hypothalamic protein

synthesis and nuclear progesterin receptor occupation. *Endocrinology* 121:298-304

Brown TJ, Adler GH, Sharma M, Hochberg RB, MacLusky NJ (1994). Androgen treatment decreases estrogen receptor binding in the ventromedial nucleus of the rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic analysis. *Mol Cell Neurosci* 5:549-555

Brown TJ, Yu J, Gagnon M, Sharma M, MacLusky NJ (1996). Sex differences in estrogen receptor and progesterin receptor induction in the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res* 725:37-48

Brownstein M, Arimura A, Sato H, Schally AV, Kizer JS (1975). The regional distribution of somatostatin in the rat brain. *Endocrinology* 96:1456-1461

Brownstein MJ, Mroz EA, Kizer JS, Palkovits M, Leeman SE (1976). Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res* 116:299-305

Butera PC, Czaja JA (1984). Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. *Brain Res* 322:41-48

Butler JA, Sjoberg M, Coen CW (1999). Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol* 11:331-335

Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348:41-79

Carraway R, Leeman SE (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248:6854-6861

Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T (1989). Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9569-9573

- Ceccatelli S, Cortès R, Hokfelt T (1991). Effect of reserpine and colchicine on neuropeptide mRNA levels in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Mol Brain Res* 9:57-69
- Ceccatelli S, Grandison L, Scott RE, Pfaff DW, Kow LM (1996). Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 64:357-363
- Chesselet MF, Reisine TD (1983). Somatostatin regulates dopamine release in rat striatal slices and cat caudate nuclei. *J Neurosci* 3:232-236
- Chowen-Breed JA, Steiner RA, Clifton DK (1989). Sexual dimorphism and testosterone-dependent regulation of somatostatin gene expression in the periventricular nucleus of the rat brain. *Endocrinology* 125:357-362
- Chu HP, Etgen AM (1997). A potential role of cyclic GMP in the regulation of lordosis behavior of female rats. *Horm Behav* 32:125-132
- Chu HP, Morales JC, Etgen AM (1999). Cyclic GMP may potentiate lordosis behaviour by progesterone receptor activation. *Neuroendocrinol* 11:107-113
- Cintra A, Fuxe K, Härfstrand A, Agnati LF, Miller LS, Greene JL, Gustafsson JA (1986). On the cellular localization and distribution of estrogen receptors in the rat tel- and diencephalon using monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Neurochem Int* 8 : 587-595
- Clark JT, Kalra PS, Kalra SP (1985). Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology* 117:2435-2442
- Conde F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crepel F (1990). Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain Res Bull* 24:341-354
- Conrad LC, Pfaff DW (1976 a). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J Comp Neurol* 169:185-219

- Conrad LC, Pfaff DW (1976 b). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *J Comp Neurol* 169:221-261
- Cortès R, Ceccatelli S, Schalling M, Hokfelt T (1991). Differential effects of intracerebroventricular colchicine administration on the expression of mRNAs for neuropeptides and neurotransmitter enzymes, with special emphasis on galanin: an in situ hybridization study. *Synapse* 6:369-391
- Costa A, Trainer P, Besser M, Grossman A (1993). Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. *Brain Res* 605:187-192
- Croix D, Franchimont P (1975). Changes in serum levels of the gonadotrophins progesterone and estradiol during the estrous cycle of the guinea pig. *Neuroendocrinology* 19: 1-11
- Cuello AC, Emson P, del Fiacco M, Gale J, Iversen LL, Jessell TM, Kanazawa I, Paxinos G, Quik M (1978). Distribution and release of substance P in the central nervous system. *Centrally acting peptides* : 135-155.
- Cuello AC, Priestley JV, Paxinos G (1985). Substance P and enkephalin containing pathways. Paxinos G (Ed). *The Rat Nervous System. Vol 1. Forebrain and Midbrain.* Sydney : Academic press Australia . pp 441-469.
- Czaja JA, Butera PC, McCaffrey TA (1983). Independent effects of estradiol on water and food intake. *Behav Neurosci* 97:210-220
- Davis PG, Barfield RJ (1979). Activation of feminine sexual behavior in castrated male rats by intrahypothalamic implants of estradiol benzoate. *Neuroendocrinology* 28:228-233
- Dawson TM, Snyder SH (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159

- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-7801
- De Luca B, Monda M, Sullo A (1995). Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. *Am J Physiol* 268:1533-1538
- Delville Y, Blaustein JD (1991). A site for estradiol priming of progesterone-facilitated sexual receptivity in the ventrolateral hypothalamus of female guinea pigs. *Brain Res* 559:191-199
- Delville Y, Blaustein JD (1993). Estrogen receptor-immunoreactive forebrain neurons project to the ventrolateral hypothalamus in female guinea pigs. *J Comp Neurol* 334:571-589
- DonCarlos LL, Morrell JI (1990). A subset of progesterone target neurons have axonal projections to the midbrain. *Brain Res* 521: 213-220
- DonCarlos LL, Greene GL, Morrell JI (1989). Estrogen plus progesterone increases progesterin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology* 50:613-623
- DonCarlos LL, Monroy E, Morrell JI (1991). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of the female guinea pig. *J Comp Neurol* 305:591-612
- Donohoe TP, Stevens R (1982). Modulation of food intake by hypothalamic implants of estradiol benzoate, estrone, estriol and CI-628 in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 16:93-99
- Dornan WA, Malsbury CW, Penney RB (1987). Facilitation of lordosis by injection of substance P into the midbrain central gray. *Neuroendocrinology* 45:498-506
- Dornan WA, Akesson TR, Micevych PE (1990). A substance P projection from the VMH to the dorsal midbrain central gray: implication for lordosis. *Brain Res Bull* 25:791-796

- Dournaud P, Boudin H, Schonbrunn A, Tannenbaum GS, Beaudet A (1998). Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci* 18:1056-1071
- Dun NJ, Dun SL, Wong RK, Forstermann U (1994). Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2955-2959
- Duval P, Lenoir V, Garret C, Kerdelhue B (1996). Reduction of the amplitude of preovulatory LH and FSH surges and of the amplitude of the in vitro GnRH-induced LH release by substance P. Reversal of the effect by RP 67580. *Neuropharmacology* 35:1805-1810
- Duval P, Lenoir V, Kerdelhue B (1998). The in vitro effect of substance P on the GnRH-induced LH release depends on the steroidal environment and is reverted by a NK1 receptor antagonist (RP 67580) in the cycling female rat. *Neuropeptides* 32:97-101
- Edwards DA, Pfeifle JK (1981). Hypothalamic and midbrain control of sexual receptivity in the female rat. *Physiol Behav* 26:1061-1067
- Eisenfeld AJ (1967). Computer analysis of the distribution of [3H]estradiol. *Biochim Biophys Acta* 136:498-507
- Epelbaum J (1986). Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 27:63-100
- Erwin VG, Radcliffe RA (1993). Characterization of neurotensin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in brain regions of long sleep and short sleep mice. *Brain Res* 629:59-66
- Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895

- Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW (1989). Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp Brain Res* 77:221-233
- Feder HH, Marrone BL (1977). Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. *Ann NY Acad Sci* 286:331-354
- Ferris CF, Pan JX, Singer EA, Boyd ND, Carraway RE, Leeman SE (1984). Stimulation of luteinizing hormone release after stereotaxic microinjection of neurotensin into the medial preoptic area of rats. *Neuroendocrinology* 38:145-151
- Figueredo-Cardenas G, Morello M, Sancesario G, Bernardi G, Reiner A (1996). Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Res* 735:317-324
- Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P (1981). The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 6:2173-2192
- Fitzpatrick-McElligott S, Card JP, Lewis ME, Baldino F Jr (1988). Neuronal localization of prosomatostatin mRNA in the rat brain with in situ hybridization histochemistry. *J Comp Neurol* 273:558-572
- Fujisawa H, Ogura T, Kurashima Y, Yokoyama T, Yamashita J, Esumi H (1994). Expression of two types of nitric oxide synthase mRNA in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 63:140-145
- Funahashi T, Shimomura I, Hiraoka H, Arai T, Takahashi M, Nakamura T, Nozaki S, Yamashita S, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y (1995). Enhanced expression of rat obese (ob) gene in adipose tissues of ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Biochem Biophys Res Commun* 211:469-475

- Gallagher AW, Chahl LA, Lynch AM (1992). Distribution of substance P-like immunoreactivity in guinea pig central nervous system. *Brain Res Bull* 29:199-207
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388
- Goldschmidt RB, Steward O (1982). Neurotoxic effects of colchicine: differential susceptibility of CNS neuronal populations. *Neuroscience* 7:695-714
- Goldschmidt RB, Steward O (1989). Comparison of the neurotoxic effects of colchicine, the vinca alkaloids, and other microtubule poisons. *Brain Res* 486:133-140
- Goodman RH, Jacobs JW, Chin WW, Lund PK, Dee PC, Habener JF (1980). Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5869-5873
- Göthert M (1980). Somatostatin selectively inhibits noradrenaline release from hypothalamic neurones. *Nature* 288:86-88
- Goubillon ML, Delaleu B, Caraty A, Herbison AE (1999). Identification de peptides participant au rétrocontrôle exercé par les œstrogènes sur la sécrétion de gonadolibérine chez la brebis. Congrès des Neurosciences, Marseille 1999 (résumé).
- Goy RW, Phoenix CH (1963). Hypothalamic regulation of female sexual behavior; establishment of behavioral oestrus in spayed-guinea pigs following hypothalamic lesions. *J Reprod Fertil* 5:23-40
- Grossman AB, Rossmanith WG, Kabigting EB, Cadd G, Clifton D, Steiner RA (1994). The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotrophin-releasing hormone neurons. *J Endocrinol* 140:5-8

- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J (1992). Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 14:239-249
- Hansen S (1989). Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. *Behav Neurosci* 103:1035-1046
- Harlan RE, Shivers BD, Kow LM, Pfaff DW (1982). Intrahypothalamic colchicine infusions disrupt lordotic responsiveness in estrogen-treated female rats. *Brain Res* 238:153-167
- Helmchen C, Fu QG, Sandkuhler J (1995). Inhibition of spinal nociceptive neurons by microinjections of somatostatin into the nucleus raphe magnus and the midbrain periaqueductal gray of the anesthetized cat. *Neurosci Lett* 1995 Mar 3;187(2):137-41
- Herbison AE (1994). Somatostatin-immunoreactive neurones in the hypothalamic ventromedial nucleus possess oestrogen receptors in the male and female rat. *J Neuroendocrinol* 6:323-328
- Herbison AE (1995). Sexually dimorphic expression of androgen receptor immunoreactivity by somatostatin neurones in rat hypothalamic periventricular nucleus and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neuroendocrinol* 7:543-553
- Herbison AE, Theodosis DT (1991). Neurotensin-immunoreactive neurons in the rat medial preoptic area are oestrogen-receptive. *J Neuroendocrinol* 3:587-589
- Herbison AE, Theodosis DT (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience* 50:283-298
- Herbison AE, Theodosis DT (1993). Absence of estrogen receptor immunoreactivity in somatostatin (SRIF) neurons of the periventricular nucleus but sexually dimorphic colocalization of estrogen receptor and SRIF immunoreactivities in

neurons of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* 132:1707-1714

Herbison AE, Robinson JE, Skinner DC (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57:751-759

Herbison AE, Horvath TL, Naftolin F, Leranath C (1995). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in monkey hypothalamus: relationship to neurones containing luteinizing hormone-releasing hormone and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 61:1-10

Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC (1996). Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 8:73-82

Ho LT, Chern YF, Lin MT (1989). The hypothalamic somatostatinergic pathways mediate feeding behavior in the rat. *Experientia* 45:161-162

Hoffman GE (1985). Organization of LHRH cells: differential apposition of neurotensin, substance P and catecholamine axons. *Peptides* 6:439-461

Hökfelt T, Efendic S, Johansson O, Luft R, Arimura A (1974). Immunohistochemical localization of somatostatin (growth hormone release-inhibiting factor) in the guinea pig brain. *Brain Res* 80:165-169

Hökfelt T, Skagerberg G, Skirboll L, Björklund A (1983). Combination of retrograde tracing and neurotransmitter histochemistry. A Björklund and T Hökfelt (Eds). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 1: Methods in Chemical Neuroanatomy.* pp 228-285. Elsevier Science Publisher

Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2811-2814

- Horvath S, Palkovits M, Gorcs T, Arimura A (1989). Electron microscopic immunocytochemical evidence for the existence of bidirectional synaptic connections between growth hormone-releasing hormone- and somatostatin-containing neurons in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 481:8-15
- Huang X, Harlan RE (1994). Androgen receptor immunoreactivity in somatostatin neurons of the periventricular nucleus but not in the bed nucleus of the stria terminalis in male rats. *Brain Res* 652:291-296
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269
- Jankowiak R, Stern JJ (1974). Food intake and body weight modifications following medial hypothalamic hormone implants in female rats. *Physiol Behav* 12:875-879
- Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW (1982). Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 210:211-224
- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP (1984). Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13:265-339
- Jolas T, Aghajanian GK (1996). Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Eur J Neurosci* 8:153-161
- Kahn D, Abrams GM, Zimmerman EA, Carraway R, Leeman SE (1980). Neurotensin neurons in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study. *Endocrinology* 107:47-54
- Kalivas PW, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1982). Neuroanatomical site specific modulation of spontaneous motor activity by neurotensin. *Eur J Pharmacol* 78:471-474

- Kalivas PW, Nemeroff CB, Miller JS, Prange AJ Jr (1985). Microinjection of neurotensin into the ventral tegmental area produces hypothermia: evaluation of dopaminergic mediation. *Brain Res* 326:219-227
- Kalra SP, Clark JT, Sahu A, Dube MG, Kalra PS (1988). Control of feeding and sexual behaviors by neuropeptide Y: physiological implications. *Synapse* 2:254-257
- Karanth S, Lyson K, McCann SM (1993). Role of nitric oxide in interleukin-2-induced CRF release from incubated hypothalami. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3383-3387
- Kato J (1978). Brain receptors for sex steroid hormones and their characterization and functional implications. Scott DE, Kozlowski GP, Collins F (Eds). *Brain-Endocrine Interaction III. Neural hormones and reproduction*. pp 286-301. Karger, Basel.
- Kato J, Villet CA (1967). Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 80:567-575
- Kato J, Onouchi T (1977). Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 101:920-928
- Kato M (1992). Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* 131:2133-2138
- Katz LC, Burkhalter A, Dreyer WJ (1984). Fluorescent latex microspheres as a retrograde neuronal marker for in vivo and in vitro studies of visual cortex. *Nature* 310: 498-500
- Kawano H, Daikoku S, Saito S (1982). Immunohistochemical studies of intrahypothalamic somatostatin-containing neurons in rat. *Brain Res* 242:227-232

- Kennedy GC (1964). Hypothalamic control of the endocrine and behavioral changes associated with oestrus in the rat. *J Physiol* 172: 383-392
- King WJ, Greene GL (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307:745-747
- Kislauskis E, Bullock B, McNeil S, Dobner PR (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem* 263:4963-4968
- Kiyama H, Emson PC (1991). Colchicine-induced expression of proneurotensin mRNA in rat striatum and hypothalamus. *Mol Brain Res* 9:353-358
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159-5162
- Kobayashi RM, Brown M, Vale W (1977). Regional distribution of neurotensin and somatostatin in rat brain. *Brain Res* 126:584-588
- Kow LM, Mobbs CV, Pfaff DW (1994). Roles of second-messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides, and estrogen: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 18:251-268
- Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD (1987). Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:881-885
- Krieger MS, Conrad LC, Pfaff DW (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 183: 785-815
- Kruk MR, Van der Poel AM, Meelis W, Hermans J, Mostert PG, Mos J, Lohman AH (1983). Discriminant analysis of the localization of aggression-inducing electrode placements in the hypothalamus of male rats. *Brain Res* 260:61-79



- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 5:891-897
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930
- Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 36:357-378
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6348-6352
- Lammers JH, Kruk MR, Meelis W, van der Poel AM (1988). Hypothalamic substrates for brain stimulation-induced attack, teeth-chattering and social grooming in the rat. *Brain Res* 449:311-327
- Lauber AH, Romano GJ, Mobbs CV, Pfaff DW (1990). Estradiol regulation of estrogen receptor mRNA in rat hypothalamus : an in situ hybridization study. *J Neuroendocrinol* 2 : 605-611
- Lauber AH, Mobbs CV, Muramatsu M, Pfaff DW (1991). Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology* 129:3180-3186
- Lehman MN, Karsch FJ (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133:887-895

- Li YQ, Zeng SL, Dong YX, Rao ZR, Shi JW (1991). Serotonin-, substance P- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons projecting from the periaqueductal gray to the ventromedial hypothalamic nucleus in the rat. *Neurosci Lett* 134:33-36
- Liposits Z, Merchenthaler I, Paull WK, Flerko B (1988). Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry* 89:247-252
- Lisciotto CA, Morrell JI (1993). Circulating gonadal steroid hormones regulate estrogen receptor mRNA in the male rat forebrain. *Mol Brain Res* 20:79-90
- Lisk RD (1962). Diencephalic placement of estradiol and sexual receptivity in the female rat. *Am J Physiol* 203: 493-496
- Ljungdahl A, Hokfelt T, Nilsson G (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3:861-943
- Logeat F, Vu Hai MT, Fournier A, Legrain P, Buttin G, Milgrom E (1983). Monoclonal antibodies to rabbit progesterone receptor: crossreaction with other mammalian progesterone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6456-6459
- Logeat F, Pamphile R, Loosfelt H, Jolivet A, Fournier A, Milgrom E (1985). One-step immunoaffinity purification of active progesterone receptor. Further evidence in favor of the existence of a single steroid binding subunit. *Biochemistry* 24: 1029-1035
- Loosfelt H, Logeat F, Vu Hai MT, Milgrom E (1984). The rabbit progesterone receptor. Evidence for a single steroid-binding subunit and characterization of receptor mRNA. *J Biol Chem* 259: 14196-14202
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9045-9049

- Lopez FJ, Moretto M, Merchenthaler I, Negro-Vilar A (1997). Nitric oxide is involved in the genesis of pulsatile LHRH secretion from immortalized LHRH neurons. *J Neuroendocrinol* 9:647-654
- Lorenzo F, Jolivet A, Loosfelt H, Thu vu Hai M, Brailly S, Perrot-Appianat M, Milgrom E (1988). A rapid method of epitope mapping. Application to the study of immunogenic domains and to the characterization of various forms of rabbit progesterone receptor. *Eur J Biochem* 176: 53-60
- Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6711-6715
- Lumme A, Vanhatalo S, Sadeniemi M, Soinila S (1997). Expression of nitric oxide synthase in hypothalamic nuclei following axonal injury or colchicine treatment. *Exp Neurol* 144:248-257
- Mandarino L, Stenner D, Blanchard W, Nissen S, Gerich J, Ling N, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Guillemin R (1981). Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature* 291:76-77
- Mani SK, Allen JM, Clark JH, Blaustein JD, O'Malley BW (1994 a). Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265:1246-1249
- Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH (1994 b). Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6468-6472
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW, Clark JH (1994 c). Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135:1409-1414

- Manogue KR, Kow LM, Pfaff DW (1980). Selective brain stem transections affecting reproductive behavior of female rats: the role of hypothalamic output to the midbrain. *Horm Behav* 14:277-302
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993). Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488
- Marsden PA, Heng HH, Duff CL, Shi XM, Tsui LC, Hall AV (1994). Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* 19:183-185
- Mathews D, Edwards DA (1977). The ventromedial nucleus of the hypothalamus and the hormonal arousal of sexual behaviors in the female rat. *Horm Behav* 8:40-51
- Mayer AD, Rosenblatt JS (1987). Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm Behav* 21:253-267
- McBride RL, Sutin J (1977). Amygdaloid and pontine projections to the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 174:377-396
- McCann SM, Rettori V (1996). The role of nitric oxide in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 211:7-15
- McCarthy GF, Beaudet A, Tannenbaum GS (1992). Colocalization of somatostatin receptors and growth hormone-releasing factor immunoreactivity in neurons of the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 56:18-24
- Meisel RL, Pfaff DW (1984). RNA and protein synthesis inhibitors: effects on sexual behavior in female rats. *Brain Res Bull* 12:187-193
- Meisel RL, Pfaff DW (1985). Specificity and neural sites of action of anisomycin in the reduction or facilitation of female sexual behavior in rats. *Horm Behav* 19:237-251

- Meyerson BJ (1982). Colchicine delays the estrogen-induced copulatory response in the ovariectomized female rat. *Brain Res* 253:281-286
- Moguilewsky M, Raynaud JP (1977). Progesterin binding sites in the rat hypothalamus pituitary and uterus. *Steroids* 30:99-109
- Moilanen E, Vapaatalo H (1995). Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 27:359-367
- Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ (1994). Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263:973-977
- Moretto M, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1993). Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 133:2399-2402
- Morin LP (1977). Progesterone: inhibition of rodent sexual behavior. *Physiol Behav* 18: 701-715
- Morin LP, Feder HH (1974). Intracranial estradiol benzoate implants and lordosis behavior of ovariectomized guinea pigs. *Brain Res* 70: 95-102
- Moss RL, McCann SM (1973). Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181: 177-179
- Moyse E, Rostene W, Vial M, Leonard K, Mazella J, Kitabgi P, Vincent JP, Beaudet A (1987). Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>3</sup>-neurotensin. *Neuroscience* 22:525-536
- Murray HE, Simonian SX, Herbison AE, Gillies GE (1999). Correlation of hypothalamic somatostatin mRNA expression and peptide content with

secretion: sexual dimorphism and differential regulation by gonadal factors. *J Neuroendocrinol* 11:27-33

Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 378:383-386

Nemeroff CB, Osbahr AJ, Manberg PJ, Ervin GN, Prange AJ Jr (1979). Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5368-5371

Nielsen KH, Blaustein JD (1990). Many progesterin receptor-containing neurons in the guinea pig ventrolateral hypothalamus contain substance P: immunocytochemical evidence. *Brain Res* 517:175-181

Numan M (1990). Neural control of maternal behavior. Krasnegor NA, Bridges RS (Eds). *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants*. New York: Oxford. pp 231-259.

Ogawa S, Olazabal UE, Parhar IS, Pfaff DW (1994). Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J Neurosci* 14:1766-1774

Ogawa S, Taylor JA, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1996). Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology* 64:467-470

Okamura H, Yokosuka M, Hayashi S (1994 a). Induction of substance P-immunoreactivity by estrogen in neurons containing estrogen receptors in the anteroventral periventricular nucleus of female but not male rats. *J Neuroendocrinol* 6:609-615

- Okamura H, Yokosuka M, Hayashi S (1994 b). Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J Neuroendocrinol* 6:597-601
- Okamura H, Yokosuka M, McEwen BS, Hayashi S (1994 c). Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology* 135:1705-1708
- Olster DH, Blaustein JD (1990 a). Biochemical and immunocytochemical assessment of neural progesterin receptors following estradiol treatments that eliminate the sex difference in progesterone –facilitated lordosis in guinea pigs. *J Neuroendocrinol* 2: 79-86
- Olster DH, Blaustein JD (1990 b). Immunocytochemical colocalization of progesterin receptors and beta-endorphin or enkephalin in the hypothalamus of female guinea pigs. *J Neurobiol* 21:768-780
- Olster DH, Blaustein JD (1992 a). Estradiol pulses induce progesterin receptors selectively in substance P-immunoreactive neurons in the ventrolateral hypothalamus of female guinea pigs. *J Neurobiol* 23:293-301
- Olster DH, Blaustein JD (1992 b). Progesterin receptors in substance P-immunoreactive neurons in the hypothalamus of male guinea pigs after behaviorally effective estradiol pulse treatment. *J Neurobiol* 23:302-308
- Osbahr AJ, Nemeroff CB, Manberg PJ, Prange AJ Jr (1979). Centrally administered neurotensin: activity in the Julou-Courvoisier muscle relaxation test in mice. *Eur J Pharmacol* 54:299-302
- Perrot-Applanat M, Logeat F, Groyer-Picard MT, Milgrom E (1985). Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. *Endocrinology* 116:1473-1484
- Pfaff DW (1968). Uptake of 3H-estradiol by the female rat brain. An autoradiographic study. *Endocrinology* 82:1149-1155

- Pfaff DW (1973). Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182:1148-1149
- Pfaff DW (1989). Features of a hormone-driven defined neural circuit for a mammalian behavior. Principles illustrated, neuroendocrine syllogisms, and multiplicative steroid effects. *Ann NY Acad Sci* 563:131-147
- Pfaff D, Keiner M (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol* 151:121-158
- Pfaff DW, Sakuma Y (1979 a). Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol (Lond)* 288:203-210
- Pfaff DW, Sakuma Y (1979 b). Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol (Lond)* 288:189-202
- Pfeifle JK, Shivers M, Edwards DA (1980). Parasagittal hypothalamic knife cuts and sexual receptivity in the female rat. *Physiol Behav* 24:145-150
- Phelps CP, Nance DM, Saporta S (1980). Reduced ovarian function and lordosis behavior following hypothalamic knife cuts. *Brain Res Bull* 5:531-537
- Pollio G, Xue P, Zanisi M, Nicolin A, Maggi A (1993). Antisense oligonucleotide blocks progesterone-induced lordosis behavior in ovariectomized rats. *Mol Brain Res* 19:135-139
- Poulain P (1974). L'hypothalamus et le septum du cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 63 : 37-50
- Powell D, Leeman S, Tregear GW, Niall HD, Potts JT Jr (1973). Radioimmunoassay for substance P. *Nat New Biol* 241:252-254

- Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW (1991). Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254:1636-1639
- Powers JB (1975). Anti-estrogenic suppression of the lordosis response in female rats. *Horm Behav* 6:379-392
- Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A (1980). N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109:55-58
- Prevot V, Croix D, Rialas CM, Poulain P, Fricchione GL, Stefano GB, Beauvillain JC (1999). Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor. *Endocrinology* 140:652-659
- Priest CA, Vink KL, Micevych PE (1995). Temporal regulation by estrogen of beta-preprotachykinin mRNA expression in the rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Mol Brain Res* 28:61-71
- Pu S, Xu B, Kalra SP, Kalra PS (1996). Evidence that gonadal steroids modulate nitric oxide efflux in the medial preoptic area: effects of N-methyl-D-aspartate and correlation with luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:1949-1955
- Quirion R, Dam TV (1985). Multiple tachykinin receptors. Jordan CC, Oehme P (Eds). *Substance P Metabolism and Biological Actions*. Philadelphia : Taylor & Francis. pp 45-63.
- Rachman IM, Unnerstall JR, Pfaff DW, Cohen RS (1998). Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA in lordosis-relevant neurons of the ventromedial hypothalamus following short-term estrogen treatment. *Mol Brain Res* 59:105-108
- Rainbow TC, McGinnis MY, Davis PG, McEwen BS (1982 a). Application of anisomycin to the lateral ventromedial nucleus of the hypothalamus inhibits the

activation of sexual behavior by estradiol and progesterone. *Brain Res* 233:417-423

Rainbow TC, Parsons B, McEwen BS (1982 b). Sex differences in rat brain oestrogen and progestin receptors. *Nature* 300:648-649

Reisine T (1995). Somatostatin. *Cell Mol Neurobiol* 15:597-614

Renaud LP, Martin JB, Brazeau P (1976). Hypothalamic releasing factors : physiological evidence for a regulatory action on central neurons and pathways for their distribution in the brain. *Pharmacol Biochem Behav* 5 :171-178

Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM (1993). Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10130-10134

Rettori V, Belova N, Yu WH, Gimeno M, McCann SM (1994 a). Role of nitric oxide in control of growth hormone release in the rat. *Neuroimmunomodulation* 1:195-200

Rettori V, Kamat A, McCann SM (1994 b). Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid in vitro. *Brain Res Bull* 33:501-503

Ricciardi KH, Blaustein JD (1994). Projections from ventrolateral hypothalamic neurons containing progestin receptor- and substance P-immunoreactivity to specific forebrain and midbrain areas in female guinea pigs. *J Neuroendocrinol* 6: 135-144

Ricciardi KH, Turcotte JC, De Vries GJ, Blaustein JD (1996). Efferent projections from the ovarian steroid receptor-containing area of the ventrolateral hypothalamus in female guinea pigs. *J Neuroendocrinol* 8: 673-685

Rioux F, Quirion R, St-Pierre S, Regoli D, Jolicoeur FB, Belanger F, Barbeau A (1981). The hypotensive effect of centrally administered neurotensin in rats. *Eur J Pharmacol* 69:241-247

- Riskind P, Moss RL (1979). Midbrain central gray: LHRH infusion enhances lordotic behavior in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 4:203-205
- Robbins RJ, Landon RM (1985). The effects of neurotensin, vasoactive intestinal polypeptide and other neuropeptides on the secretion of somatostatin from cerebral cortical cells. *Brain Res* 332:161-164
- Robbins A, Schwartz-Giblin S, Pfaff DW (1990). Ascending and descending projections to medullary reticular formation sites which activate deep lumbar back muscles in the rat. *Exp Brain Res* 80:463-474
- Rodriguez-Sierra JF, Terasawa E (1979). Lesions of the preoptic area facilitate lordosis behavior in male and female guinea pigs. *Brain Res Bull* 4:513-517
- Romano GJ, Bonner TI, Pfaff DW (1989 a). Preprotachykinin gene expression in the mediobasal hypothalamus of estrogen-treated and ovariectomized control rats. *Exp Brain Res* 76:21-26
- Romano GJ, Krust A, Pfaff DW (1989 b). Expression and estrogen regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an in situ hybridization study. *Mol Endocrinol* 3:1295-1300
- Rotsztein WH, Drouva SV, Epelbaum J, Kordon C (1982). Somatostatin inhibits in vitro release of luteinizing hormone releasing hormone from rat mediobasal hypothalamic slices. *Experientia* 38:974-975
- Roy EJ, MacLusky NJ, McEwen BS (1979). Antiestrogen inhibits the induction of progestin receptors by estradiol in the hypothalamus-proptic area and pituitary. *Endocrinology* 104 : 1333-1336
- Rubin BS, Barfield RJ (1983 a). Induction of estrous behavior in ovariectomized rats by sequential replacement of estrogen and progesterone to the ventromedial hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37:218-224

- Rubin BS, Barfield RJ (1983 b). Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behavior in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology* 113:797-804
- Rushlow W, Flumerfelt BA, Naus CC (1995). Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase in the caudate-putamen of the rat. *J Comp Neurol* 351:499-508
- Sakuma Y, Pfaff DW (1979 a). Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol* 237:278-284
- Sakuma Y, Pfaff DW (1979 b). Mesencephalic mechanisms for integration of female reproductive behavior in the rat. *Am J Physiol* 237:285-290
- Sakuma Y, Pfaff DW (1982). Properties of ventromedial hypothalamic neurons with axons to midbrain central gray. *Exp Brain Res* 46:292-300
- Sakuma Y, Pfaff DW (1983). Modulation of the lordosis reflex of female rats by LHRH, its antiserum and analogs in the mesencephalic central gray. *Neuroendocrinology* 36:218-224
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM (1976). The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169: 409-442
- Sar M, Stumpf WE (1973). Neurons of the hypothalamus concentrate (3H)progesterone or its metabolites. *Science* 182:1266-1268
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K (1997). Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138:947-954

- Satou M, Yamanouchi K (1996). Inhibitory effect of progesterone on sexual receptivity in female rats: a temporal relationship to estrogen administration. *Zoolog Sci* 13:609-613
- Sawada S, Takada S, Yamamoto C (1980). Electrical activity recorded from thin sections of the bed nucleus of the stria terminalis, and the effects of neurotensin. *Brain Res* 188:578-581
- Sawchenko PE, Swanson LW (1981). A method for tracing biochemically defined pathways in the central nervous system using combined fluorescence retrograde transport and immunohistochemical techniques. *Brain Res* 210:31-51
- Schindler M, Holloway S, Hathway G, Woolf CJ, Humphrey PP, Emson PC (1998). Identification of somatostatin sst2(a) receptor expressing neurones in central regions involved in nociception. *Brain Res* 798:25-35
- Schmued LC, Fallon JH (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377: 147-154
- Schuman EM, Madison DV (1994). Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-183
- Senaris RM, Lago F, Lewis MD, Dominguez F, Scanlon MF, Dieguez C (1992). Differential effects of in vivo estrogen administration on hypothalamic growth hormone releasing hormone and somatostatin gene expression. *Neurosci Lett* 141:123-126
- Shen CL (1983). Efferent projections from the lateral hypothalamus in the guinea pig: an autoradiographic study. *Brain Res Bull* 11: 335-347
- Sheppard MC, Kronheim S, Pimstone BL (1979). Effect of substance P, neurotensin and the enkephalins on somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro. *J Neurochem* 32:647-649

- Sheppard MC, Askew RD, Shennan KI, Franks S, Ramsden DB (1983). Neurotensin regulation of TSH secretion in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 113:248-254
- Shirasu K, Stumpf WE, Sar M (1990). Evidence for direct action of estradiol on growth hormone-releasing factor (GRF) in rat hypothalamus: localization of [3H]estradiol in GRF neurons. *Endocrinology* 127:344-349
- Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW (1984). Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304 : 345-347
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525
- Simerly RB, Young BJ (1991). Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol Endocrinol* 5:424-432
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76-95
- Skirboll L, Hökfelt T, Norell G, Phillipson O, Kuipers HGJM, Bentivoglio M, Castman-Berrevoets CE, Visser TJ, Steinbusch H, Verhofstad A, Cuello AC, Goldstein M, Browstein M (1984). A method for specific transmitter identification of retrogradely labeled neurons : immunofluorescence combined with fluorescence tracing. *Brain Res Rev* 8 : 99-127
- Southern C, Schulster D, Green IC (1990). Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett* 276:42-44

- Staiger JF, Nurnberger F (1991). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res* 264:391-413
- Stricker-Krongrad A, Beck B, Burlet C (1996). Nitric oxide mediates hyperphagia of obese Zucker rats: relation to specific changes in the microstructure of feeding behavior. *Life Sci* 58:9-15
- Stumpf WE (1968). Estradiol-concentrating neurons: topography in the hypothalamus by dry-mount autoradiography. *Science* 162:1001-1003
- Sullivan KA, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ (1995). Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res* 685:198-200
- Summy-Long JY, Bui V, Mantz S, Koehler E, Weisz J, Kadakari M (1993). Central inhibition of nitric oxide synthase preferentially augments release of oxytocin during dehydration. *Neurosci Lett* 152:190-193
- Swann JM, Newman SW (1992). Testosterone regulates substance P within neurons of the medial nucleus of the amygdala, the bed nucleus of the stria terminalis and the medial preoptic area of the male golden hamster. *Brain Res* 590:18-28
- Swanson LW (1976). An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *J Comp Neurol* 167:227-256
- Takeo T, Chiba Y, Sakuma Y (1993). Suppression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. *Physiol Behav* 53:831-838
- Ter Horst GJ, Luiten PG (1987). Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Res Bull* 18:191-203
- Thornton JE, Nock B, Feder HH, McEwen BS (1989). Sex differences in cytosolic progesterin receptors in microdissected regions of the hypothalamus/preoptic area of guinea pigs. *Brain Res* 503: 253-257

- Tramu G, Pillez A, Leonardelli J (1978). An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 26: 322-324
- Turcotte JC, Blaustein JD (1993). Immunocytochemical localization of midbrain estrogen receptor- and progesterin receptor-containing cells in female guinea pigs. *J Comp Neurol* 328:76-87
- Turcotte JC, Blaustein JD (1997). Convergence of substance P and estrogen receptor immunoreactivity in the midbrain central gray of female guinea pigs. *Neuroendocrinology* 66:28-37
- Turcotte JC, Blaustein JD (1999). Projections of the estrogen receptor-immunoreactive ventrolateral hypothalamus to other estrogen receptor-immunoreactive sites in female guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 69: 63-76
- Uhl GR, Goodman RR, Snyder SH (1979). Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* 167:77-91
- Vanhatalo S, Lumme A, Soinila S (1998). Colchicine differentially induces the expressions of nitric oxide synthases in central and peripheral catecholaminergic neurons. *Exp Neurol* 150:107-114
- Vathy I, Etgen AM (1989). Hormonal activation of female sexual behavior is accompanied by hypothalamic norepinephrine release. *J Neuroendocrinol* 1 : 383-388.
- Vijayan E, McCann SM (1979). In vivo and in vitro effects of substance P and neurotensin on gonadotropin and prolactin release. *Endocrinology* 105:64-68
- Vincent SR, Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-784

- Vincent SR, McIntosh CH, Buchan AM, Brown JC (1985). Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 238:169-186
- Von Euler US, Gaddum JH (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol Lond* 72 : 74-87
- Wade GN, Zucker I (1970). Development of hormonal control over food intake and body weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 70:213-220
- Wade GN, Lempicki RL, Panicker AK, Frisbee RM, Blaustein JD (1997). Leptin facilitates and inhibits sexual behavior in female hamsters. *Am J Physiol* 272:1354-1358
- Walczewska A, Szkudlarek U, Jakubowska-Naziemblo B, Dziedzic B, Traczyk WZ (1998). Increase of gonadotropin-releasing hormone concentration in pituitary portal blood after substance P administration in male rats. *Neuroendocrinology* 67:219-227
- Wang H, Morris JF (1999). Effects of oestrogen upon nitric oxide synthase NADPH-diaphorase activity in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Neuroscience* 88:151-158
- Warembourg (1970). Fixation de l'œstradiol-3H au niveau des noyaux amygdaliens, septaux et du système hypothalamo-hypophysaire chez la souris femelle. *CR Acad Sci (Paris)* 270: 152-154.
- Warembourg M (1977). Radioautographic localization of estrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea pig. *Brain Res* 123:357-362
- Warembourg M (1978 a). Radioautographic study of the brain and pituitary after [<sup>3</sup>H] progesterone injection into estrogen-primed ovariectomized guinea pigs. *Neurosci Lett* 7 : 1-5
- Warembourg M (1978 b). Radioautographic study of the rat brain, uterus and vagina after [<sup>3</sup>H]R-5020 injection. *Mol Cell Endocrinol* 12:67-79

- Warembourg M, Jolivet A (1993). Immunocytochemical localization of progesterone receptors in galanin neurons in the guinea pig hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 5:487-491
- Warembourg M, Jolivet A (1994). Progesterone receptor and neurotensin are colocalized in neurons of the guinea pig ventrolateral hypothalamus. *Neuroendocrinology* 60:486-492
- Warembourg M, Logeat F, Milgrom E (1986). Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the guinea pig central nervous system. *Brain Res* 384:121-131
- Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E (1989). Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res* 480:1-15
- Warembourg M, Leroy D, Peytevin J, Martinet L (1998). Estrogen receptor and progesterone receptor-immunoreactive cells are not co-localized with gonadotropin-releasing hormone in the brain of the female mink (*Mustela vison*). *Cell Tissue Res* 291:33-41
- Warembourg M, Leroy D, Jolivet A (1999). Nitric oxide synthase in the guinea pig preoptic area and hypothalamus: distribution, effect of estrogen, and colocalization with progesterone receptor. *J Comp Neurol* 407 : 207-227
- Waring DW, Turgeon JL (1992). A pathway for luteinizing hormone releasing-hormone self-potential: cross-talk with the progesterone receptor. *Endocrinology* 130:3275-3282
- Watson REJr, Langub MCJr, Landis JW (1992). Further evidence that most luteinizing hormone-releasing hormone neurons are not directly estrogen responsive: simultaneous localization of luteinizing hormone-releasing hormone and estrogen receptor immunoreactivity in the guinea pig brain. *J Neuroendocrinol* 4 : 311-317

- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5212-5216
- Weingarten HP, Chang PK, McDonald TJ (1985). Comparison of the metabolic and behavioral disturbances following paraventricular- and ventromedial-hypothalamic lesions. *Brain Res Bull* 14:551-559
- Werner H, Koch Y, Baldino F Jr, Gozes I (1988). Steroid regulation of somatostatin mRNA in the rat hypothalamus. *J Biol Chem* 263:7666-7671
- Wessendorf MW (1991). Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res* 553:135-148
- Whalen RE, Luttge WG (1971). Differential localization of progesterone uptake in brain. Role of sex, estrogen pretreatment and adrenalectomy. *Brain Res* 33:147-155
- Whalen RE, Gorzalka BB, DeBold JF, Quadagno DM, Ho GK, Hough JC Jr (1974). Studies on the effects of intracerebral actinomycin D implants on estrogen-induced receptivity in rats. *Horm Behav* 5:337-343
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254 :1001-1003
- Wu T, Li A, Wang HL (1995). Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res* 683:242-250
- Yamada K, Emson P, Hokfelt T (1996). Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat* 10:295-316

- Yamanouchi K, Arai Y (1983). Forebrain and lower brainstem participation in facilitatory and inhibitory regulation of the display of lordosis in female rats. *Physiol Behav* 30:155-159
- Yamanouchi K, Arai Y (1985). Presence of a neural mechanism for the expression of female sexual behaviors in the male rat brain. *Neuroendocrinology* 40:393-397
- Yokosuka M, Hayashi S (1996). Colocalization of neuronal nitric oxide synthase and androgen receptor immunoreactivity in the premammillary nucleus in rats. *Neurosci Res* 26:309-314
- Young WS, Kuhar MJ (1981). Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain. *Brain Res* 206:273-285
- Yuri K, Kawata M (1992). Nuclear localization of estrogen receptor-immunoreactivity in the preoptic area of female rats and its reduction by intraventricular colchicine treatment. *Neurosci Lett* 142:135-138
- Zorrilla R, Simard J, Rheaume E, Labrie F, Pelletier G (1990). Multihormonal control of pre-pro-somatostatin mRNA levels in the periventricular nucleus of the male and female rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 52:527-536
- Zucker I (1967). Facilitory and inhibitory effects of progesterone on sexual responses of spayed guinea pigs. *J Comp Physiol Psycho* 3: 376-381

# RESUME

## Résumé:

Le noyau ventrolatéral (VL) hypothalamique du cobaye est une région cible à la fois pour l'œstradiol et pour la progestérone dans la régulation de la réceptivité sexuelle femelle caractérisée par le réflexe de lordose. Cette étude s'est intéressée au contenu neurochimique et aux projections des neurones du VL qui contiennent le récepteur de la progestérone (RP) induit par les œstrogènes.

L'analyse quantitative des neurones immunoréactifs (IR) pour le RP dans le VL, chez des cobayes mâles et chez des cobayes femelles, révèle chez le mâle un nombre significativement supérieur de cellules IR-RP. La présence de somatostatine (SOM) dans 30 % environ des cellules IR-RP du VL, observée après une double réaction immunofluorescente, indique une action directe de la progestérone sur ce système neuropeptidergique. Deux autres neuropeptides, la neurotensine (NT) et la substance P (SP), sont également présents dans des neurones IR-RP du VL mais une triple marquage immunofluorescent démontre que les trois neuropeptides, ou même deux d'entre eux, sont très peu souvent synthétisés par un même péricaryon cible de la progestérone. Par ailleurs, l'immunoréactivité de deux de ces trois neuropeptides, la SOM et la SP, est significativement augmentée dans le VL sous l'effet des œstrogènes. Ces données peuvent être considérées comme des arguments neurochimiques en faveur d'une action de ces neuropeptides sur la réceptivité sexuelle. La technique de transport axonal rétrograde pour l'étude des projections associée à la double réaction immunocytochimique mettent en évidence pour 30 % des neurones IR-RP/SOM du VL des projections vers la région périventriculaire mésencéphalique et établissent ainsi l'existence d'une relation directe du VL vers le mésencéphale, centre intégrateur des signaux hypothalamiques déclenchant le réflexe de lordose. L'étape suivante, qui a consisté à rechercher par un triple marquage immunofluorescent, la présence de la synthétase du monoxyde d'azote (NOS) dans les cellules IR-RP contenant un neuropeptide, démontre que 30 à 40 % des cellules IR-RP/SOM et moins de 10 % des cellules IR-RP/SP contiennent l'enzyme. De plus, une augmentation significative de l'activité NOS est mise en évidence sous l'effet des œstrogènes et de la colchicine.

Ces résultats suggèrent qu'il existe des interactions complexes entre les neuropeptides et la NOS dans les mécanismes de régulation par la progestérone du réflexe de lordose.

## Mots-clés :

- noyau ventrolatéral hypothalamique
- cobaye
- récepteur de la progestérone
- neuropeptides

- NOS
- immunocytochimie
- lordose
- colchicine

