

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

Ecole Doctorale de Biologie/Santé

Numéro d'ordre : 2930

THESE

**Présentée à l'université de Lille I
Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ**

Discipline : Neurosciences

Par

Sébastien Bouret



**REGULATION DE L'ACTIVITE DES NEURONES A
PROOPIOMELANOCORTINE DU NOYAU ARQUE DU RAT : ACTION
DE LA GALANINE ET DU TGF β .
RELATIONS AVEC LE SYSTEME A GONADOLIBERINE**

Soutenue le 12 mars 2001, devant le Jury composé de :

Rapporteurs :	Monsieur le Docteur Jacques Epelbaum
	Monsieur le Docteur Hubert Vaudry
Examineurs :	Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain
	Madame le Professeur Stéfania Maccari
	Monsieur le Docteur Yves Tillet
Directeur de thèse :	Madame le Docteur Valérie Mitchell

A mes Parents,

sans l'aide de qui rien n'aurait été possible.

J'exprime tous mes remerciements à :

Monsieur le Docteur Jacques Epelbaum qui, malgré ses nombreuses responsabilités, m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Ses compétences en neuroendocrinologie sont telles que je suis particulièrement honoré de le compter parmi mes juges.

Monsieur le Docteur Hubert Vaudry qui a accepté d'être rapporteur de ce travail et ainsi de le juger en profondeur. Je rends également hommage à ses qualités scientifiques et à son esprit critique que j'ai pu apprécier lors de nos divers articles et congrès.

Monsieur le Docteur Yves Tillet pour sa présence en tant qu'examineur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Madame le Professeur Stéfania Maccari pour avoir accepté de présider ce jury.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain qui m'a accueilli voilà déjà quatre ans dans son laboratoire. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et rends hommage à ses grandes qualités scientifiques et humaines.

Madame le Docteur Valérie Mitchell pour avoir encadré mes travaux de DEA et de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour la confiance et la patience qu'elle a eu à mon égard. Ses commentaires durant l'évolution de ce travail ainsi que sa grande disponibilité m'ont été très précieux. Qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier vivement :

Madame le Docteur Dominique Croix pour ses compétences dont elle m'a fait bénéficier dans les dosages radioimmunologiques. J'aimerais également lui exprimer toute ma reconnaissance de son amitié.

Monsieur le Docteur Vincent Prevot qui m'a transmis, au fil de ces années, son virus pour la recherche. Il n'a ménagé ni son temps ni son aide à mon égard. Je le remercie également pour sa profonde amitié.

I also would like to thank :

Doctor George Stefano. It was a real honor to work with you.

Je remercie également :

Madame le Docteur Valérie Buée pour m'avoir permis, à travers les trois années de monitorat, d'enseigner en premier cycle universitaire.

Madame le Docteur Myriam Mariot pour son aide précieuse dans les techniques de biologie moléculaire, sa disponibilité et les nombreuses conversations scientifiques riches en enseignements que nous avons partagées.

Madame Anne Loyens, qui durant ces derniers mois, m'a été d'une aide très précieuse.

Madame Geneviève Mortreux pour ses compétences techniques en dosages radioimmunologiques et pour sa gentillesse.

Monsieur Marc Baroncini pour m'avoir initié à la neuroanatomie humaine et pour son amitié.

Madame Danièle Leroy pour les précieux conseils en immunohistochimie dont elle m'a fait bénéficier.

Mesdames Chistine Kubisiak et Joëlle Vermeeren pour l'aide qu'elles m'ont apportée dans la préparation des tampons d'hybridation *in situ*.

Ce travail a été réalisé à l'Unité 422 INSERM, laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, et a donné lieu aux publications et communications suivantes :

LISTE DES PUBLICATIONS

- articles soumis -

Bouret S, Tran-Van-Chuoi-Mariot M, Prevot V, Croix D, Takumi, T, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V, Evidence that TGF β may directly modulate the proopiomelanocortin neuronal activity of the female rat arcuate nucleus. (*Endocrinology*)

Bouret S, Croix D, Tran-Van-Chuoi-Mariot M, Prevot V, Loyens A, Tramu G, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V, Modulation of proopiomelanocortin neuronal activity by galanin in the rat mediobasal hypothalamus. (*Endocrinology*)

- 2001 -

Mitchell V, **Bouret S**, Epelbaum J, Beauvillain J.C. (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in microcebus murinus (Primate, Lemurian) and rat forebrain and pituitary. *Journal of Comparative Neurology*, 429(3):469-489

- 2000 -

Bouret S, Prevot V, Croix D, Viltart O, Mitchell V, Beauvillain J.C. (2000) μ opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase-immunopositive preoptic area neurons. *Molecular Brain Research*, 80(1) :46-52

Bouret S, Prevot V, Croix D, Howard A, Habert-Ortoli E, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V (2000) Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus: effect of testosterone. *Endocrinology*, 141(5):1780-1794

Prevot V, **Bouret S**, Croix D, Jennes L, Mitchell V, G. Alonzo G, Routtenberg A, Beauvillain J.C. (2000), Growth-associated protein-43 messenger ribonucleic acid expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 141(5):1648-1657

Prevot V, **Bouret S**, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain J.C. (2000) Evidence that members of the TGF β superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF β and activin in GnRH neurons and hypothalamic areas of the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(7):665-670

Prevot V, **Bouret S**, Stefano G.B., Beauvillain J.C. (2000), Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Research Reviews*, 34(1-2):27-41

Goumon Y, **Bouret S**, Casares F, Zhua W, Beauvillain J.C., Stefano G.B., Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neuroscience Letters*, 293(2) : 135-138

- 1999 -

Bouret S, Prevot V, Croix D, Jégou S, Vaudry H, Stefano G.B., Beauvillain J.C., Mitchell V. (1999) μ opioid receptor mRNA expression in proopiomelanocortin-mRNA expressing rat arcuate nucleus neurons. *Molecular Brain Research*, 70 (1) : 155-158

Mitchell V, **Bouret S**, Prevot V, Jennes L, Beauvillain J.C. (1999) Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurons of the rostral preoptic area. *Journal of Neuroendocrinology*, 11 :805-812

Mitchell V, **Bouret S**, Howard A.D., Beauvillain J.C. (1999) Expression of the galanin receptor subtype Gal-R2 mRNA in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16 :265-277

Prevot V, Croix D, **Bouret S**, Dutoit S, Tramu G, Stefano G.B., Beauvillain J.C. (1999) Definitive evidence for the existence of plasticity in the external zone of the median eminence during the estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in the GnRH release. *Neuroscience*, 94(3): 809-819

- 1998 -

Faure-Virelizier C, Croix D, **Bouret S**, Prévot V, Beauvillain J.C., Mitchell V. (1998) Effect of estrous cyclicity on the expression of the Gal-R1 galanin receptor in the rat preoptic area : a comparison with the male. *Endocrinology*, 139 (10) : 4127-4139

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

- 2000 -

Bouret S, Croix D, Mariot M, Mortreux G, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C. , Mitchell V, Régulation du système à proopiomélanocortine du noyau arqué par la galanine, 29^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Poitiers, France, Septembre 2000

- 1999 -

Bouret S, Proopiomelanocortin neurons and the GnRH neuroendocrine axis. Conférence sur invitation, Oregon Regional Primate Research Center (ORPRC), Beaverton, Oregon, USA (*en anglais*), Décembre 1999

- 1998 -

Bouret S, Croix D, Howard A.D., Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V, Evidence d'une interaction morpho-fonctionnelle entre le système galaninergique

et les neurones à proopiomélanocortine du noyau arqué : possible implication dans la régulation de la gonadolibérine. 2^{ème} journée scientifique du Réseau LARC-Neurosciences, Caen, France, Octobre 1998

LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 2000 -

Bouret S, Prevot V, Croix D, Mitchell V, Beauvillain J.C., Transforming growth factor β_1 affects GnRH mRNA expression in the male rat preoptic area. 30th Annual Meeting Society For Neuroscience, New Orleans, Louisiane, USA, Novembre 2000

Bouret S, Prevot V, Croix D, Beauvillain J.C., Mitchell V, Modulation de l'activité des neurones à GnRH par le TGF β_1 chez le rat mâle. 4^{ème} journée scientifique du Réseau LARC-Neurosciences, Lille, France, Octobre 2000

Mitchell V, **Bouret S**, Beauvillain J.C. et Schilling A, Perret M, et Kordon C, Epelbaum J, Expression différentielle des ARN messagers codant le récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHS-R) dans l'hypothalamus et régions voisines du microcèbe (*Microcebus murinus*); comparaison avec le rat. 29^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Poitiers, France, Septembre 2000

Lecompte F, Feyereisen K, **Bouret S**, Beauvillain J.C., Mitchell V, Mise en évidence d'une action directe des stéroïdes gonadiques sur les cellules exprimant les récepteurs à galanine Gal-R1 dans l'aire préoptique ; étude des coexpressions Gal-R1 et récepteur aux estrogènes selon l'imprégnation stéroïdienne. 29^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Poitiers, France, Septembre 2000

Bouret S, Croix D, Mariot M, Jégou S, Vaudry, Beauvillain J.C., Mitchell M Effect of galanin on the activity of the proopiomelanocortin (POMC) system of the rat mediobasal hypothalamus. Federation of European Neuroscience Society, Brighton, Angleterre, Juin 2000. *Abstract publié dans European Journal of Neuroscience, vol 12, supplément 11 (2000)*

- 1999 -

Bouret S, Prevot V, Croix D, Takumi T, Jennes L, Jégou S, Vaudry H, Mitchell V, Beauvillain J.C. Evidence that members of the TGF β superfamily might play a key role in the regulation of the type I serine-threonine kinase receptor for TGF β and activin in the diencephalon, GnRH- and POMC-neurons. 29th Annual Meeting Society For Neuroscience, Miami, USA, Octobre 1999

Bouret S, Prévot V, Croix D, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V, Implication des membres de la superfamille des TGF-beta dans la régulation de l'axe gonadotrope : expression du récepteur de type I au TGF-beta et à l'activine dans l'hypothalamus, les neurones à GnRH et à proopiomélanocortine (POMC). 3^{ème} journée scientifique du Réseau LARC-Neurosciences, Amiens, France, Octobre 1999

Bouret S, Prévot V, Croix D, Takumi T, Jégou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V, Expression du récepteur de type I pour le TGF-bêta et l'activine par les neurones à

proopiomélanocortine du noyau arqué. 4^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, France, Mai 1999

Beauvillain J.C., **Bouret S**, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Prévot V. Implication de la superfamille des TGF-bêta dans la régulation du système à GnRH : expression du récepteur sérine-thréonine kinase de type I au TGF-bêta et à l'activine dans les neurones à GnRH et les aires hypothalamiques associées. 4^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, France, Mai 1999

- 1998 -

Bouret S, Prévot V, Howard A.D., Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain J.C., Mitchell V. Differential coexpression of galanin receptor (GalR1, GalR2) and proopiomelanocortine (POMC) mRNAs in the rat arcuate nucleus. 28th Annual Meeting Society For Neuroscience, Los Angeles, USA, Novembre 1998

Bouret S, Prévot V, Howard A.D., Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Vermersh P, Beauvillain J.C., Mitchell V. Les neurones à proopiomélanocortine du noyau arqué sont régulés directement par la galanine via les récepteurs de la galanine GalR-1 et Gal-R2. 27^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, France, Septembre 1998. Prix du poster du 'British Neuroendocrine Group'

Mitchell V, **Bouret S**, Jennes L, Beauvillain J.C.. La galanine agit-elle directement sur les neurones à gonadolibérine via les récepteurs de la galanine Gal-R1. 27^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, France, Septembre 1998

Virelizier C, Croix D, **Bouret S**, Prévot V, Deffossez A, Beauvillain J.C., Mitchell V. Les variations de l'expression du récepteur de la galanine Gal-R1 au cours du cycle œstral dans l'aire préoptique du rat. 27^{ème} congrès de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, France, Septembre 1998

SOMMAIRE

Introduction

Avant Propos

1

I. Le noyau arqué et la fonction de reproduction

3

I.1. Influence des stéroïdes gonadiques sur le noyau arqué

3

- a- Rappels sur la modulation de la sécrétion de GnRH par les stéroïdes gonadiques 3
- b- Œstrogènes, Progestérone 4
- c- Androgènes 6
- d- Plasticité synaptique stéroïdo-dépendante 6

I.2. Facteurs non-stéroïdiens impliqués dans la régulation du système à GnRH et agissant au sein du noyau arqué

7

I.2.1. Neuropeptides

8

- a- Peptides opioïdes 8
 - *β-endorphine* 9
 - *Enképhaline et Dynorphine* 10
 - *Mode d'action des peptides opioïdes sur les neurones à GnRH* 10
- b- α -MSH et AGRP 11
- c- Famille de la galanine 13
 - *Galanine* 13
 - *GALP* 16
- d- NPY 17
- e- GnRH 19
- f- Substance P 20
- g- Neurotensine 21

I.2.2. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs

22

- a- GABA 22
- b- Glutamate et Aspartate 23
- c- NO 25
- d- Dopamine 26

I.2.3. Facteurs gliaux

27

- a- TGF α 28
- b- Superfamille du TGF β 28
- c- bFGF 30
- d- Interleukines 31

I.2.4. Leptine

32

I.3. Conclusion

33

II.	Etat des connaissances sur le système à POMC	35
II.1.	Anatomie et caractéristiques fonctionnelles du système à POMC	35
	a- Anatomie	35
	b- Hétérogénéité des neurones à POMC	37
	c- L'activité des neurones à POMC est circadienne et cyclique	37
II.2.	Régulation du système à POMC	38
II.2.1.	Modulation par les stéroïdes gonadiques	39
	a- Œstrogènes, Progestérone	39
	b- Androgènes	40
II.2.2.	Facteurs non-stéroïdiens impliqués dans la régulation du système à POMC	40
	a- Peptides dérivés de la POMC	40
	b- Galanine	42
	c- NPY	42
	d- Glutamate et Aspartate	43
	e- GABA	43
	f- Dopamine	44
	g- Substance P	45
	h- Leptine	45
	i- Interleukines	45
II.3.	Conclusion	46
III.	Conclusion générale et objectifs	46

Résultats

I.	Etude des interactions entre la galanine et les neurones à POMC	48
I.1.	Expression des ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2 par les neurones à POMC : effet de la testostérone <i>Article 1.</i>	48
I.2.	Modulation de l'activité des neurones à POMC par la galanine dans l'hypothalamus médiobasal <i>Article 2.</i>	67
II.	Auto-régulation des neurones à POMC par la β-endorphine <i>Article 3.</i>	98

III. Implication des cellules gliales, via le TGFβ, dans la régulation de l'activité des neurones à POMC	104
<i>Article 4.</i>	

IV. Le NO : médiateur de choix dans la transmission des effets de la β-endorphine sur les neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique ?	135
<i>Article 5.</i>	

Discussion

I. Interrelations galanine/POMC	145
a) Arguments en faveur d'une action directe de la galanine sur le système à POMC	145
b) Action de la galanine sur le système à POMC	147
c) Implication de l'interrelation galanine/POMC dans la régulation du système à GnRH	149
II. Interrelations TGFβ/POMC	152
a) Arguments en faveur d'une action directe du TGF β sur le système à POMC	152
b) Action du TGF β_1 sur le système à POMC	154
c) Implication de l'interrelation TGF β /POMC dans la régulation du système à GnRH	154
III. Les neurones produisant le NO intermédiaires de l'action de la β-endorphine sur les neurones à GnRH ?	156

Conclusion et perspectives	159
-----------------------------------	-----

Références bibliographiques	162
------------------------------------	-----

Liste des abréviations utilisées

AGRP : *Agouti related peptide*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

bFGF : *basic fibroblaste growth factor*

E2 : 17 β -œstradiol

eNOS : synthétase du monoxyde d'azote d'origine endothéliale

ER- α : récepteur aux œstrogènes α

ER- β : récepteur aux œstrogènes β

FSH : Hormone folliculostimulante

GABA : Acide γ amino butyrique

GALP : *Galanine like peptide*

GHRH : *Growth hormone releasing hormone*

GnRH : Gonadolibérine

IL : interleukine

LH : Hormone lutéinisante

LPH : Lipotropine

MAP : *Mitogen activated protein*

MBH : Hypothalamus médiobasal

MSG : monosodium glutamate

MSH : *Melanocyte stimulating hormone*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nNOS : synthétase du monoxyde d'azote d'origine neuronale

NO : monoxyde d'azote

NPY : neuropeptide tyrosine

OVX : ovariectomisée

P : progestérone

POMC : Proopiomélanocortine

PR : Récepteur à la progestérone

RT-PCR : *Reverse transcription-polymerase chain reaction*

Smad : *Small 'mother against dpp'*

TGF : *Transforming growth factor*

INTRODUCTION

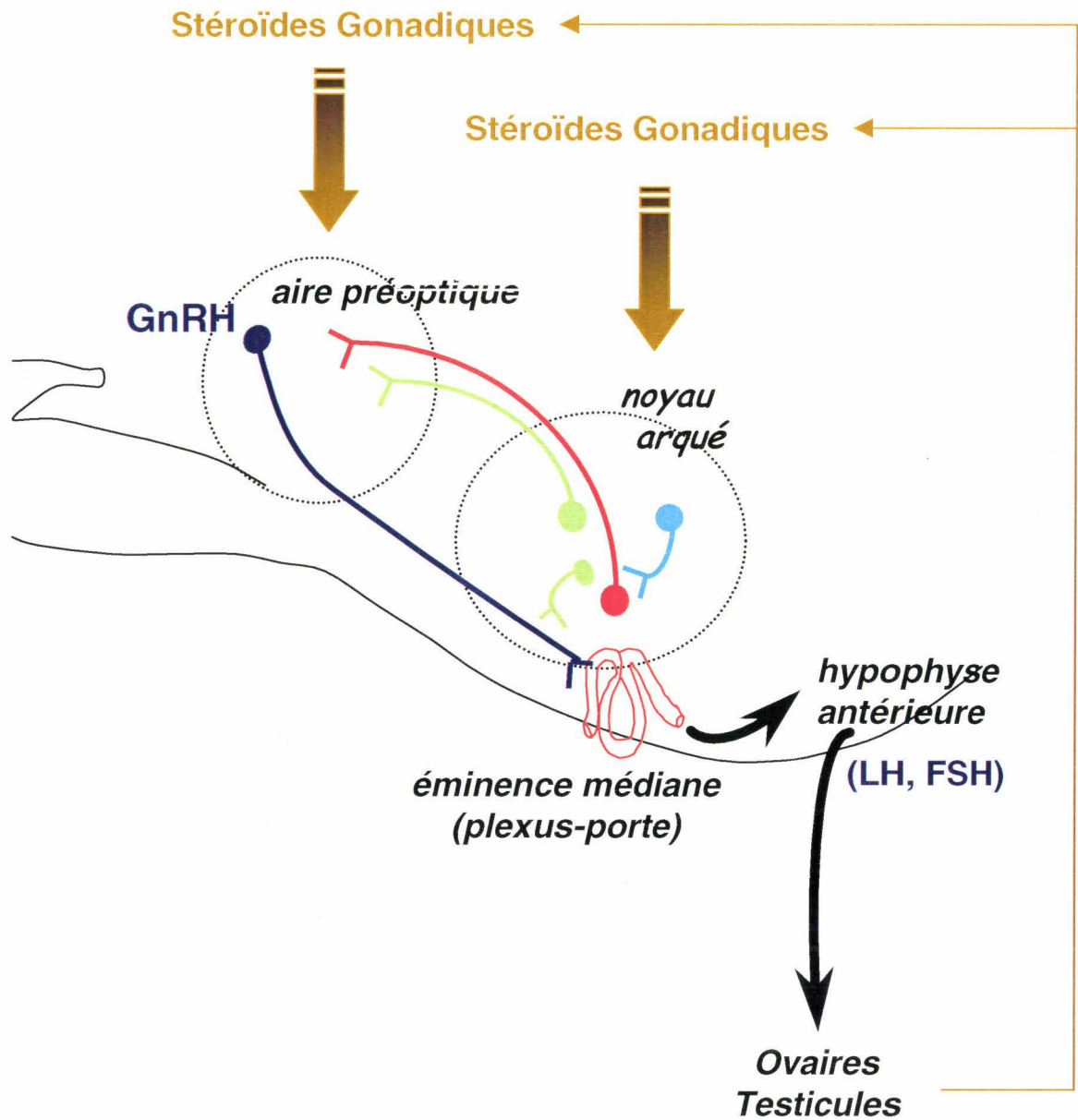


Figure 1. Relations anatomiques entre le noyau arqué et les régions hypothalamiques (aire préoptique et éminence médiane) impliquées dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Avant Propos

Notre équipe de recherche s'intéresse aux interrelations hypothalamiques contribuant à la régulation de l'activité des neurones à gonadolibérine. La gonadolibérine –également nommée GnRH ou LHRH- est le principal messenger hormonal hypothalamique qui régule la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires (hormone lutéinisante ou LH et hormone folliculostimulante ou FSH) et ainsi la fonction gonadique (Figure 1). Chez le rat femelle, le pic préovulatoire de LH est précédé par une sécrétion massive de GnRH dans le sang porte hypophysaire l'après-midi du proœstrus. Il apparaît notamment que la survenue du pic préovulatoire de GnRH est induite par l'accroissement des taux d'œstradiol plasmatique entre le soir du diœstrus et l'après-midi du proœstrus. La régulation de l'activité des neurones à GnRH est complexe et multifactorielle : elle fait intervenir des facteurs d'origine humorale (hormones périphériques et gonadiques), neuronale, gliale et endothéliale. Ces facteurs peuvent agir de façon monosynaptique, c'est à dire exercer leur action directement sur le neurone à GnRH, ou de façon polysynaptique, c'est à dire exercer leur action par l'intermédiaire de neurones relais (qui peuvent être multiples). En outre, ces facteurs peuvent réguler la sécrétion de GnRH à deux niveaux : au niveau des péricaryons à GnRH, localisés chez le rat dans l'aire préoptique ou au niveau des terminaisons nerveuses à GnRH, situées au niveau de l'éminence médiane. L'aire préoptique et l'éminence médiane reçoivent des influx venant de nombreuses régions cérébrales. Le noyau arqué est une région émettant de nombreuses efférences vers l'aire préoptique et l'éminence médiane et constitue ainsi l'une des régions hypothalamiques les plus impliquées dans la régulation du système à GnRH (Figure 1).

Le noyau arqué est situé à la base de l'hypothalamus en apposition étroite avec l'éminence médiane, site de projection de différents systèmes hypophysiotropes. Il entoure la

partie ventrale du troisième ventricule (Krieg, 1932) et s'étend, chez le rat, sur 2,5 mm avec un volume estimé à 0,9 mm³ chez le mâle et 0,7 mm³ chez la femelle (Leal *et al.*, 1998). Les cellules constituant ce noyau sont petites et fusiformes ou larges et polygonales dans sa position latérale. Une imprégnation au Golgi montre des cellules bipolaires ou unipolaires ainsi que quelques cellules multipolaires avec de nombreuses arborisations dendritiques (Van den Pol et Cassidy, 1982). Le nombre total de neurones constituant ce noyau est estimé à 100.10³ chez le mâle et 86.10³ chez la femelle (Leal *et al.*, 1998). Ce noyau est considéré de par ses afférences et efférences comme une région-clef dans l'intégration et la transmission des fonctions émotionnelles, végétatives, homéostatiques, autonomiques mais aussi endocrines. De nombreux travaux ont impliqué le noyau arqué dans la fonction gonadotrope. Il a ainsi été établi depuis longtemps que des lésions du noyau arqué entraînent une atrophie de l'adénohypophyse et des gonades (Ganong, 1963 ; Szentagothai *et al.*, 1972). De plus, la déafférentation complète de l'hypothalamus médiobasal (incluant le noyau arqué) provoque une réduction significative des concentrations plasmatiques de LH, FSH et testostérone chez le rat mâle intact (Blake *et al.*, 1973a, 1973b ; Turner et Simpkins, 1977). Des résultats similaires ont été observés après lésion électrolytique du noyau arqué (Bogdanove, 1964). De façon intéressante, les animaux traités néonatalement au glutamate monosodique (MSG), neurotoxine qui détruit sélectivement le noyau arqué (Badger *et al.*, 1982), présentent des fonctions de reproduction anormales avec notamment un retard de puberté chez les femelles, une ovulation souvent absente à l'heure de l'ouverture vaginale, et des cycles œstriens prolongés (Redding *et al.*, 1971 ; Clemens *et al.*, 1978 ; Nemeroff *et al.*, 1981 ; DePaolo et Negor-Vilar, 1982 ; Johnston *et al.*, 1984). Malgré ces nombreux troubles de la reproduction, certains auteurs ont rapporté une fertilité normale chez les femelles traitées au MSG (Trentini *et al.*, 1974 ; Bakke *et al.*, 1978). Par ailleurs, le noyau arqué influencerait la sécrétion spontanée de GnRH au niveau de l'éminence médiane. En effet, Lopez *et al.* (1992a) ont

montré que les taux de GnRH libérés spontanément par des fragments d'éminences médianes incubées *in vitro* étaient diminués en présence de noyau arqué. De même, la libération de GnRH par une stimulation potassique est augmentée chez les animaux traités au MSG (DePaolo et Negro-Vilar, 1982).

L'ensemble de ces observations suggère que le noyau arqué participe activement à la régulation de la fonction gonadotrope. Ainsi, dans notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés à un système neuronal propre au noyau arqué : les neurones à proopiomélanocortine (POMC). Nous nous sommes plus précisément focalisés sur deux facteurs susceptibles de moduler l'activité des neurones à POMC : le premier de nature neuronale, la galanine, et le second de nature gliale, le TGF β .

En introduction de nos travaux, nous exposerons dans un premier temps les facteurs exprimés dans le noyau arqué et impliqués dans la régulation du système à GnRH. Puis, dans un deuxième temps, nous ferons l'état des connaissances de la physiologie des neurones à POMC.

I. Le noyau arqué et la fonction de reproduction

I.1. Influence des stéroïdes gonadiques sur le noyau arqué

a- Rappels sur la modulation de la sécrétion de GnRH par les stéroïdes gonadiques

Chez la femelle, les œstrogènes semblent être l'un des déterminants majeurs pour le fonctionnement du système à GnRH. Pendant la plus grande partie du cycle œstrien, les œstrogènes jouent le rôle de frein pour la sécrétion de GnRH, à travers ce qui a été appelé la 'rétroaction négative' (Sarkar et Fink, 1980 ; Caraty *et al.*, 1989 ; Chongthammakun et Terasawa, 1993 ; Evans *et al.*, 1997). Les œstrogènes exercent aussi une 'rétroaction positive' sur le système à GnRH afin de générer le pic préovulatoire de LH. Il semble qu'une exposition prolongée à de forts taux d'œstrogènes (environ 15 h) soit indispensable pour la

mise en place des systèmes neuronaux responsables de la genèse du pic préovulatoire de GnRH (Sarkar et Fink, 1980 ; Moenter *et al.*, 1990 ; Xia *et al.*, 1992 ; Evans *et al.*, 1997). De même, chez la rate, la progestérone est indispensable pour la survenue de ce pic préovulatoire de GnRH/LH (pour revue, voir Kalra, 1993). En revanche à plus long terme, la progestérone exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH qui met alors fin à la sécrétion massive de GnRH/LH en début de l'œstrus (pour revue, voir Kalra, 1993).

Chez le mâle, la testostérone est le principal stéroïde gonadique responsable de la rétroaction exercée par les gonades sur le cerveau. La testostérone régule négativement la sécrétion de GnRH afin de maintenir un mode de sécrétion basal de LH nécessaire à une fonction testiculaire optimale (voir Kalra et Kalra, 1989).

L'existence d'une communication entre les gonades et le noyau arqué a été suggérée dès 1971 par Brawer en montrant la présence de changements cytologiques au sein du noyau arqué suite à l'ablation des gonades. La découverte dans les années 1980 que les neurones à GnRH n'exprimaient ni le récepteur aux œstrogènes ni le récepteur aux androgènes (Shivers *et al.*, 1983 ; Herbison et Theodosis, 1992 ; Huang et Harlan, 1993 ; Laflamme *et al.*, 1998) – notion qui, pour le récepteur aux œstrogènes, a très récemment été remise en question (Butler *et al.*, 1999 ; Skynner *et al.*, 1999 ; Hrabovszky *et al.*, 2000)- a conduit de nombreuses équipes à étudier l'influence des stéroïdes gonadiques sur l'activité des neurones à GnRH via des intermédiaires localisés dans des régions cibles des stéroïdes gonadiques et impliquées dans la régulation du système à GnRH telles que le noyau arqué.

b- Œstrogènes, Progestérone

Le noyau arqué est considéré comme le principal site sur lequel agissent les œstrogènes pour exercer le rétrocontrôle négatif des gonades sur la sécrétion de GnRH (Herbison, 1998). Des études réalisées chez le rat (Smith et Davison, 1974 ; Blake, 1977), la

brebis (Caraty *et al.*, 1998) et le singe (Ferin *et al.*, 1974) ont montré que les œstrogènes avaient un effet inhibiteur sur la sécrétion de LH par leur action au niveau de l'hypothalamus médiobasal. Plus précisément, l'implantation d'œstrogènes dans le noyau arqué provoque une diminution de l'amplitude des pulses de LH chez des rats femelles ovariectomisées (Akema *et al.*, 1984 ; Nagatani *et al.*, 1994). L'action de la *progestérone* au niveau du noyau arqué dépend de l'état stéroïdien de l'animal: chez le rat mâle ou femelle, l'implantation de progestérone au niveau de l'hypothalamus médiobasal provoque une diminution de la sécrétion basale de LH (Smith et Davison, 1974). En revanche, chez des femelles ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes, l'exposition de progestérone sur des fragments d'hypothalamus médiobasaux induit une augmentation de la sécrétion de GnRH (Kim et Ramirez, 1985).

Pour agir sur leur cellule cible, les stéroïdes gonadiques doivent se fixer sur des récepteurs spécifiques, généralement nucléaires, qui se lient alors à un élément de réponse aux stéroïdes localisé sur le gène cible. Deux sous-types de récepteurs aux œstrogènes nommés ER- α et ER- β sont exprimés dans le noyau arqué avec une expression prédominante de l'ER- α (Shughrue *et al.*, 1992 ; Shughrue *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1997 ; Shughrue *et al.*, 1997 ; Laflamme *et al.*, 1998). Les cellules exprimant l'ER- α sont observées à travers toute l'étendue antéro-postérieure du noyau avec une distribution préférentielle dans la subdivision latérale du noyau. Simonian *et al.* (1999), ont récemment observé que près de 20% des neurones exprimant l'ER- α dans le noyau arqué se projetaient vers l'aire préoptique rostrale. Or c'est au niveau de l'aire préoptique rostrale que sont concentrés les neurones à GnRH activés par les stéroïdes gonadiques et permettant la survenue du pic préovulatoire de LH (Lee *et al.*, 1990 ; Hoffman *et al.*, 1990 ; Porkka-Heiskanen *et al.*, 1994 ; Petersen *et al.*, 1995). Fait notable, les niveaux d'expression de l'ARNm codant les récepteurs aux œstrogènes dans

le noyau arqué varient au cours du cycle œstrien avec un pic d'expression le jour du proœstrus (Shughrue *et al.*, 1992). Par ailleurs, de nombreuses cellules expriment l'ARNm codant le récepteur à la progestérone (PR) dans le noyau arqué principalement dans sa partie ventrolatérale (Hagihara *et al.*, 1992) et une étude réalisée chez le Cobaye rapporte que toutes les cellules exprimant le récepteur à la progestérone expriment également les récepteurs aux œstrogènes dans ce noyau (Warembourg *et al.*, 1989).

c- Androgènes

Le noyau arqué est la région hypothalamique au niveau de laquelle l'implantation de testostérone est la plus efficace pour empêcher la diminution des taux de LH plasmatiques observées chez le rat mâle castré (Danguy *et al.*, 1977 ; Kalra et Kalra, 1980). Un intense marquage pour l'ARNm codant le récepteur aux androgènes y est par ailleurs observé (Simerly *et al.*, 1990). A noter que la testostérone, en plus de sa fixation directe sur les récepteurs aux androgènes est capable de s'aromatiser en œstradiol et ainsi se fixer spécifiquement aux récepteurs aux œstrogènes (Roselli *et al.*, 1985 ; Chowen *et al.*, 1990). Cette aromatisation de la testostérone en œstradiol peut survenir *in situ*, c'est à dire au sein même du noyau arqué, puisqu'une activité aromatase a été rapportée dans ce noyau (Roselli *et al.*, 1985, Roselli et Resko, 1987).

d- Plasticité synaptique stéroïdo-dépendante

Il est maintenant communément admis que les stéroïdes gonadiques peuvent affecter le nombre de connections synaptiques dans diverses régions du système nerveux central (Arnold et Gorski, 1984 ; Garcia-Segura *et al.*, 1986 ; Frankfurt *et al.*, 1990). Le noyau arqué fait partie des noyaux hypothalamiques au niveau desquels des changements synaptiques sont observés en fonction de l'état stéroïdien de l'animal. Ainsi l'équipe de Garcia-Segura s'est

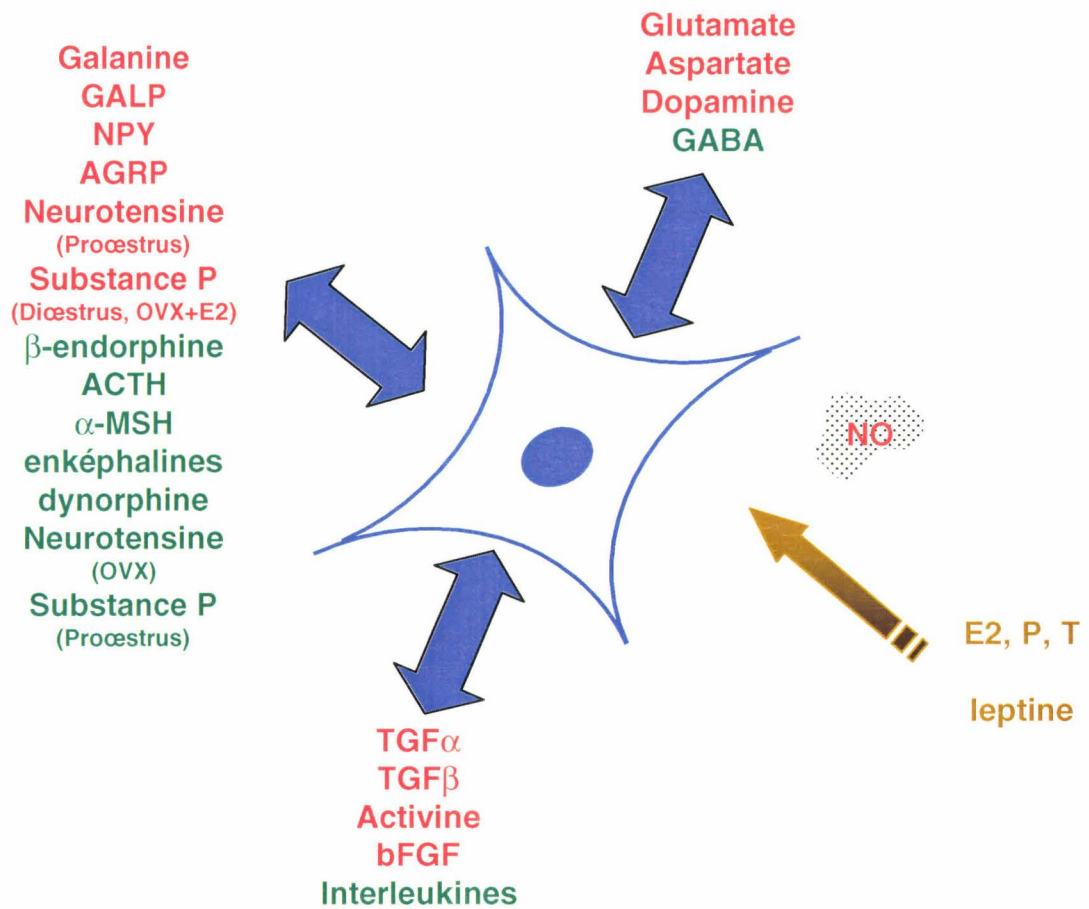


Figure 2. Principaux neuropeptides, neurotransmetteurs, facteurs gliaux et hormones périphériques agissant au niveau du noyau arqué et impliqués dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. Les facteurs indiqués en rouges sont stimulateurs, et ceux indiqués en vert sont inhibiteurs sur le système à GnRH.

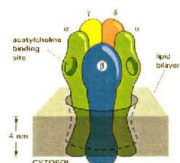
largement intéressée à ce phénomène et a rapporté une nette réduction du nombre de synapses axo-somatiques (de 30 à 50%) dans le noyau arqué le jour du proœstrus, suivie d'une réinervation des neurones du noyau arqué dès l'œstrus (Olmos *et al.*, 1989). Plus précisément, il apparaît que l'augmentation des niveaux d'œstrogènes plasmatiques entre le soir du diœstrus II et le jour du proœstrus soit associée à un recouvrement de processus astrocytaires au niveau des péricaryons et terminaisons nerveuses du noyau arqué (Garcia-Segura *et al.*, 1986 ; Olmos *et al.*, 1989 ; Naftolin *et al.*, 1993 ; Garcia-Segura *et al.*, 1994 ; Chowen *et al.*, 1995 ; Parducz *et al.*, 1996). La même équipe a également caractérisé la nature chimique des synapses impliquées dans cette plasticité et a démontré que le nombre de synapses GABAergiques était préférentiellement affecté suite à un traitement œstrogénique de femelles ovariectomisées (Parducz *et al.*, 1993).

Le noyau arqué apparaît ainsi comme l'une des régions-cibles privilégiées du rétrocontrôle stéroïdien. De plus, ces données bibliographiques suggèrent que le pic préovulatoire de GnRH pourrait être induit, en partie, par un retrait stéroïdo-dépendant des synapses inhibitrices dans le noyau arqué. Le phénotype des cellules cibles des stéroïdes gonadiques est multiple et sera détaillé dans un chapitre ultérieur (cf section I.2).

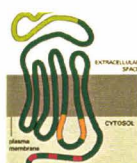
I.2. Facteurs non-stéroïdiens impliqués dans la régulation du système à GnRH et agissant au sein du noyau arqué

De nombreux facteurs impliqués dans la modulation de l'activité des neurones à GnRH ont leur péricaryon localisé au niveau du noyau arqué ; ce chapitre a pour but de les détailler et d'en étudier l'implication sur la régulation du système à GnRH. Les figures 2 et 3

Récepteur couplé à un canal



Récepteur à 7 domaines transmembranaires



Récepteur Ser-Thr Kinase



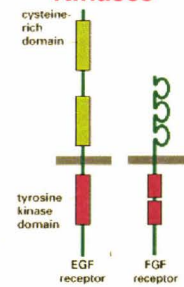
Récepteur nucléaire



Récepteur associé aux Tyr Kinases



Récepteur Tyr Kinases



GABA
GABA_A

Glutamate
NMDA-R1
AMPA
GluR1
GluR2/R3
Kainate
GluR5
GluR6

Galanine
GalR1
GalR2
GalR3?

NPY
Y1-R
Y2-R
Y4-R
Y5-R

Neurotensine
NT-R

α-MSH
MC3-R

Opioides
μ
δ
κ

Dopamine
D1-R
D2-R

GnRH
GnRH-R

GABA
GABA_B

Glutamate
mGluR1-8

TGFβ & Activine
B1

Activine
Act-RII

Œstrogènes
ER-α
ER-β

Progestérone
PR

Androgènes
AR

Interleukines
IL1-R1
IL2-R

Leptine
Ob-R

EGF et TGFα
EGF-R

bFGF
FGF-R

Figure 3. Principaux récepteurs exprimés dans le noyau arqué dont les ligands sont impliqués dans la régulation du système à GnRH.

résumant, respectivement, ces facteurs et leurs récepteurs associés exprimés au sein du noyau arqué.

I.2.1. Neuropeptides

a- Peptides opioïdes

Parmi les signaux neuropeptidergiques inhibiteurs, le rôle des peptides opioïdes sur la régulation de l'activité des neurones à GnRH a été extensivement documenté. Trois peptides opioïdes endogènes sont exprimés dans le noyau arqué : la β -endorphine, la dynorphine et les enképhalines (methionine- et leucine-enképhaline). Ces peptides dérivent de trois précurseurs distincts nommés, respectivement, la proopiomélanocortine (POMC), la prodynorphine et la proenképhaline.

La localisation des péricaryons à β -endorphine est restreinte à deux régions cérébrales : le noyau arqué et la région caudale du tractus solitaire (Finley *et al.*, 1981a ; Bronstein *et al.*, 1992). Il apparaît néanmoins que seuls les neurones à β -endorphine du noyau arqué jouent un rôle majeur dans le contrôle de la sécrétion de GnRH (Bloom *et al.*, 1978). Contrairement aux neurones à β -endorphine, les corps cellulaires des neurones enképhalinergiques et dynorphinergiques ont une distribution plus éparse dans le cerveau (Simerly *et al.*, 1986, 1988 ; Simerly et Swanson, 1987). Le noyau arqué comprend une dense population de neurones dynorphinergiques distribués à la fois dans la partie ventrale et dorsale du noyau (Fallon et Leslie, 1986). En revanche, peu de neurones synthétisant l'enképhaline sont retrouvés dans le noyau arqué (Wamsley *et al.*, 1980 ; Finley *et al.*, 1981b ; Fallon et Leslie, 1986).

▪ *β-endorphine*

L'implication de la β -endorphine, et de son récepteur μ , dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH est largement documentée. Dès 1955, Barraclough et Sawyer montrent que l'injection sous-cutanée de morphine –qui s'est révélée, par la suite, être un agoniste du récepteur aux opioïdes μ - provoque un blocage de l'ovulation chez le rat femelle et qu'elle exerce ses effets au niveau central. Des études se sont ensuite intéressées à l'injection intracérébroventriculaire d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur μ et ont révélé que la β -endorphine inhibait la sécrétion de LH (Kalra, 1981 ; Kubo *et al.*, 1983). Il est notamment établi que les neurones à β -endorphine exercent un tonus inhibiteur continu sur le système à GnRH (Herbison, 1998), leur permettant de contrôler la pulsativité de la sécrétion de GnRH, et qu'une réduction de l'activité des neurones à β -endorphine sur le système à GnRH serait responsable, en partie, de la survenue du pic de GnRH/LH (Allen et Kalra, 1986 ; Gabriel *et al.*, 1986). Ainsi, la naloxone, antagoniste du récepteur μ , stimule la sécrétion de LH à tous les stades du cycle œstrien excepté un bref moment situé l'après-midi du proœstrus (Ieiri *et al.*, 1980 ; Allen et Kalra, 1986). Des résultats similaires ont été observés chez des animaux ovariectomisés et substitués en œstradiol et progestérone (Gabriel *et al.*, 1986). De la même façon, la morphine n'altère pas la sécrétion de LH si elle est administrée peu avant la survenue du pic de LH (Berglund et Simpkins, 1988). Cette réduction de l'action du système β -endorphinergique peu avant la survenue du pic de GnRH concerne également l'activité du récepteur μ : en effet, il a été rapporté une diminution de la fixation de la naloxone sur le récepteur μ dans l'hypothalamus l'après-midi du proœstrus (Jacobson et Kalra, 1989 ; Weiland et Wise, 1990 ; Mateo *et al.*, 1992). Ainsi, les neurones à β -endorphine seraient l'un des médiateurs de la rétroaction positive des œstrogènes sur la sécrétion de GnRH.

De nombreuses études suggèrent que la β -endorphine pourrait affecter l'activité des neurones à GnRH à deux niveaux : au niveau de l'aire préoptique (aire de localisation des corps cellulaires à GnRH) et au niveau de l'éminence médiane (aire de localisation des terminaisons nerveuses à GnRH). Tout d'abord, Kalra (1981) rapporte que la naloxone module la sécrétion de LH uniquement si l'antagoniste est injecté dans l'aire préoptique médiale ou la région incluant l'éminence médiane et le noyau arqué et non dans des régions voisines. Par ailleurs, la β -endorphine est capable d'inhiber la libération de GnRH si elle est injectée sur des fragments d'éminence médiane et a la capacité de moduler la synthèse d'ARNm GnRH (Rotsztein *et al.*, 1978a ; Bonavera *et al.*, 1993a ; Li et Pelletier, 1993). Enfin, une réduction de la fixation de la β -endorphine sur son récepteur μ est observée au niveau de l'aire préoptique et de l'éminence médiane l'après-midi du proœstrus (Jacobson et Kalra, 1989 ; Weiland et Wise, 1990 ; Mateo *et al.*, 1992).

▪ *Enképhaline et Dynorphine*

Chez la rate ovariectomisée, la dynorphine inhibe la sécrétion de LH en agissant par l'intermédiaire des récepteurs aux opioïdes κ , et la methionine-enképhaline exerce le même effet à travers les récepteurs δ (Leadem et Kalra, 1985a ; Leadem et Yagenova, 1987). Des études ont par ailleurs démontré que les œstrogènes auraient une action stimulatrice sur le système enképhalinergique et dynorphinergique du noyau arqué (Morrell *et al.*, 1984 ; Quinones-Jenab *et al.*, 1996).

▪ Mode d'action des peptides opioïdes sur les neurones à GnRH

La probabilité d'une action directe des peptides opioïdes sur la sécrétion de GnRH a été envisagée suite à l'observation de fibres à β -endorphine en contact synaptique (Leranth *et al.*, 1988 ; Chen *et al.*, 1990) ou de fibres enképhalinergiques et dynorphinergiques en

apposition étroite (Hoffman *et al.*, 1988) avec les corps cellulaires des neurones à GnRH. Cependant l'absence de détection de l'ARNm codant les récepteurs μ , δ et κ dans les neurones à GnRH (Mitchell *et al.*, 1997a ; Sannela et Petersen, 1997) a remis en question cette probabilité. Il a donc été envisagé que les peptides opioïdes réguleraient l'activité des neurones à GnRH par voie polysynaptique. Les études se sont principalement intéressées à la β -endorphine et certains arguments semblent montrer que les neurones sécrétant le monoxyde d'azote (Pu *et al.*, 1997 ; Bhat *et al.*, 1998 ; Faletti *et al.*, 1999), les acides aminés excitateurs (Bonavera *et al.*, 1993b ; Bhat *et al.*, 1998), la galanine (Mitchell *et al.*, 1997a) ou encore la noradrénaline (Bicknell, 1985 ; Kalra, 1993) pourraient être les médiateurs des effets exercés par la β -endorphine sur les neurones à GnRH.

Les peptides opioïdes et plus particulièrement la β -endorphine, peptide dérivé de la POMC et quasi exclusivement synthétisé dans le noyau arqué, apparaissent ainsi comme des systèmes inhibiteurs majeurs sur la sécrétion de GnRH. Il est notamment admis qu'une réduction de l'activité β -endorphinergique serait responsable d'une desinhibition du système à GnRH et ainsi de la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH.

b- α -MSH (α - melanocyte stimulating hormone) et Agrp (Agouti related peptide)

Alors que l'implication de la β -endorphine est bien documentée, le rôle de l' α -MSH, autre peptide dérivant de la POMC, dans la régulation du système à GnRH est moins connu. L'injection intracérébroventriculaire d' α -MSH à des rates ovariectomisées induit une diminution de la sécrétion de LH (Khorram *et al.*, 1984a). En revanche, l' α -MSH n'est pas capable de moduler la libération de GnRH à partir de fragments d'éminence médiane maintenus *in vitro* (Khorram *et al.*, 1984b). La même équipe a alors injecté ce peptide par voie intraveineuse et, n'ayant pas observé d'effet de l' α -MSH sur la libération de LH, les

auteurs ont conclu à une action centrale de l' α -MSH. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il a été émis l'hypothèse que l' α -MSH exercerait une action inhibitrice au niveau hypothalamique sur l'activité de sécrétion de GnRH par une action s'opérant soit directement sur les corps cellulaires des neurones à GnRH –et pas sur leurs terminaisons nerveuses- soit par l'intermédiaire d'autres systèmes neuronaux (Khorram *et al.*, 1984b). Cinq récepteurs à l' α -MSH sont actuellement clonés (Adan et Gipsen, 1997) et les récepteurs MC3-R et MC4-R sont les principaux récepteurs exprimés dans le cerveau et plus précisément dans l'hypothalamus (Gantz *et al.*, 1993 ; Roselli-Rehfuss *et al.*, 1993 ; Mountjoy *et al.*, 1994). L'implication du récepteur MC4 dans les modulations exercées par l' α -MSH sur le système à GnRH semble peu probable chez le mâle étant donné que l'injection intracérébroventriculaire de SHU9119, un antagoniste du récepteur MC4, n'induit pas de variations de sécrétion de LH chez le rat mâle (Raposo *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'expression des récepteurs à l' α -MSH par les neurones à GnRH n'est pas encore établie.

L'Agrp est un neuropeptide orexigénique récemment découvert qui présente la particularité d'être un antagoniste endogène des récepteurs aux mélanocortines MC3-R et MC4-R et par là même de l' α -MSH. Les neurones exprimant l'Agrp, de petite taille, ont une localisation hypothalamique restreinte au niveau de noyau arqué (Bagnol *et al.*, 1999). En outre, les systèmes à POMC et à Agrp sont exprimés par deux populations cellulaires distinctes (Shutter *et al.*, 1997 ; Hahn *et al.*, 1998 ; Wilson *et al.*, 1999) mais ces deux systèmes se projetteraient vers des aires cérébrales identiques (Bagnol *et al.*, 1999). Des études de colocalisations ont cependant révélé que 98% des neurones à Agrp exprimaient aussi le NPY (Broberger *et al.*, 1998). Très récemment Stanley *et al.* (1999) ont rapporté que l'injection intracérébroventriculaire d'Agrp provoquait une augmentation des taux plasmatiques de LH et que l'Agrp stimulait la libération de GnRH à partir d'explants

d'éminence médiane. A noter que cet effet stimulateur de l'Agrp sur la libération de GnRH est inhibé par l' α -MSH (Stanley *et al.*, 1999).

Ces données suggèrent donc l'implication de l'Agrp dans l'un des mécanismes permettant à l' α -MSH de moduler la libération de GnRH/LH.

c- Famille de la galanine

▪ *Galanine*

Une forte population de neurones galaninergiques est observée dans le noyau arqué. Ces cellules, de petite et de taille moyenne, sont observées dans la partie ventrolatérale du noyau et s'étendent ventralement vers le noyau ventromédian (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Melander *et al.*, 1986a). De nombreuses fibres galaninergiques sont rencontrées au sein du noyau arqué et des expériences de déaffération du noyau ont révélé que ces fibres provenaient principalement de neurones locaux (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Horvath *et al.*, 1995a). De plus, environ 60% des terminaisons nerveuses à galanine présentes au niveau de l'éminence médiane auraient pour origine le noyau arqué (Merchenthaler, 1991). Au niveau du noyau arqué, la galanine est essentiellement colocalisée avec la GHRH, et occasionnellement avec le GABA et la dopamine (Melander *et al.*, 1986b Meiter et Hökfelt, 1988 ; Meister *et al.*, 1990 ; Niimi *et al.*, 1990).

Les neurones synthétisant la galanine semblent également être la cible privilégiée des œstrogènes. En effet, dans le noyau arqué, une importante population –estimée à environ 50%- des neurones à galanine contiennent des récepteurs aux œstrogènes (Bloch *et al.*, 1992 ; Horvath *et al.*, 1995b). Par ailleurs, l'expression de l'ARNm codant la galanine dans le noyau arqué est stéroïdo-dépendante et stimulée en présence de testostérone (Delemarre-Van de

Waal *et al.*, 1994). Malgré le fait que la moitié des neurones galaninergiques du noyau arqué constituent vraisemblablement une cible directe pour les œstrogènes, peu d'études se sont jusqu'alors intéressées à l'implication de la galanine du noyau arqué dans la régulation du système à GnRH. En revanche, l'action de la galanine sur le système à GnRH au niveau de l'aire préoptique ou de l'éminence médiane est bien documentée. Ainsi, de nombreux travaux suggèrent que la galanine serait l'un des régulateurs essentiels du système reproducteur. Notamment la galanine est exprimée avec la GnRH dans les mêmes neurones (Merchenthaler *et al.*, 1990, 1991, 1993 ; Marks *et al.*, 1993 ; Rossmanith *et al.*, 1996). Ainsi, l'administration de galanine dans le troisième ventricule cérébral chez des rats femelles ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes et progestérone stimule rapidement la libération de LH (Sahu *et al.*, 1987). Cet effet stimulateur de la galanine sur la libération de LH hypophysaire semble passer via une action hypothalamique. En effet, chez le rat mâle ou le rat femelle ovariectomisée et supplémentée en œstradiol et progestérone, la galanine stimule la libération de GnRH à partir de fragments incluant à la fois l'éminence médiane et le noyau arqué (Lopez et Negro-Vilar, 1990 ; Sahu *et al.*, 1994). De plus, la galanine intervient dans la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH : l'injection intracérébroventriculaire d'un immunsérum anti-galanine atténue la sécrétion basale de LH et diminue l'amplitude du pic de LH chez des femelles en proœstrus (Lopez *et al.*, 1993 ; Xu *et al.*, 1996a).

Les récepteurs de la galanine semblent également jouer un rôle-clé dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH : la galantide, antagoniste non sélectif des récepteurs de la galanine, diminue la libération basale de GnRH et de LH, et supprime la libération de GnRH provoquée par la galanine (Lopez et Negro-Vilar, 1990 ; Sahu *et al.*, 1994). Plus précisément, l'injection intracérébroventriculaire de galantide chez des femelles ovariectomisées et supplémentées en œstradiol et progestérone, inhibe la survenue du pic préovulatoire de LH

(Sahu *et al.*, 1994). Des résultats similaires ont également été obtenus chez des rates en proœstrus (Sahu *et al.*, 1994). De plus, la présence d'appositions entre les fibres à galanine et les péricaryons à GnRH suggère l'existence d'une régulation directe de la galanine sur l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique (Merchenthaler *et al.*, 1991). La galanine agit sur sa cellule-cible via sa fixation sur un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Actuellement, trois sous-types de récepteurs de la galanine, nommés GalR1 (Habert-Ortoli *et al.*, 1994 ; Burgevin *et al.*, 1995 ; Parker *et al.*, 1995) , GalR2 (Fathi *et al.*, 1997 ; Howard *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997 ; Bloomquist *et al.*, 1998 ; Kolakowski *et al.*, 1998 ; Pang *et al.*, 1998) et GalR3 (Wang *et al.*, 1997 ; Kolakowski *et al.*, 1998 ; Smith *et al.*, 1998) ont été clonés. Dans l'hypothalamus, l'expression du récepteurs GalR1 et GalR2 est bien documentée (Mitchell *et al.*, 1997b ; Mitchell *et al.*, 1999a) alors que l'expression du récepteur GalR3 n'est pas encore bien établie. Au cours d'une récente étude nous avons mis en évidence que certains neurones à GnRH avaient la capacité de synthétiser l'ARNm codant le récepteur GalR1 (Mitchell *et al.*, 1999b) suggérant un rôle modulateur direct de la galanine sur le système à GnRH. Cependant, l'expression du récepteur GalR1 ne concerne qu'une faible sous-population de neurones à GnRH -localisée exclusivement dans l'aire préoptique rostrale- et dépend de l'état stéroïdien de l'animal (Mitchell *et al.*, 1999b). Ainsi, la plus forte expression de l'ARNm GalR1 dans les neurones à GnRH a été observée chez des femelles en œstrus (~20%), alors que chez le mâle aucun neurone à GnRH n'exprime l'ARNm GalR1. Ainsi, la galanine agirait principalement par voie polysynaptique afin de réguler l'activité des neurones à GnRH, et la nature des neurones-relais n'est pas encore connue.

▪ *Galanin-Like Peptide (GALP)*

Alors que la galanine a été pendant longtemps considérée comme membre unique de sa famille, très récemment un peptide apparenté à la galanine, nommé galanin-like peptide (GALP), a été cloné (Ohtaki *et al.*, 1999). Contrairement à la galanine qui se fixe à haute affinité sur l'ensemble de ses récepteurs, le GALP présente la particularité de se fixer avec une forte affinité sur le récepteur GalR2 (Ohtaki *et al.*, 1999). Des études réalisées avec le GALP devraient donc permettre de déterminer l'implication du récepteur GalR2 dans les mécanismes physiologiques régulés par la famille de la galanine. Les neurones exprimant l'ARNm codant le GALP ont une localisation restreinte au noyau arqué et ces neurones sont principalement répartis dans la subdivision ventromédiane avec une expression plus abondante dans la partie postérieure du noyau (Juréus *et al.*, 2000 ; Kerr *et al.*, 2000 ; Larm et Gundlach, 2000).

Juréus *et al.* (2000) suggèrent par ailleurs que les neurones GALP seraient de nouvelles cibles potentielles pour l'action de la leptine au niveau du noyau arqué puisque ces neurones ont une distribution superposable à celle de neurones exprimant le récepteur à la leptine. De plus, l'injection intrapéritonéale de leptine induit une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm GALP (Juréus *et al.*, 2000).

La galanine est donc l'un des régulateurs stimulateurs essentiels du système à GnRH. Il apparaît cependant que bien que de nombreux travaux se soient intéressés à la galanine de l'aire préoptique, peu d'études se sont consacrées à la galanine du noyau arqué alors que ces neurones seraient de bons candidats pour le rétrocontrôle stéroïdien.

d- NPY (Neuropeptide Tyrosine)

Le NPY est présent à haute concentration et de façon ubiquitaire dans le cerveau de rat (Nakagawa *et al.*, 1985). Le noyau arqué contient une population très dense (60 à 80 neurones par section frontale et 140 à 160 neurones dans la partie la plus caudale du noyau) de neurones synthétisant le NPY. Ces neurones sont généralement de petite taille (environ 8 µm de diamètre), et localisés au niveau médian du noyau (Card *et al.*, 1983 ; Chronwall *et al.*, 1985). L'innervation NPYergique de l'hypothalamus et de l'aire préoptique provient essentiellement de deux populations neuronales, l'une localisée dans le noyau arqué et l'autre dans le tronc cérébral (Sahu *et al.*, 1988 ; Ueda *et al.*, 1991). Des expériences de traçage rétrograde ont permis de déterminer que nombre de terminaisons nerveuses rencontrées au voisinage des neurones à GnRH provenaient de neurones à NPY localisés dans le noyau arqué (Tsuruo *et al.*, 1990 ; Li *et al.*, 1999). Les neurones à NPY du noyau arqué pourraient par ailleurs être les vecteurs d'une action stimulatrice des œstrogènes sur le système à GnRH car 10 à 20% d'entre eux expriment le récepteur aux œstrogènes chez le rat (Sar *et al.*, 1990 ; Simonian *et al.*, 1999) et l'ARNm du NPY augmente sous l'influence des œstrogènes (Sahu *et al.*, 1994) avec un pic d'expression l'après-midi du proœstrus (Bauer-Dantoin *et al.*, 1992).

Le NPY possède un rôle facilitateur sur la sécrétion de GnRH (Kalra, 1993 ; Levine, 1997). Ces effets semblent intervenir principalement au niveau de l'éminence médiane (Herbison, 1998). A ce niveau, les effets du NPY sur la libération de GnRH semblent varier fortement en fonction de l'imprégnation stéroïdienne des animaux étudiés: chez des femelles ovariectomisées ou des mâles castrés, le NPY n'a aucun effet sur la libération de GnRH (Crowley et Kalra, 1987 ; Khorram *et al.*, 1988 ; Sabatino *et al.*, 1989, 1990 ; Urban *et al.*, 1996), par contre chez des femelles OVX+E2 ou OVX+E2+P ou des mâles castrés traités par de la testostérone le NPY stimule fortement la libération de GnRH par des fragments

d'hypothalamus médiobasaux ou d'éminences médianes (Crowley et Kalra, 1987, Khorram *et al.*, 1988 ; Sabatino *et al.*, 1989, 1990 ; Urban *et al.*, 1996). Beseke et Levine (1994) confirment ce phénomène chez des femelles cycliques : le NPY ne stimule la sécrétion de GnRH par des fragments d'éminences médianes que le jour du proœstrus. Cette stéroïdo-dépendance des effets du NPY sur la libération de GnRH pourrait être liée à la levée d'inhibition exercée par les peptides opioïdes sur la sécrétion de NPY (Sahu *et al.*, 1990 ; Xu *et al.*, 1996b).

La galanine du noyau arqué pourrait être l'un des médiateurs des effets du NPY sur la sécrétion de GnRH. En effet, des contacts synaptiques ont été observés entre les fibres à NPY et les péricaryons à galanine (Horvath *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'administration de galantide, antagoniste non sélectif des récepteurs de la galanine, empêche la libération de GnRH induite par le NPY (Horvath *et al.*, 1996). Il est également possible que le GALP, dont les péricaryons sont exclusivement localisés dans le noyau arqué, pourrait participer à la régulation de l'activité des neurones à NPY.

D'après Kalra *et al.* (1992), le principal type de récepteur au NPY impliqué dans la régulation de la sécrétion de GnRH/LH chez la rate est le récepteur Y1 (Y1-R). Très récemment des expériences réalisées par l'équipe de Levine ont rapporté que les œstrogènes stimuleraient la réponse des neurones à GnRH au NPY via une stimulation de l'expression du récepteur Y1 (Xu *et al.*, 2000).

Contrairement à ce qui est observé chez l'animal adulte le jour du proœstrus, où le NPY joue un rôle facilitateur sur la sécrétion de GnRH chez le rat, de récentes études réalisées chez le primate suggèrent que le NPY exerce un effet inhibiteur sur le système à GnRH durant la période postnatale précédant la puberté. Notamment El Majdoubi *et al.* (2000), observent que le profil d'expression du NPY dans l'hypothalamus médiobasal (ARNm et protéine) est inversement corrélé au pulse de GnRH durant la période postnatale et que l'injection

intracérébroventriculaire d'un antagoniste du récepteur Y1-R chez des rates juvéniles induit une sécrétion de GnRH précoce.

Les neurones à NPY du noyau arqué apparaissent donc comme l'un des principaux systèmes stimulateurs de la libération de GnRH au niveau de l'éminence médiane chez le rat adulte. Cependant, l'action du NPY est complexe puisqu'il pourrait également avoir une action inhibitrice sur l'axe reproducteur à certains stades physiologiques de l'animal.

e- GnRH

De récents travaux suggèrent que la GnRH pourrait jouer un rôle de frein sur sa propre sécrétion et que le noyau arqué serait le site de cette action. En effet, l'application d'analogues de la GnRH sur des fragments d'hypothalamus médiobasaux inhibe la sécrétion basale de GnRH alors qu'elle est sans effet sur des fragments d'éminences médianes seuls (Bourguignon *et al.*, 1987 ; De Paolo *et al.*, 1987 ; Zanisi *et al.*, 1987). La réalité d'une telle action est renforcée par la présence des fibres à GnRH et d'ARNm codant le récepteur au GnRH (GnRH-R) dans le noyau arqué (Jennes *et al.*, 1996). Les niveaux d'ARNm codant le GnRH-R dans l'hypothalamus médiobasal présentent une corrélation inverse avec les taux d'ARNm GnRH exprimés dans l'aire préoptique (Seong *et al.*, 1998). Ainsi, dans le noyau arqué, les niveaux d'expression de l'ARNm codant le GnRH-R sont élevés le matin du proœstrus et déclinent jusqu'à un niveau le plus faible du cycle œstrien l'après-midi du proœstrus (Jennes *et al.*, 1996).

Ces résultats suggèrent qu'il existe une interaction réciproque entre les neurones à GnRH et les neurones (voire cellules gliales) du noyau arqué afin de permettre une sécrétion optimale de GnRH. Le phénotype des cellules-cibles de la GnRH n'est cependant pas encore

caractérisé même si certaines études laissent supposer que le glutamate et le GABA seraient deux candidats de choix (Feleder et al., 1996).

f- Substance P

De nombreux corps cellulaires de neurones synthétisant la substance P, de petite taille et de forme ovoïde, sont présents dans le noyau arqué (Larsen, 1992). Ces neurones sont exclusivement retrouvés dans la partie postérieure du noyau alors qu'un dense réseau de fibres contenant la substance P s'étend à tous les niveaux antéro-postérieurs (Larsen, 1992). Les neurones à substance P du noyau arqué seraient capables d'influencer d'autres types neuronaux locaux tels que les neurones à ACTH (Hisano *et al.*, 1984), enképhaline (Tsuruo *et al.*, 1983), GHRH (Daikoku *et al.*, 1988), et même à substance P (Tsuruo *et al.*, 1984a).

Les neurones à substance P du noyau arqué semblent être impliqués dans la régulation des neurones à GnRH puisque leur nombre varie au cours du cycle œstrien chez la femelle avec un nombre maximal de neurones le jour du proœstrus et de l'œstrus (Tsuruo *et al.*, 1984b). De plus, un traitement aux œstrogènes induit, chez des femelles ovariectomisées, une augmentation des niveaux d'ARNm codant la substance P (Brown *et al.*, 1990) et une augmentation des niveaux de substance P dans le noyau arqué et non dans l'aire préoptique (Betha *et al.*, 1995). Ces neurones seraient la cible directe des stéroïdes gonadiques puisqu'ils présentent des récepteurs à l'œstradiol (Akesson et Micevych, 1988) et à la progestérone (Nielsen et Blaustein, 1990). De plus, une partie des neurones à substance P du noyau arqué se projettent dans la zone septo-préoptique au niveau de laquelle ils établissent des contacts synaptiques avec les dendrites et soma des neurones à GnRH (Tsuruo *et al.*, 1991). Cependant, très peu d'études ont été entreprises pour déterminer l'influence de la substance P sur l'activité du système à GnRH. Il ressort néanmoins que la substance P aurait un effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH chez des femelles en diœstrus ou

ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes (Ohtsuka *et al.*, 1987) et un effet inhibiteur si ce peptide est injecté chez des femelles en proœstrus (Kerdelhué *et al.*, 1978 ; Duval *et al.*, 1998). Ces effets sembleraient passer via le récepteur à la substance P de type NK-1.

g- Neurotensine

De nombreux neurones exprimant la neurotensine sont présents dans le noyau arqué. Dans la partie la plus antérieure du noyau, les cellules ont une distribution médiane alors que dans sa partie la plus postérieure les cellules sont distribuées en position ventrolatérale (Kahn *et al.*, 1980 ; Ibata *et al.*, 1984a, 1984b). Une colocalisation partielle est observée entre la neurotensine et la dopamine (Hökfelt *et al.*, 1984). Les neurones exprimant la neurotensine du noyau arqué, et principalement ceux localisés dans la partie dorsomédiane du noyau, sont régulés par l'œstradiol et ont ainsi été impliqués dans la régulation du système à GnRH (Alexander, 1993). De même, chez des femelles cyclées, un pic d'expression de l'ARNm codant la neurotensine a été observé le jour du proœstrus dans la partie dorsomédiane du noyau arqué (Alexander, 1993). Par ailleurs, l'action des stéroïdes gonadiques semble être directe puisque qu'environ 80% des neurones du noyau arqué exprimant la neurotensine expriment le récepteur à la progestérone (Alexander, 1999).

Alors que la neurotensine a été isolée et caractérisée au début des années 1970 (Carraway et Leeman, 1973, 1975), son implication dans la régulation de la sécrétion de GnRH est peu documentée. Il apparaît notamment que l'effet de la neurotensine sur la sécrétion de GnRH semble dépendre de l'imprégnation stéroïdienne de l'animal. Ainsi, chez des animaux ovariectomisés, la neurotensine induit une diminution de la sécrétion de LH (Vijayan et McCann, 1979) tandis que chez des femelles en proœstrus ou ovariectomisées et supplémentées en stéroïdes gonadiques, la neurotensine induit une augmentation de l'amplitude des pics de LH (Ferris *et al.*, 1984 ; Alexander *et al.*, 1989).

I.2.2. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs

a- GABA (acide γ -aminobutyrique)

La population GABAergique du noyau arqué a pu être détectée par l'intermédiaire de la GAD (Acide Glutamique Decarboxylase), enzyme responsable de la transformation du glutamate en GABA. Les corps cellulaires des neurones GABAergiques sont localisés dans la partie dorsomédiane du noyau et un dense réseau GABAergique est présent dans le noyau arqué (Tappaz *et al.*, 1977 ; Vincent *et al.*, 1982). A noter que de nombreux neurones GABAergiques du noyau arqué expriment la dopamine (Everitt *et al.*, 1984 ; Melander *et al.*, 1986b) et dans une moindre mesure le NPY (Horvath *et al.*, 1997) et la galanine (Melander *et al.*, 1986b). Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central (Decavel et Van den Pol, 1990 ; Herbison, 1998). La quasi-totalité des neurones de l'hypothalamus sont cibles de synapses GABAergiques (Decavel et Van den Pol, 1990). Cette observation est à rapprocher d'une étude montrant qu'une stimulation des récepteurs au GABA, provoque une hyperpolarisation de 98% des neurones de l'hypothalamus médiobasal (Lagrange *et al.*, 1996). Ainsi, il apparaît que la majorité –pour ne pas dire la totalité- des neurones du noyau arqué semblent avoir la capacité de répondre au GABA. A signaler que l'expression du récepteur GABA_A a été rapportée dans le noyau arqué (Blasquez *et al.*, 1994 ; Davis *et al.*, 2000) et qu'un traitement œstrogénique à des femelles ovariectomisées induit une diminution de la fixation du GABA sur son récepteur GABA_A (Schumacher *et al.*, 1989). Chez les primates, la totalité des neurones exprimant le récepteur à la progestérone dans le noyau arqué sont immunopositifs pour la GAD (Leranth *et al.*, 1991).

Le GABA est considéré principalement comme un facteur inhibiteur du système à GnRH (Jarry *et al.*, 1991 ; Herbison *et al.*, 1991 ; Scott et Clarke, 1993, Mitsushima *et al.*, 1994). En plus d'un effet direct sur le système à GnRH via des récepteurs GABA_A (Petersen *et al.*, 1993a ; Jung *et al.*, 1998), le GABA est également impliqué de manière indirecte dans

la modulation de la sécrétion pulsatile de GnRH en intervenant sur de nombreux types cellulaires modulant la sécrétion de GnRH. Entre autre, il régulerait le tonus inhibiteur exercé sur les neurones à GnRH par les neurones à β -endorphine du noyau arqué. En effet, une étude neuroanatomique montre que des terminaisons nerveuses GABAergiques sont en contact synaptique avec des neurones à β -endorphine du noyau arqué se projetant vers l'aire préoptique (Horvath *et al.*, 1992a). De plus, Nikolarakis *et al.* (1988) rapportent que les effets stimulateurs exercés par le GABA sur la sécrétion de GnRH sont inversés suite à l'administration de naloxone. Par ailleurs, l'administration de GABA sur des fragments incluant le noyau arqué et l'éminence médiane induit une augmentation de la libération de GnRH (Masotto *et al.*, 1989). Cet effet stimulateur est bloqué par la bicuculline ce qui suggère l'implication du récepteur GABA_A. Cette observation indique que le GABA pourrait agir, via ses récepteurs GABA_A, au niveau de l'éminence médiane et/ou du noyau arqué afin de stimuler la sécrétion de GnRH.

Ainsi, il apparaît que le GABA joue un rôle double dans le contrôle de la sécrétion de GnRH chez le mâle et la femelle : il inhibe la sécrétion de GnRH par action directement sur les péricaryons à GnRH localisés dans l'aire préoptique et stimule la sécrétion de GnRH par une action s'exerçant au niveau de la région noyau arqué-éminence médiane.

b- Glutamate et Aspartate

Le glutamate et l'aspartate sont d'importants neurotransmetteurs excitateurs de l'hypothalamus neuroendocrine (Van Den Pol *et al.*, 1990). Des études ultrastructurales ont démontré la présence de contacts synaptiques entre les axones glutamatergiques et les dendrites et corps cellulaires de nombreux neurones du noyau arqué (Van den Pol *et al.*, 1991). Il apparaît également que les stéroïdes gonadiques sont d'importants régulateurs

physiologiques de la libération des acides aminés excitateurs dans l'hypothalamus médiobasal (Carbone *et al.*, 1992). Les récepteurs ionotropiques (de type NMDA, AMPA, et kaïnate) et métabotropiques au glutamate sont exprimés au niveau du noyau arqué (Brann, 1995 ; Diano *et al.*, 1997 ; Ghosh *et al.*, 1997) et les œstrogènes augmentent les niveaux d'expression des récepteurs GluR1 et GluR2/R3 (Diano *et al.*, 1997). De plus, la moitié des cellules exprimant les récepteurs AMPA expriment également le récepteur aux œstrogènes dans le noyau arqué.

Le glutamate et l'aspartate exercent une puissante action stimulatrice sur la sécrétion de GnRH (Bourguignon *et al.*, 1989a ; Donoso *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992b ; Arias *et al.*, 1990 ; Brann et Mahesh, 1997 ; Kalra *et al.*, 1997 ; Kawakami *et al.*, 1998). Les études utilisant des bloqueurs pharmacologiques spécifiques des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), DL- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique acid (AMPA), et kaïnate, ont montré que le glutamate et l'aspartate jouaient un rôle dans la régulation du mode de sécrétion pulsatile (Ping *et al.*, 1994) et cyclique (Lopez *et al.*, 1992b ; Brann et Mahesh, 1991) de GnRH/LH chez la rate adulte. A noter que le glutamate et/ou l'aspartate n'ont pas les mêmes effets sur la sécrétion de GnRH/LH selon qu'ils agissent sur des récepteurs NMDA ou non-NMDA tels que les récepteurs AMPA/Kaïnate. En effet, le NMDA est capable d'induire une sécrétion répétée de LH lorsqu'il est administré sur un mode pulsatile, alors que le kaïnate entraîne une forte libération de LH s'il est injecté en administration unique (Abbud et Smith, 1991 ; Medhamurthy *et al.*, 1992). Le site d'action des acides aminés excitateurs sur le contrôle de la libération de GnRH via les récepteurs NMDA serait l'aire préoptique/OVLT (Bourguignon *et al.*, 1989b), alors que celui pour les récepteurs non-NMDA serait la région de l'hypothalamus médiobasal (Donoso *et al.*, 1990 ; Lopez *et al.*, 1992b).

c- Monoxyde d'Azote (NO)

L'identification du NO en tant que messager neurotransmetteur est assez récente (Bredt *et al.*, 1990). Dans le cerveau, deux isoformes de la NO synthétase (NOS) sont exprimées de façon constitutive: la NOS neuronale (nNOS) et la NOS endothéliale (eNOS) (Prevot *et al.*, 2000a). La présence de cellules produisant le NO est discrète dans le noyau arqué. Les cellules exprimant la nNOS sont principalement retrouvées dans la portion caudale du noyau et coexpriment l'enképhaline (Bhat *et al.*, 1996 ; Ceccatelli *et al.*, 1996 ; Yamada *et al.*, 1996) et une faible immunoréactivité pour la eNOS est détectée dans le noyau arqué (Bhat *et al.*, 1996). L'implication du NO produit par le noyau arqué dans la régulation du système à GnRH semble peu probable. Notamment, les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine nNOS ainsi que l'activité NOergique ne présentent pas de variations au cours du cycle œstrien dans l'hypothalamus médiobasal (Lamar *et al.*, 1999).

En revanche, l'activité NOergique de l'aire préoptique est soumise à des variations cycliques avec un maximum d'activité l'après-midi du proœstrus (Lamar *et al.*, 1999). De plus, Herbison *et al.* (1996) ont montré au niveau de l'aire préoptique une forte intrication morphologique entre les cellules qui expriment la nNOS et les corps cellulaires des neurones à GnRH et des études réalisées *in vivo* et *in vitro*, utilisant des inhibiteurs des NOS, ont révélé que la synthèse et la libération de NO par l'hypothalamus étaient indispensables pour la sécrétion basale chez le mâle (Rettori *et al.*, 1993) et pour la survenue du pic de LH chez les rates OVX et supplémentées en œstradiol et en progestérone (Bonavera *et al.*, 1993b, 1994). Etant donné que le NO est un gaz diffusible agissant directement sur ses cellules voisines sans nécessité de récepteurs, il a été émis l'hypothèse qu'un nombre important des effets induits par certains neurotransmetteurs et neuropeptides sur le système à GnRH -notamment ceux de la noradrénaline (Rettori *et al.*, 1992, 1993, 1997 ; Canteros *et al.*, 1996), du glutamate (Bonavera *et al.*, 1993b ; Bhat *et al.*, 1998), du NPY (Bonavera *et al.*, 1996), du GABA

(Seilicovich et al., 1995), et de la β -endorphine (Pu et al., 1997 ; Faletti et al., 1999)- seraient effectués par l'intermédiaire de neurones produisant le NO.

Il apparaît ainsi que le NO intervient peu au sein même du noyau arqué mais qu'il joue un rôle majeur dans la régulation du système à GnRH au niveau de l'aire préoptique. Les neurones contenant de la NOS pourraient notamment être des intermédiaires importants dans les modulations initiées par le noyau arqué.

d- Dopamine

Le premier transmetteur décrit dans le noyau arqué a été la dopamine (Ungerstedt, 1971 ; Chan-Palay *et al.*, 1984 ; Ruggiero *et al.*, 1984). Les neurones dopaminergiques, identifiés par leur immunoréactivité pour la tyrosine hydroxylase (TH), sont distribués dans la partie dorsolatérale du noyau. Plus de 80% des neurones immunoréactifs pour la TH, expriment le récepteur aux œstrogènes α (Simonian *et al.*, 1999) et le récepteur à la progestérone (Fox *et al.*, 1990). Au niveau du noyau arqué, un traitement chronique avec l'œstradiol provoque une diminution de l'activité TH et des niveaux d'expression d'ARNm codant la TH (Demarest *et al.*, 1984 ; Arita et Kimura, 1987 ; Jones et Naftolin, 1990 ; Rasmussen *et al.*, 1992 ; Arbogast et Voogt, 1993) et ces effets sont inversés suite à l'administration de progestérone (Arbogast et Voogt, 1993). Cependant les neurones à dopamine du noyau arqué ne semblent pas se projeter vers l'aire préoptique (Simonian *et al.*, 1999). L'expression des récepteurs à la dopamine D1-R et D2-R a par ailleurs été rapportée dans le noyau arqué (Dubois *et al.*, 1986 ; Velasco et Luchsinger, 1998).

En 1976, Rotsztein *et al.* montrent que la dopamine stimule *in vitro* une libération rapide de GnRH par des fragments d'hypothalamus médiobasaux de mâles intacts et de femelles OVX+E2. En revanche, la dopamine ne stimule pas une telle libération par des

fragments d'hypothalamus médiobasaux de femelles OVX non supplémentées. Negro-Vilar *et al.* (1979) indiquent, par ailleurs, que les concentrations de dopamine nécessaires pour stimuler la libération de GnRH par des fragments d'hypothalamus médiobasaux sont plus élevées que celles utilisées pour les fragments d'éminence médiane suggérant l'implication du noyau arqué dans cette libération de GnRH induite par la dopamine. De plus, l'inhibition de la sécrétion de GnRH par les peptides opioïdes pourrait passer par l'inhibition de la sécrétion de dopamine. En effet, Rotsztein *et al.* (1978b) montrent que la Met-enképhaline inhibe la sécrétion de GnRH induite par la dopamine. Aussi, la naloxone, antagoniste des récepteurs aux peptides opioïdes, stimule de façon concomitante la sécrétion de GnRH, de dopamine et de noradrénaline par des fragments incluant l'aire préoptique et l'éminence médiane (Leadem *et al.*, 1985b) ou l'éminence médiane seule (Rasmussen *et al.*, 1988).

Ainsi la dopamine est considérée comme un facteur stimulateur sur la sécrétion de GnRH et les peptides opioïdes induiraient en partie leurs effets inhibiteurs sur cette sécrétion via l'inhibition du système dopaminergique.

I.2.3. Facteurs gliaux

Dans le système nerveux central et l'hypothalamus, en plus d'une communication 'classique' neurones→neurones, l'existence d'une communication glie→neurones est établie et serait impliquée dans la régulation de nombreux systèmes hypothalamiques. En effet, il est désormais admis que les astrocytes hypothalamiques sécrètent des substances trophiques de nature peptidergique pour agir sur le développement et l'activité sécrétoire de certains systèmes neuronaux dont le système à GnRH.

a- TGF α (Transforming Growth Factor α)

Le TGF α est un polypeptide exprimé dans de nombreuses cellules astrocytaires du noyau arqué (Ma *et al.*, 1992). Les niveaux de l'ARNm codant le TGF α dans l'hypothalamus médiobasal augmentent de façon importante le jour du proœstrus ou chez des femelles ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes et progestérone (Ma *et al.*, 1992). Le noyau arqué semble participer pour une part importante à cette augmentation (Ma *et al.*, 1992).

L'action du TGF α dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH a été caractérisée grâce aux travaux de l'équipe d'Ojeda : le TGF α stimule la libération de GnRH à partir de fragments d'éminence médiane maintenus en survie (Ojeda *et al.*, 1990) et constitue l'un des facteurs déclencheurs de la puberté chez la rate (Junier *et al.*, 1991 ; Ma *et al.*, 1992). Le fait que les neurones à GnRH n'expriment pas le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor), récepteur capable de transduire le message du TGF α , a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le TGF α agirait sur des types cellulaires intermédiaires pour induire la sécrétion de GnRH (Ma *et al.*, 1994a ; Voigt *et al.*, 1996). Etant donné que le récepteur à l'EGF est exprimé dans le noyau arqué (Ma *et al.*, 1994b), l'action du TGF α sur le système à GnRH pourrait donc s'effectuer par l'intermédiaire de neurones localisés dans ce noyau.

b- Superfamille du TGF β

L'ARNm codant le TGF β_1 et une immunoréactivité pour le TGF β_{1-3} ont été détectés dans le noyau arqué (Unsicker *et al.*, 1991 ; Gayle *et al.*, 1999 ; Plata-Salaman *et al.*, 2000) et les astrocytes apparaissent comme la principale source produisant le TGF β_1 (Melcangi *et al.*, 1995 ; Buchanan *et al.*, 2000 ; Melcangi *et al.*, 2000).

Melcangi et ses collaborateurs ont été les premiers à impliquer le TGF β dans la régulation des neurones à GnRH (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996). En effet, ils ont observé que le milieu de culture, conditionné par des astrocytes immatures, contient un

facteur thermostable capable d'induire la sécrétion de GnRH par la lignée GT1 en culture et que ce facteur responsable d'une telle action est le TGF β (Melcangi *et al.*, 1995). La même équipe montre que le TGF β , en plus de stimuler la libération de GnRH par les neurones GT1, est capable de moduler l'expression de l'ARNm de la GnRH (Galbiati *et al.*, 1996 ; Messi *et al.*, 1999). Le TGF β agit sur sa cellule cible par l'intermédiaire de deux types de récepteurs Sérine/Thréonine kinase, nommés TGF β -RI et TGF β -RII (Bassing *et al.*, 1994). Nous avons récemment observé que le TGF β -RI (B1) était exprimé dans les régions hypothalamiques associées à la reproduction (aire préoptique, noyau arqué) et plus précisément par les neurones à GnRH (Prevot *et al.*, 2000b). Ces résultats nous permettent d'envisager que, contrairement au TGF α , le TGF β peut agir directement sur le neurone à GnRH. Le TGF β pourrait par ailleurs jouer un rôle-clef dans le rétrocontrôle stéroïdien s'exerçant sur les neurones à GnRH. En effet, très récemment l'équipe de Brann a montré que l'œstradiol stimulait la production de TGF β par des astrocytes hypothalamiques maintenus en culture et que ces derniers exprimaient les récepteurs ER- α et ER- β aux œstrogènes (Buchanan *et al.*, 2000). De plus, Melcangi *et al.* (2000) rapportent également que l'ARNm codant le TGF β varie au cours du cycle œstrien dans l'hypothalamus de rat avec un pic d'expression le jour du proœstrus. Des résultats similaires ont été observés chez des rates ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes.

Un autre membre de la superfamille des TGF β , l'activine, stimule la libération de GnRH *in vitro* à partir de neurones à GnRH de la lignée GT1-7 (Gonzalez-Manchon *et al.*, 1991 ; MacConell *et al.*, 1999), et de fragments d'hypothalamus (Calogero *et al.*, 1998). En parallèle, l'activine est capable de stimuler la production d'ARNm GnRH sur des lignées neuronales GT1-7 (MacConell *et al.*, 1999) et *in vivo* (Lee et Rivier, 1997). L'activine, initialement isolée dans les gonades (Meunier *et al.*, 1988), est une molécule synthétisée par

certaines populations neuronales du septum et de l'aire préoptique (Vale *et al.*, 1988 ; MacConell *et al.*, 1998). Le récepteur à l'activine Act-RII et des sites de liaison pour l'activine sont présents dans de nombreux noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la reproduction tels que l'aire préoptique et le noyau arqué (Cameron *et al.*, 1994). La présence de fibres immunoréactives pour l'activine à proximité des corps cellulaires à GnRH (Mac Conel *et al.*, 1998) et l'expression du récepteur de type I B1 au TGF β et à l'activine par les neurones à GnRH (Prevot *et al.*, 2000b), suggèrent que l'activine agirait directement sur les neurones à GnRH pour en moduler l'activité.

Ainsi, les membres de la superfamille du TGF β peuvent agir directement sur l'activité des neurones à GnRH et apparaissent ainsi comme des facteurs-clefs dans cette régulation. Cependant, l'implication de cette superfamille dans la régulation des systèmes neuronaux du noyau arqué n'est pas encore établie.

c- bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

Le bFGF, également dénommé FGF-2, est un facteur de croissance glial dont l'ARNm et la protéine sont exprimés dans le noyau arqué (Shimasaki *et al.*, 1988 ; Emoto *et al.*, 1989 ; Gonzalez *et al.*, 1994 ; Smyth *et al.*, 1997). Le bFGF agit sur sa cellule cible via un récepteur tyrosine kinase (Schlessinger et Ullrich, 1992) et est impliqué notamment dans le développement de nombreuses populations neuronales. L'expression de l'ARNm et de la protéine du récepteur au bFGF, de type bFGF-R1, a été décrite dans l'hypothalamus et plus précisément dans le noyau arqué (Gonzalez *et al.*, 1994 ; Matsuo *et al.*, 1994 ; Gonzalez *et al.*, 1995 ; Smyth *et al.*, 1997). Outre que ce facteur faciliterait la différenciation et la survie des neurones à GnRH, il stimulerait la maturation de la prohormone GnRH (Tsai *et al.*, 1995 ; Voigt *et al.*, 1996 ; Wetsel *et al.*, 1996).

d- Interleukines

Les interleukines (IL) représentent une famille de facteurs impliqués dans la médiation de la communication bidirectionnelle entre les systèmes immuns et neuroendocriniens (Besedovsky et del Rey, 1992). Ces cytokines, en plus d'être sécrétées par les macrophages au niveau périphérique, ont la particularité d'être synthétisées par le système nerveux central. Ainsi, la présence d'ARNm codant l'IL-1 ou l'IL-2 a été rapportée dans le noyau arqué (Lapchak et Araujo, 1993 ; Yabuuchi *et al.*, 1993) et les types cellulaires produisant les IL sont de nature gliale (Yabuuchi *et al.*, 1993). L'injection intracérébroventriculaire d'IL-1 induit après 30 minutes à 1h une activation du proto-oncogène *c-fos* dans le noyau arqué, tandis que l'injection de cette cytokine en intra-veineuse est sans effet (Rivest *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que seule la production d'IL produite dans le système nerveux central aurait une action au niveau du noyau arqué et non celle produite en périphérie. Des études s'intéressant à l'expression des ARNm codant le récepteur de type 1 à l'IL-1, nommé IL-1R1, et des récepteurs à l'IL-2 ont été réalisées et ont révélé leur présence dans le noyau arqué (Lapchak et Araujo, 1993 ; Yabuuchi *et al.*, 1994 ; Ericsson *et al.*, 1995). Les systèmes cibles de l'IL dans le noyau arqué semblent être principalement les catécholamines et les peptides opioïdes. En effet, l'injection intrapéritonéale d'IL-1 induit une augmentation des taux de dopamine et noradrénaline dans le noyau arqué. Par ailleurs, des études réalisées à partir de tranches d'hypothalami ont révélé que l'IL-2 produisait une diminution de la libération de noradrénaline et une augmentation de la libération de méthionine-enképhaline et β -endorphine (Lapchak et Araujo, 1993).

L'IL-1 est l'interleukine qui a été la plus étudiée en relation avec la régulation du système à GnRH. Il apparaît notamment que l'IL-1 est un système inhibiteur de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Rivier et Vale, 1990). Ainsi, l'injection

intracérébroventriculaire d'IL-1 inhibe la libération de LH chez le rat mâle castré (Rivier et Vale, 1989) et bloque la survenue du pic de LH induit par la progestérone chez des femelles ovariectomisées et supplémentées en œstrogènes (Kalra *et al.*, 1990a). L'action de l'IL-1 sur la libération de LH semble être véhiculée via une action au niveau central, c'est-à-dire via une diminution de la libération de GnRH (Kalra *et al.*, 1990a ; Rivest et Rivier, 1993). L'effet inhibiteur de l'IL-1 sur la libération de GnRH n'est observé qu'à partir de fragments incluant l'aire préoptique et l'hypothalamus médiobasal et non à partir de fragments d'hypothalamus médiobasal seuls (Kalra *et al.*, 1990a). De plus, Kalra *et al.* (1990b) observent que la naloxone inverse les effets de l'IL-1 sur la libération de GnRH suggérant que l'IL-1 induirait son inhibition sur la libération de GnRH via une stimulation du système β -endorphinergique de l'hypothalamus.

Les facteurs sécrétés par les cellules gliales hypothalamiques semblent donc jouer un rôle important dans la physiologie de régulation de nombreux systèmes neuronaux hypothalamiques dont les neurones à GnRH.

1.2.4. Leptine

La leptine est une hormone produite à partir du gène *ob* et sécrétée par le tissu adipeux (Ogawa *et al.*, 1995). L'hypothalamus, et plus précisément le noyau arqué, est l'un des sites d'action de la leptine au niveau du système nerveux central. En effet, des auteurs ont mis en évidence la présence de sites de liaison pour la leptine (Stephens *et al.*, 1995 ; Mercer *et al.*, 1996a ; Schwartz *et al.*, 1996 ; Corp *et al.*, 1998) et d'ARNm codant le récepteur à la leptine (Ob-R) dans le noyau arqué (Mercer *et al.*, 1996a ; Bennett *et al.*, 1998 ; De Matteis et Cinti, 1998 ; Diano *et al.*, 1998 ; Shioda *et al.*, 1998). De plus, l'injection périphérique de ce polypeptide de 166 acides aminés induit l'expression du proto-oncogène *c-fos* (témoin

d'activation neuronale) dans le noyau arqué (Woods et Stock, 1996 ; Luckman *et al.*, 1999 ; Elias *et al.*, 2000). Par la suite deux principaux systèmes cibles de la leptine ont été caractérisés dans le noyau arqué : les neurones synthétisant le NPY et ceux exprimant la POMC (Mercer *et al.*, 1996b ; Schwartz *et al.*, 1997 ; Cheung *et al.*, 1997 ; Hakansson *et al.*, 1998 ; Elias *et al.*, 1999 ; Baskin *et al.*, 1999). Initialement, la leptine a été considérée comme une molécule impliquée dans le statut nutritionnel de l'individu. En effet, l'injection de leptine provoque une diminution de la prise alimentaire et une augmentation des dépenses énergétiques (Meister, 2000). Mais très rapidement, étant donné que des troubles de l'équilibre nutritionnel produisent des altérations de l'axe reproducteur (Bray, 1997), cette hormone a été impliquée dans la régulation du système à GnRH. Ainsi, la leptine est considérée comme un activateur métabolique du système à GnRH. En 1997, le groupe de McCann montre que la leptine module la fonction hypothalamo-hypophysaire, en agissant au niveau de l'hypothalamus médiobasal en stimulant la sécrétion de GnRH (Yu *et al.*, 1997). La leptine serait également un signal déclencheur de la puberté (Ahima *et al.*, 1997). Nous noterons cependant qu'à fortes doses, la leptine inhibe la sécrétion de GnRH (Yu *et al.*, 1997). Enfin, les stéroïdes gonadiques semblent pouvoir moduler directement l'expression des récepteurs à la leptine dans l'hypothalamus puisqu'une coexpression du récepteur à la leptine et du récepteur aux œstrogènes a été observée dans l'aire préoptique et le noyau arqué (Diano *et al.*, 1998) et l'administration d'œstrogènes à des femelles ovariectomisées induit une diminution des taux d'ARNm codant le récepteur à la leptine dans le noyau arqué (Bennett *et al.*, 1998).

I.3. Conclusion

Il apparaît par conséquent que le noyau arqué est un noyau doté d'un haut niveau de complexité en terme d'organisation interne et de connectivité. Le noyau arqué est l'une des

Tableau 1. Effets directs ou indirects des différents facteurs hypothalamiques sur le système à GnRH. +, effet stimulateur ; -, effet inhibiteur ; ND, non déterminé. TN, expression exclusivement dans les terminaisons nerveuses. GT1, études réalisées exclusivement sur la lignée neuronale GT1.

Facteur	Appositions / Contacts	Présence de récepteurs ?	Action sur l'expression de l'ARNm codant la GnRH	Action sur la libération de GnRH
NPY	Oui	Y1 (TN)	+	+
Galanine	Oui	GalR1	ND	+
GALP	ND	ND	+(observations personnelles)	ND
AGRP	ND	ND	ND	+
Glutamate/Aspartate	Oui	NMDA-R1, NMDA-R2, KA2	+	+
Dopamine	Oui	D1-R (GT1)	+	+
NO	étroite association morphologique		+/- (selon les auteurs)	+
Activine	Oui	B1	+	+
TGF α	ND	Non	ND	+
TGF β	ND	B1	-	+
Leptine	ND	OB-R (GT1)	sans effet (GT1)	+
Neurotensine	ND	ND	ND	+/- (selon l'état stéroïdien)
Substance P	Oui	ND	ND	+/- (selon l'état stéroïdien)
GABA	Oui	GABA _A	-	+/- (selon la dose)
β -endorphine	Oui	Non	-	-
Enképhalines	Oui	Non	ND	-
Dynorphine	Oui	Non	ND	-
α -MSH	ND	ND	ND	-
GnRH	Oui	ND	-	-
Interleukines	ND	ND	-	-

cibles privilégiées des stéroïdes gonadiques et par ailleurs il renferme les cellules synthétisant les principaux facteurs neuronaux régulant l'activité des neurones à GnRH. Le tableau 1 étudie la possibilité d'action directe ou indirecte, et les effets connus de ces facteurs sur les neurones à GnRH. Ainsi, au sein du noyau arqué, les neurones à POMC (β -endorphine) sont l'un des principaux systèmes inhibiteurs et les neurones synthétisant le NPY constituent l'un des principaux systèmes stimulateurs sur le système à GnRH. Il ressort également de notre travail de synthèse, qu'au sein du noyau arqué, d'autres facteurs neuronaux généralement synthétisés par des interneurones (GABA, la galanine, le glutamate, ...) sont impliqués localement dans la régulation des neurones du noyau arqué. Enfin, nous voyons également émerger dans la régulation de l'axe à GnRH l'implication de facteurs gliaux qui eux aussi se retrouvent dans le noyau arqué. Ce noyau apparaît donc comme une région privilégiée de la régulation du système à GnRH.

Lors de notre travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux régulations qui pouvaient s'opérer sur le système à POMC du noyau arqué. Le chapitre suivant a précisément pour but de déterminer l'état actuel des connaissances sur ce système.

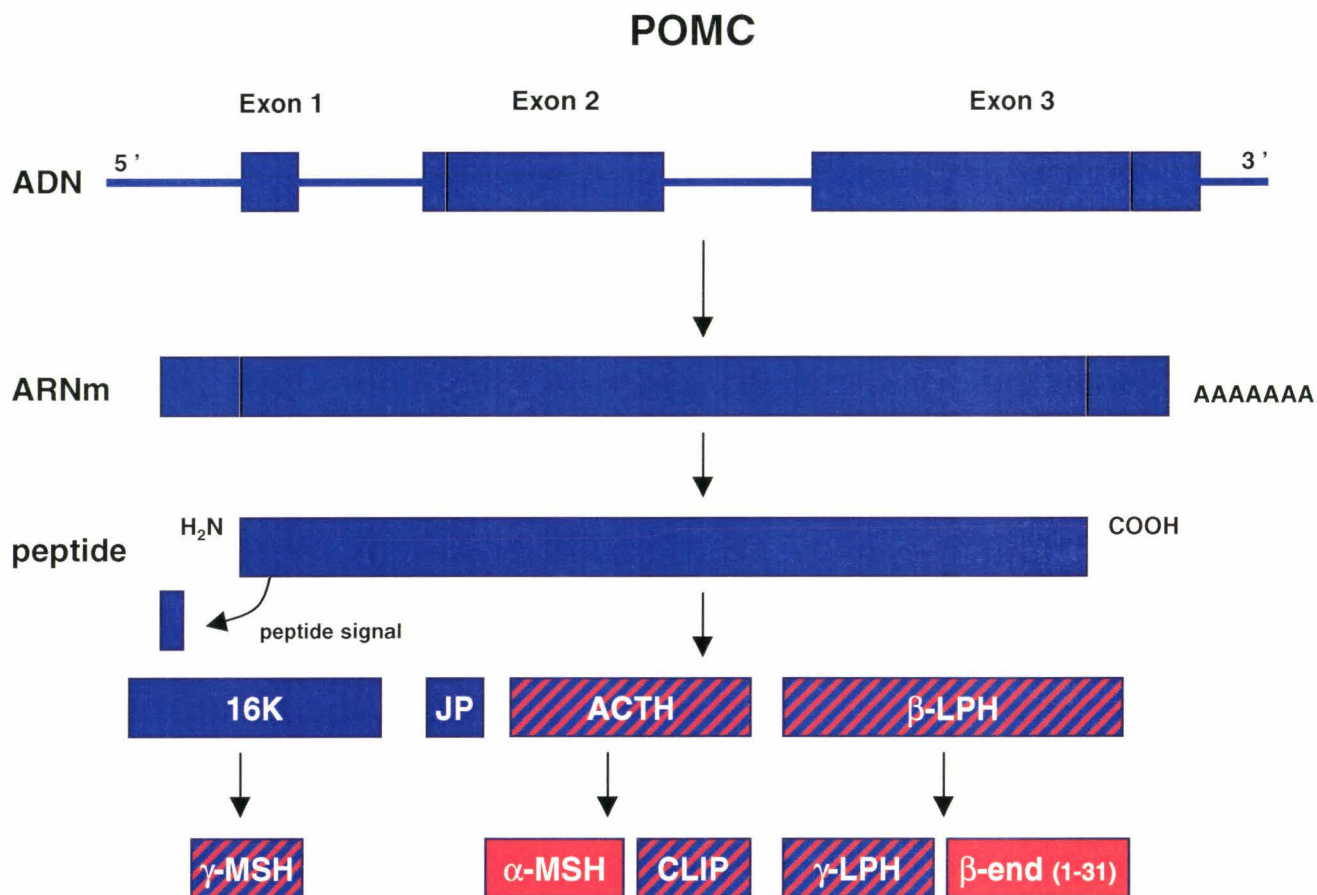


Figure 4. Représentation schématique du gène de la proopiomélanocortine (POMC) et des divers peptides issus de la maturation post-traductionnelle de son peptide précurseur. Les facteurs représentés en rouges sont ceux dont l'expression est prédominante dans le noyau arqué (hachuré, expression relative).

II. Etat des connaissances sur le système à POMC

II.1. Anatomie et caractéristiques fonctionnelles du système à POMC

Etant donné que la β -endorphine est le peptide dérivé de la POMC le plus impliqué dans la régulation du système à GnRH, nous nous sommes intéressés principalement à ce peptide.

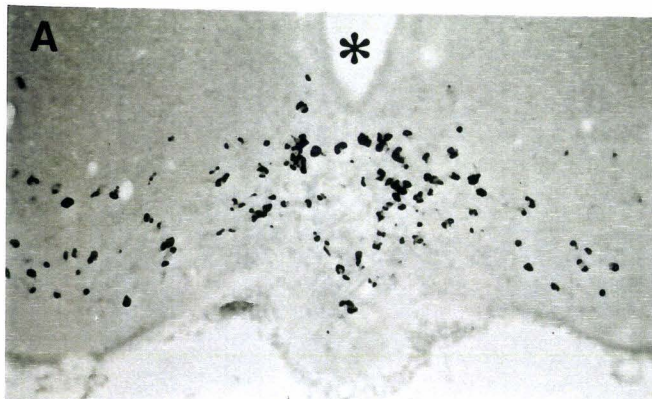
a- Anatomie

En 1976, la β -endorphine est isolée et caractérisée indépendamment par deux laboratoires (Bradbury *et al.*, 1976a ; Li *et al.*, 1976). Bradbury est le premier à découvrir que ce peptide de 31 acides aminés est exprimé dans le cerveau (Bradbury *et al.*, 1976a). Les auteurs ont ensuite découvert que ce peptide avait la capacité de se fixer à haute affinité sur les récepteurs aux opioïdes (*e.g.* μ_1) et ont ainsi émis l'hypothèse que la β -endorphine jouerait un rôle physiologique majeur dans le cerveau et notamment pourrait être le peptide endogène reflétant les phénomènes associés à l'administration de morphine (Bradbury *et al.*, 1976a, 1976b ; Li *et al.*, 1976 ; Ferrara *et al.*, 1979). Par la suite, il a été montré que la β -endorphine, mais aussi l'ACTH, l' α - et la β -MSH, l' α -endorphine et la β -lipotropine, dérivait d'un précurseur commun de 31 kilodaltons, nommé proopiomélanocortine ou POMC (Figure 4) (Mains *et al.*, 1977 ; Liotta *et al.*, 1979 ; Hope *et al.*, 1981). La plupart des péricaryons du système à POMC du système nerveux central est localisée dans le noyau arqué (Jacobowitz et O'Donohue, 1978 ; O'Donohue *et al.*, 1979a, 1979b, 1982 ; Finley *et al.*, 1981a ; Mezey *et al.*, 1985). Le nombre estimé de neurones synthétisant l'ARNm codant la POMC dans le noyau arqué de rat est d'environ 10 000 (Gee *et al.*, 1983). Les neurones à POMC sont polygonaux, avec un diamètre de 10 à 15 μ m, et pour la plupart localisés dans la partie ventrolatérale du noyau (Figure 5). Quelques neurones à POMC sont également localisés au niveau de la zone sous-épendymaire de l'éminence médiane. A noter que les deux principaux

produits de clivages de la POMC dans le noyau arqué (*i.e.* la β -endorphine et l' α -MSH) sont coexprimés dans les mêmes neurones. Les fibres et terminaisons nerveuses à β -endorphine sont distribuées dans de nombreuses régions cérébrales et principalement dans les régions septo-préoptiques (Finley *et al.*, 1981a).

Par ailleurs, de fortes concentrations de β -endorphine ont été observées dans le sang porte hypophysaire (Lissitzky *et al.*, 1980 ; Sarkar et Yen, 1985 ; Sarkar et Minami, 1995). Cependant des éléments laissent planer le doute quant à l'origine de cette β -endorphine rencontrée dans le sang porte. En effet, au niveau de l'éminence médiane, de rares fibres à β -endorphine sont retrouvées dans la zone interne (Hisano *et al.*, 1982), zone éloignée des capillaires du système porte hypophysaire, et non dans la zone externe (Ibata *et al.*, 1985). L'hypothèse initialement émise était que la β -endorphine présente dans le sang porte hypophysaire provenait d'une circulation de sang rétrograde de l'hypophyse (organe synthétisant également la β -endorphine dans sa partie intermédiaire) vers le cerveau (Oliver *et al.*, 1977 ; Bergland et Page, 1978). Cependant des travaux ont déterminé que la β -endorphine sécrétée dans le sang porte hypophysaire aurait pour origine l'hypothalamus médiobasal. Tout d'abord, Sarkar et Yen (1985) observent que la β -endorphine est toujours présente dans le sang porte même après hypophysectomie ; ensuite, le profil chromatographique des extraits d'hypothalamus médiobasaux et de sang porte est similaire ; enfin, Cheung et Hammer (1997a) en injectant du fluorogold par voie intra-péritonéale observent que 7% des neurones à β -endorphine du noyau arqué accumulent ce traceur rétrograde. Cette dernière observation signifierait qu'un faible nombre de neurones à β -endorphine du noyau arqué pourraient se projeter dans l'éminence médiane et rentrer au contact des capillaires probablement via des anses intrainfundibulaires longues du système porte.

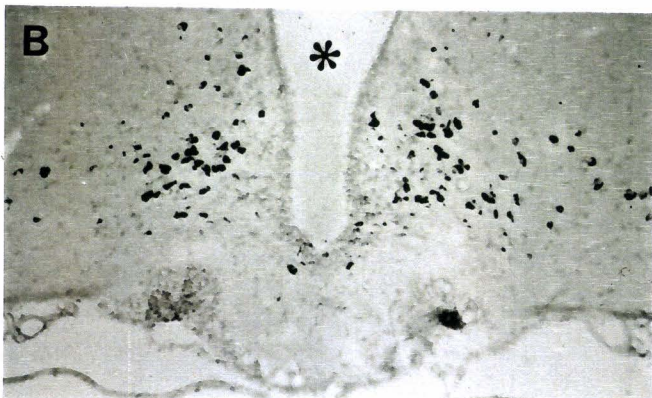
POMC/ARC antérieur



Projection vers l'aire
préoptique : 54%

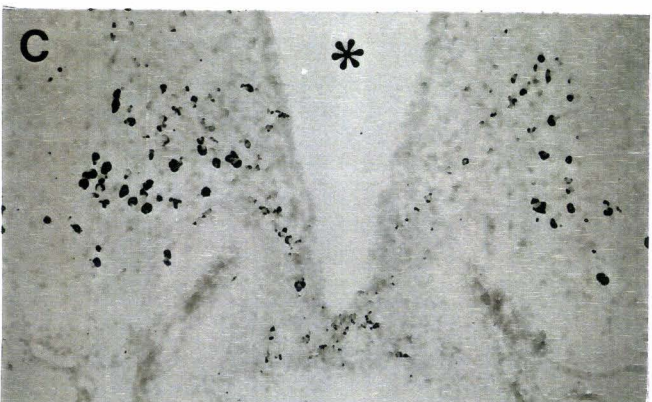
Œstrogènes et Testostérone
dépendants

Impliqués dans la puberté



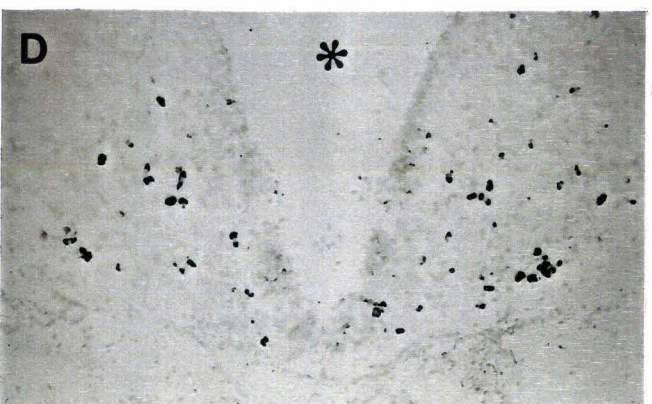
Projection vers l'aire
préoptique : 23%

Œstrogènes et Testostérone
dépendants



Projection vers l'aire
préoptique : 16%

Œstrogènes dépendants



Projection vers l'aire
préoptique : 7%

POMC/ARC postérieur

Figure 5. Principales caractéristiques physiologiques et fonctionnelles des neurones à POMC selon leur localisation dans le plan antéro-postérieur du noyau arqué (A, région la plus antérieure ; B, région la plus postérieure du noyau).

Ainsi l'ensemble de ces données nous permet de penser que la β -endorphine retrouvée dans le sang porte hypophysaire aurait pour origine les neurones à POMC du noyau arqué.

b- Hétérogénéité des neurones à POMC

L'analyse des études réalisées sur le système à POMC laisse apparaître clairement l'existence d'une hétérogénéité des neurones à POMC en terme de leurs projections vers d'autres régions cérébrales dont l'aire préoptique et leurs sensibilités à différents systèmes régulateurs et en particulier les stéroïdes gonadiques. Cette hétérogénéité dépend principalement de leur localisation selon le plan antéro-postérieur dans le noyau arqué (Figure 5). Pour les projections, Cheung et Hammer (1995a), grâce à l'injection de fluorogold dans l'aire préoptique, ont révélé que dans le noyau arqué antérieur, une plus forte proportion de neurones à POMC se projetaient vers l'aire préoptique (54%). En ce qui concerne la physiologie de régulation du système à POMC, les neurones à POMC sont absents dans la région la plus antérieure du noyau arqué chez les femelles prépubères et apparaissent au moment de la survenue de la puberté (Mann *et al.*, 1999). Ce phénomène semble corrélé à une augmentation de l'expression de l'ARNm POMC au moment de la puberté exclusivement dans le noyau arqué antérieur (Wiemann *et al.*, 1989). Par ailleurs, les stéroïdes gonadiques (œstrogènes, testostérone) apparaissent moduler l'expression de l'ARNm POMC uniquement dans le noyau arqué antérieur (Chowen-Breed *et al.*, 1989b ; Chowen *et al.*, 1990 ; Tong *et al.*, 1990 ; Cheung et Hammer, 1995a). Il est également très intéressant de noter qu'un déclin de l'expression de l'ARNm POMC est observé dans le noyau arqué antérieur peu avant la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH (Bohler *et al.*, 1991).

Ainsi les neurones à POMC localisés dans le noyau arqué antérieur semblent participer activement à la régulation du système à GnRH.

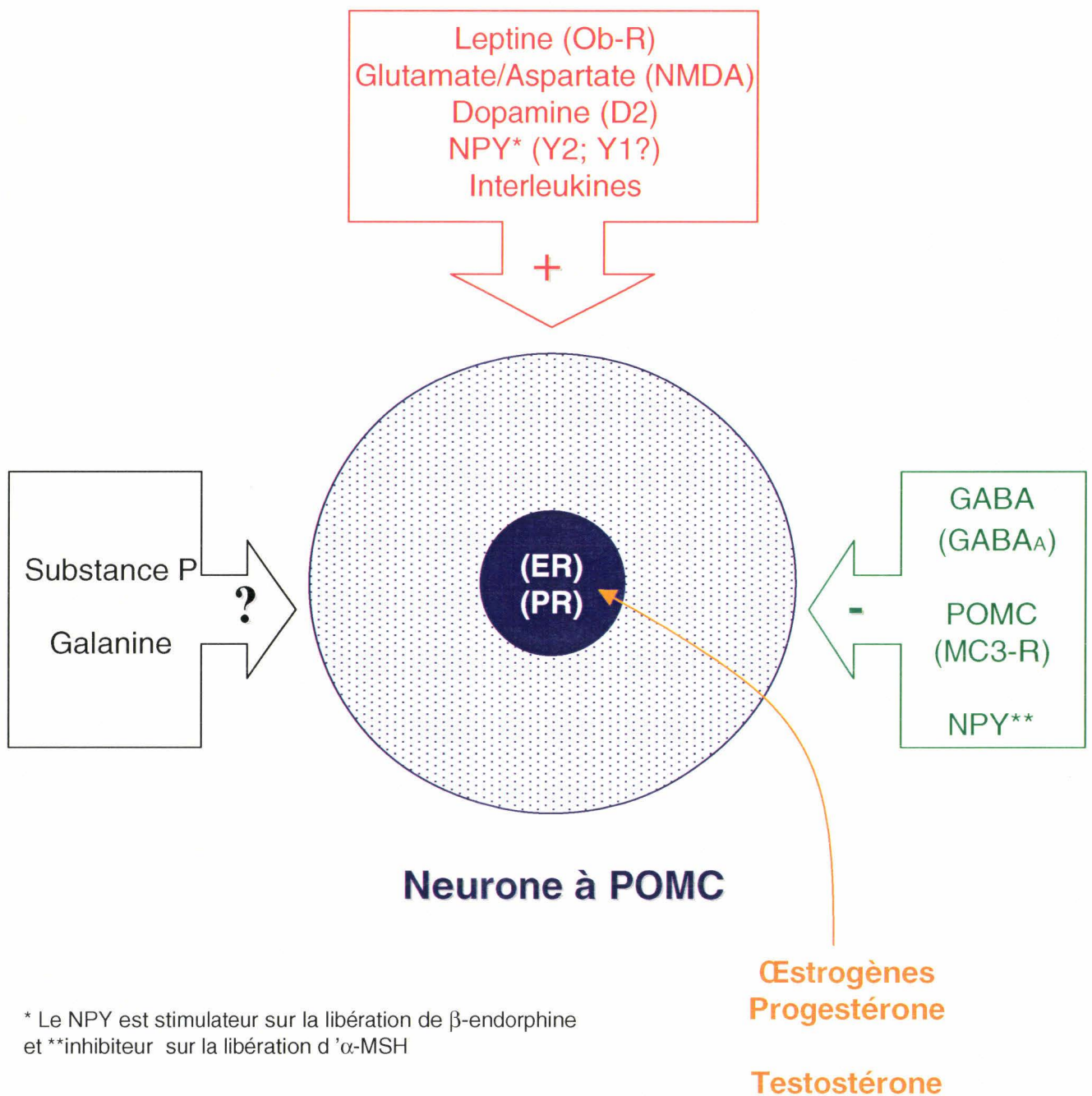


Figure 6. Principaux facteurs modulant l'activité des neurones à POMC.

Les facteurs stimulateurs et inhibiteurs sont, respectivement, indiqués en rouge et en vert. Les facteurs indiqués en noir sont ceux dont la nature de l'action n'est pas encore connue. Les récepteurs activés sont indiqués entre parenthèses.

c- L'activité des neurones à POMC est circadienne et cyclique

L'activité des neurones à POMC présente un cycle circadien. Les niveaux les plus bas d'ARNm codant la POMC (Steiner *et al.*, 1994) et de β -endorphine (Kerdelhué *et al.*, 1983) sont observés en soirée. Il a par ailleurs été observé une induction nocturne du proto-oncogène *c-fos* dans l'hypothalamus médiobasal, induction restreinte aux neurones à POMC (Jamali et Tramu, 1997, 1999). Les stéroïdes gonadiques semblent participer de façon active à ce rythme circadien : les niveaux d'ARNm POMC restent faibles et constants chez les mâles orchidectomisés (Steiner *et al.*, 1994) ou les femelles ovariectomisées (Wise *et al.*, 1990).

Sarkar et ses collaborateurs (1985, 1995) montrent que la sécrétion de β -endorphine dans le sang porte est pulsatile et cyclique avec des niveaux de β -endorphine dans le sang porte hypophysaire au plus bas l'après-midi du proœstrus, jour du pic préovulatoire de GnRH/LH. Ces auteurs mettent également en évidence l'existence d'une corrélation inverse entre les taux de GnRH et les taux de β -endorphine mesurés dans la circulation porte (Sarkar et Yen, 1985 ; Sarkar et Minami, 1995). En parallèle, Wise *et al.* (1990) observent que les niveaux d'ARNm codant la POMC sont au plus faible l'après-midi du proœstrus.

Ainsi, l'activité des neurones à POMC présente une activité circadienne stéroïdo-dépendante mais également une activité cyclique minimale l'après-midi du proœstrus peu avant le pic préovulatoire de GnRH.

II.2. Régulation du système à POMC

Les différents facteurs régulant le système à POMC du noyau arqué sont abordés dans ce chapitre et illustrés dans la figure 6.

II.2.1. Modulation par les stéroïdes gonadiques

a- Œstrogènes, Progestérone

De nombreuses études se sont intéressées à déterminer le rôle respectif des œstrogènes et de la progestérone sur l'activité des neurones à POMC. La notion communément admise est que les *œstrogènes* sont inhibiteurs de l'activité des neurones à POMC (Wilcox et Roberts, 1985 ; Tong *et al.*, 1990 ; Petersen *et al.*, 1993b). Notamment, les œstrogènes provoquent une diminution des taux d'ARNm POMC, chez la femelle ovariectomisée, juste avant le pic de LH induit par la progestérone (Petersen *et al.*, 1993b). Une action directe des œstrogènes sur l'activité des neurones à POMC peut être envisagée sur une faible population de neurones à POMC étant donné que 5 à 7% des neurones à β -endorphine expriment le récepteur aux œstrogènes (Morrell *et al.*, 1985 ; Jirikowski *et al.*, 1986 ; Shivers *et al.*, 1989 ; Lehman et Karsch, 1993 ; Miller *et al.*, 1995 ; Simonian *et al.*, 1999). Par ailleurs, de récents travaux de Simonian *et al.* (1999) ont montré qu'aucun neurone à β -endorphine se projetant vers l'aire préoptique exprimait le récepteur aux œstrogènes ER- α . Par conséquent, ces données suggèrent que les stéroïdes gonadiques moduleraient l'activité des neurones à POMC en empruntant principalement une voie transsynaptique. Le phénotype des neurones relais est encore indéterminé.

En ce qui concerne la *progestérone*, il ressort de la littérature qu'elle va provoquer dans un premier temps un effet inhibiteur sur l'activité des neurones à POMC (Wise *et al.*, 1990 ; Petersen *et al.*, 1993b) suivi d'un effet stimulateur à plus long terme (Cheung *et al.*, 1995b). Des études réalisées chez le rat (Fox *et al.*, 1990), le cobaye (Olster et Blaustein, 1990) et le singe (Bethea et Widmann, 1996) ont révélé que 25 à 30% des neurones à POMC exprimaient le récepteur à la progestérone suggérant un effet direct de la progestérone sur certains neurones à POMC. La non corrélation entre la proportion de neurones à POMC qui expriment le récepteur aux œstrogènes (5-7%) et celle qui exprime le récepteur à la

progestérone (25-30%) paraît surprenante étant donné que Warembourg *et al.* (1989) ont montré, chez le cobaye, que la vaste majorité des cellules immunopositives pour le récepteur à la progestérone l'étaient aussi pour le récepteur aux œstrogènes dans le noyau arqué.

b- Androgènes

Les effets de la castration sur les niveaux d'ARNm POMC dans le noyau arqué sont ambigus. Il ressort néanmoins que seule l'orchidectomie à court terme provoque des effets non controversés sur le système à POMC : 1 à 4 jours d'orchidectomie induisent une diminution des taux d'ARNm POMC corrélée avec une diminution des niveaux de β -endorphine contenus dans le noyau arqué (Chowen-Breed *et al.*, 1989a, 1989b). La testostérone, via son aromatisation en œstradiol, est le stéroïde gonadique impliqué dans cette modulation des niveaux d'ARNm associée à la castration (Chowen-Breed *et al.*, 1989a, 1989b ; Chowen *et al.*, 1990).

Ainsi, les stéroïdes gonadiques exercent un rôle complexe dans la physiologie de régulation du système à POMC. Les œstrogènes inhiberaient, principalement par voie transynaptique, l'activité des neurones à POMC afin de permettre, en association avec la progestérone, la desinhibition du système à GnRH et donc la survenue du pic de GnRH/LH. Puis, la progestérone stimulerait le système à POMC afin de mettre fin à cette sécrétion massive de GnRH/LH en début de l'œstrus. De plus, les œstrogènes apparaissent comme les principaux stéroïdes impliqués dans cette régulation à la fois chez la femelle et le mâle.

II.2.2. Facteurs non stéroïdiens impliqués dans la régulation du système à POMC

a- Peptides dérivés de la POMC

L'implication des produits de clivage de la POMC dans la régulation des neurones à POMC a été suggérée suite à l'observation de contacts synaptiques entre des terminaisons nerveuses et des corps cellulaires immunopositifs pour l'ACTH dans le noyau arqué (Chen et Pelletier, 1983 ; Kiss et Williams, 1983). Des travaux ont par la suite permis de suggérer que la β -endorphine participait à la régulation de l'activité des neurones à POMC. En effet, l'injection de morphine conduit à la diminution de l'expression de l'ARNm POMC (Bronstein *et al.*, 1990 ; Garcia de Yebennes et Pelletier, 1993 ; Wardlaw *et al.*, 1996). De plus, des études électrophysiologiques ont révélé que 82% des neurones du noyau arqué étaient inhibés par la β -endorphine (MacMillan et Clarke, 1983). Plus spécifiquement, Kelly *et al.* (1990) ont montré que l'activité électrique des neurones à POMC était modifiée en présence de β -endorphine. L'existence de récepteurs μ a par ailleurs été démontrée dans le noyau arqué (Mansour *et al.*, 1994) mais la preuve de la présence de ce récepteur dans les neurones à POMC n'avait pas, au moment où nous avons entrepris notre travail de thèse, été établie.

L'implication de l' α -MSH dans la régulation de l'activité des neurones à POMC a récemment été confirmée par le fait que les neurones à POMC du noyau arqué exprimaient l'ARNm codant le récepteur MC3-R (Bagnol *et al.*, 1999 ; Jégou *et al.*, 2000). L' α -MSH semblerait, comme la β -endorphine, avoir un effet inhibiteur sur le système à POMC puisque l'injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste du récepteur MC4, le SHU9119, induit une augmentation de l'expression de l'ARNm codant la POMC dans le noyau arqué (Raposinho *et al.*, 2000). Etant donné que les neurones à POMC n'expriment pas l'ARNm codant le récepteur MC4 (Bagnol *et al.*, 1999), le SHU9119 exercerait ses effets sur les neurones à POMC de façon indirecte. La leptine pourrait être l'un des médiateurs de cette action puisque ses concentrations plasmatiques sont augmentées après injection de SHU9119 (Raposinho *et al.*, 2000) et cette hormone exerce une action stimulatrice directe sur le système à POMC (Schwartz *et al.*, 1997 ; Cheung *et al.*, 1997b).

b- Galanine

Alors que de nombreux éléments galaninergiques sont rencontrés dans le noyau arqué, l'implication de la galanine dans la régulation de l'activité des neurones à POMC a été peu étudiée. En effet seule une étude morphologique réalisée par Horvath *et al.* (1995a), a mis en évidence la présence de connexions synaptiques, axo-somatiques et axo-dendritiques, entre les fibres à galanine et les neurones à β -endorphine. La vaste majorité (89,6%) des neurones à β -endorphine présentent des afférences galaninergiques à leur proximité (Horvath *et al.*, 1995a), suggérant que la galanine peut être l'un des régulateurs majeurs du système à POMC. La présence de nombreuses cellules exprimant l'ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 (Mitchell *et al.*, 1997b) et GalR2 (Mitchell *et al.*, 1999a) ainsi que l'observation de nombreux sites de liaison pour la galanine (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992 ; Planas *et al.*, 1994) dans le noyau arqué renforcent cette hypothèse.

c- NPY

L'implication du NPY dans la régulation de l'activité des neurones à POMC est bien documentée. Horvath *et al.* (1992b), en mettant en évidence la présence de synapses axo-somatiques et axo-dendritiques entre les fibres à NPY et les neurones à β -endorphine, suggèrent que le NPY pourrait moduler directement la sécrétion de β -endorphine. Cette hypothèse est confirmée par Broberger *et al.* (1997) qui montrent que les ARNm codant le récepteur au NPY Y1-R est exprimé par les neurones à POMC. L'action du NPY sur la libération des peptides dérivés de la POMC est complexe : l'infusion chronique de NPY diminue la libération d' α -MSH (Blasquez *et al.*, 1992, 1995) et stimule la libération de β -endorphine (Kalra *et al.*, 1995). Ainsi il semble que le NPY ait une action différentielle sur le système à POMC suivant le peptide dérivé de la POMC considéré. Aussi, Kalra *et al.* (1995) montrent également que les stéroïdes gonadiques mâles semblent jouer un rôle important dans

cette interrelation NPY/ β -endorphine. En effet, le NPY a un effet stimulateur sur la libération de β -endorphine chez des mâles castrés et non chez des mâles intacts (Kalra *et al.*, 1995). L'injection intracérébroventriculaire de NPY induit une diminution des taux d'ARNm POMC dans le noyau arqué (Garcia de Yebennes *et al.*, 1995). Cette action semble passer via le récepteur Y2 [récepteur par ailleurs exprimé dans le noyau arqué (Parker et Herzog, 1999)] puisque seul le NPY₁₃₋₃₆ (un agoniste du récepteur Y2) a un effet sur les niveaux d'ARNm codant la POMC et pas le [Leu₃₁, Pro₃₄]-NPY (agoniste du récepteur Y1) (Garcia de Yebennes *et al.*, 1995). L'implication du récepteur Y1 dans les phénomènes de libération de β -endorphine ou d' α -MSH ne peut cependant pas être exclue.

d- Glutamate et Aspartate

Des études réalisées sur des cellules hypothalamiques en culture ont montré que le glutamate stimulait la libération de β -endorphine et la production d'ARNm codant la POMC (Yang *et al.*, 1995). Ces effets semblent passer via le récepteur N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) puisque le NMDA stimule la libération de β -endorphine (Bach et Yaksh, 1995) et d' α -MSH (Wayman et Wilson, 1991, 1992 ; Wayman *et al.*, 1994). A noter que cette libération d' α -MSH induite par le NMDA est inhibée par la _{NG}-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), inhibiteur de la nitric oxide synthase (NOS), suggérant que le NO serait un médiateur de l'effet du NMDA sur la libération d' α -MSH (Wayman *et al.*, 1994). Une étude immunohistochimique a par ailleurs révélé que la quasi-totalité des neurones à β -endorphine exprimaient le récepteur métabotrope Ia (Kiss *et al.*, 1997).

e- GABA

De nombreuses preuves expérimentales ont révélé que le GABA jouait un rôle majeur dans la régulation de l'activité des neurones à POMC. Des terminaisons nerveuses

GABAergiques sont observées au contact de neurones à POMC (Horvath *et al.*, 1992a) et la majorité (60-75%) des neurones à POMC exprime le récepteur GABA_A (Blasquez *et al.*, 1994). De plus, le GABA est considéré comme un inhibiteur puissant de l'activité des neurones à POMC puisque l'administration de GABA inhibe la libération d' α -MSH (Delhente *et al.*, 1989 ; Blasquez *et al.*, 1991 ; Mabley *et al.*, 1991) et que l'administration d'agoniste du récepteur GABA_A provoque une diminution des niveaux d'expression d'ARNm POMC principalement dans les neurones localisés dans le noyau arqué caudal (Garcia de Yebenes et Pelletier, 1994). De façon intéressante, Horvath *et al.* (1992a) ont suggéré que le GABA pourrait moduler l'activité des neurones à GnRH via les neurones à POMC puisqu'ils ont mis en évidence la présence de contacts synaptiques GABAergiques sur des neurones à POMC se projetant vers l'aire préoptique. Cette hypothèse a été confirmée par Nikolarakis *et al.* (1988) montrant que l'inhibition des neurones à β -endorphine par le GABA provoquait une levée d'inhibition exercée par les opioïdes sur le système à GnRH.

f- Dopamine

Des expériences utilisant l'halopéridol (antagoniste de la dopamine) ou la pergolide (agoniste de la dopamine) ont montré que chez le rat mâle et le rat femelle la dopamine stimulait la synthèse d'ARNm codant la POMC dans l'hypothalamus médiobasal mais n'aurait pas d'effet sur les concentrations de β -endorphine ou d' α -MSH dans les tissus (Matera et Wardlaw, 1993). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les travaux de Rasmussen *et al.* (1987) rapportant que l'application de dopamine stimule la libération de β -endorphine. Certaines preuves expérimentales suggèrent que le récepteur D₂ serait impliqué dans les effets de la dopamine sur le système à POMC (Tong et Pelletier, 1992 ; Matera et Wardlaw, 1993 ; Autelitano et van de Buuse, 1997).

g- Substance P

Des évidences morphologiques suggèrent une potentielle action modulatrice de la substance P sur l'activité des neurones à POMC. En effet, les neurones à POMC sont entourés d'axones contenant la substance P (Tsuruo *et al.*, 1983). Cependant Maeno *et al.* (1993) n'ont pas observé de cellules exprimant l'ARN codant le récepteur à la substance P (de type NK-1) dans le noyau arqué.

h- Leptine

Etant donné que la POMC et la leptine sont chacune impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et la reproduction, l'hypothèse de l'existence d'une interrelation entre ces deux systèmes a été émise très tôt (Cheung *et al.*, 1997b ; Schwartz *et al.*, 1997 ; Thornton *et al.*, 1997 ; Hakansson *et al.*, 1998). Cheung *et al.* (1997b) ont mis en évidence que certains neurones à POMC avaient la capacité d'exprimer l'ARNm codant le récepteur à la leptine Ob-R. En parallèle, Schwartz *et al.* (1997) montrent que l'injection intrapéritonéale de leptine augmente les niveaux d'expression d'ARNm codant la POMC et que ceux-ci diminuent chez des animaux ob/ob, génétiquement déficients en leptine. De même, l'injection de leptine induit l'expression de *c-fos* dans les neurones à POMC (Elias *et al.*, 1999).

i- Interleukines

Lapchak et Araujo (1993) montrent que l'application d'IL-2 sur des tranches d'hypothalamus stimule la libération de β -endorphine induite par le potassium. Par ailleurs, Kalra *et al.* (1990b) ont observé que l'effet inhibiteur de l'IL-1 sur la sécrétion de GnRH s'exercerait via une action sur le système opioïdérique suggérant que l'IL-1 stimulerait la libération de β -endorphine.

II.3. Conclusion

Alors que l'action du glutamate, du GABA, de la leptine, du NPY sur le contrôle de l'activité des neurones à POMC a été détaillée dans la littérature, il ressort que très peu d'études se sont intéressées à la physiologie de la régulation des neurones à POMC par la galanine. Par ailleurs, même si la β -endorphine semble moduler l'activité des neurones à POMC, l'expression du récepteur aux opioïdes μ par les neurones à POMC n'a pas été établie. Par ailleurs, malgré l'émergence de nouveaux modes de régulations des neurones hypothalamiques par des facteurs gliaux, l'implication de ces facteurs dans la physiologie de régulation du système à POMC n'est pas encore connue.

III. Conclusion générale et objectifs

De nombreux facteurs sont exprimés dans le noyau arqué et parmi ceux-ci, une partie du système à POMC joue un rôle majeur dans la régulation du système à GnRH. C'est pourquoi, lors de notre travail de thèse, nous nous sommes principalement focalisés sur ce système neuronal à POMC en essayant de déterminer sa régulation par un facteur neuropeptidergique, la galanine, et par un facteur glial, le TGF β . De plus, étant donné l'implication des neurones à POMC localisés dans la partie antérieure du noyau arqué dans la régulation du système à GnRH, nous nous sommes efforcés, dans nos travaux, de régionaliser le noyau arqué en quatre subdivisions antéro-postérieures.

Le **premier aspect de notre thèse** concerne l'étude de la régulation de l'activité des neurones à POMC par la galanine, neuropeptide jouant un rôle crucial sur l'activité des neurones à GnRH. Notre objectif a été double : 1) déterminer si les neurones à POMC sont cibles d'une action directe de la galanine et étudier l'influence des stéroïdes gonadiques sur

cette action et 2) déterminer la nature de l'action exercée par la galanine sur l'activité des neurones à POMC.

Ensuite, alors que de nombreuses études se sont intéressées à la régulation du système à POMC par la β -endorphine, la preuve d'une action directe de cette dernière sur les neurones à POMC demeure encore inconnue. Ainsi l'objectif de ce **deuxième aspect de notre thèse** a été de déterminer si les neurones à POMC avaient la capacité d'exprimer le récepteur le plus sélectif de la β -endorphine, le récepteur μ .

Le **troisième objectif** a été de s'intéresser à la possible régulation de l'activité des neurones à POMC par des facteurs gliaux tels que le TGF β . En effet, alors que l'existence d'une communication entre les cellules gliales et les neurones est admise pour le système à GnRH, la possible existence d'une telle interrelation pour les neurones à POMC demeure inconnue. Ainsi, notre objectif a été de déterminer 1) si les neurones à POMC pouvaient être la cible directe du TGF β , 2) d'examiner l'influence des stéroïdes gonadiques sur cette interrelation TGF β /POMC et enfin 3) de préciser la nature de l'action exercée par le TGF β sur l'activité des neurones à POMC.

Enfin, comme les données actuelles de la littérature semblent en faveur d'une action indirecte de la β -endorphine sur les neurones à GnRH, notre **quatrième objectif** a été de caractériser, au niveau de l'aire préoptique, l'un des intermédiaires par lequel la β -endorphine pouvait exercer son action sur le système à GnRH. Ainsi, notre objectif a été de déterminer si les neurones synthétisant le monoxyde d'azote pouvaient être l'un des médiateurs de l'action de la β -endorphine sur le système à GnRH.

RESULTATS

Article 1

" Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus : effect of testosterone "

S. Bouret, V. Prevot, D. Croix, A.D. Howard, E. Habert-Ortoli, S. Jégou, H. Vaudry, J.C. Beauvillain, V. Mitchell

Endocrinology 2000 Vol. 141, N°5, pp. 1780-1794

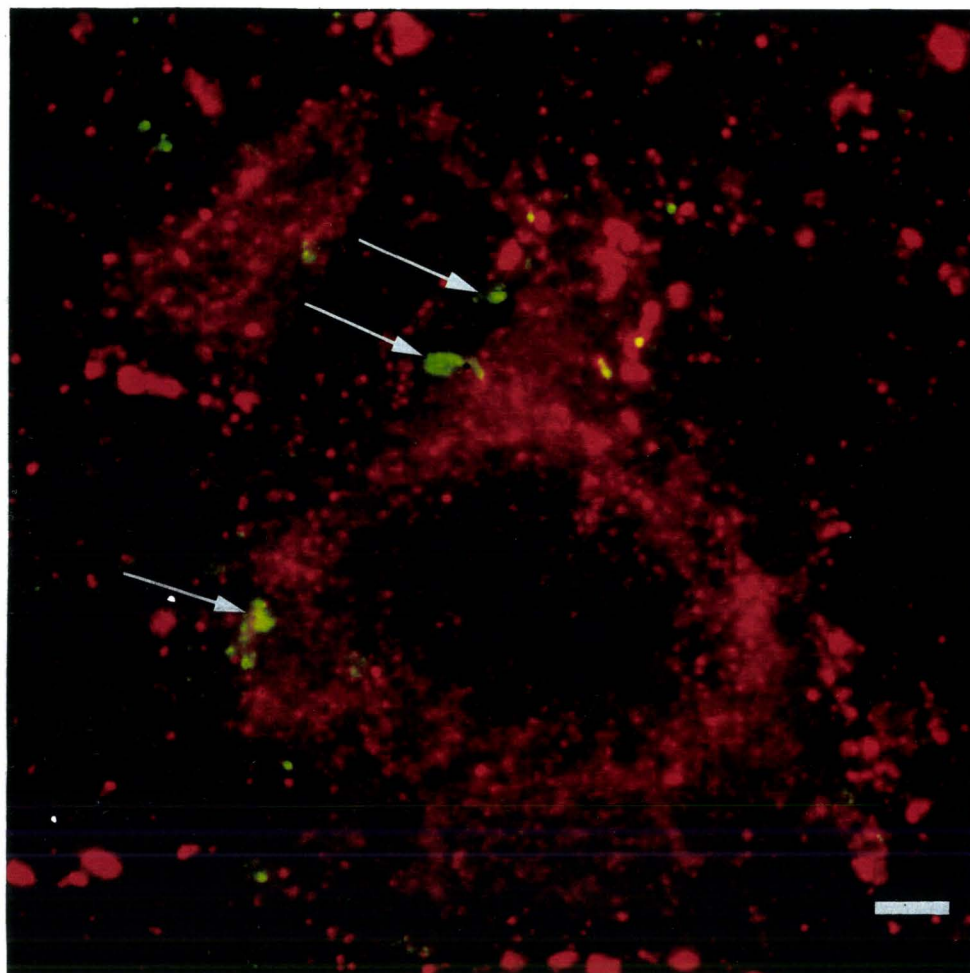


Figure 7. Microphotographie en microscopie confocale d'une section de noyau arqué de rat montrant un péricaryon immunomarcqué à la β -endorphine (fluorescence rouge) entouré d'éléments galaninergiques (fluorescence verte) à son proche voisinage (flèches blanches). Barre d'échelle, 3 μ m.

I. Etude des interactions entre la galanine et les neurones à POMC

I.1. Expression des ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2 par les neurones à POMC : effet de la testostérone

Notre premier objectif a été d'étudier l'éventualité d'une action directe de la galanine sur les neurones à POMC. Une telle éventualité était envisageable puisqu'une importante population de neurones à galanine -dont les fibres proviendraient de neurones locaux (Skofitsch et Jacobowitz, 1985 ; Horvath *et al.*, 1995a)- est présente dans le noyau arqué (Melander *et al.*, 1986) et que des contacts synaptiques axo-somatiques et axo-dendritiques sont observés entre la galanine et les neurones à β -endorphine (Figure 7) (Horvath *et al.* 1995a). Parallèlement, le clonage de deux récepteurs de la galanine, le GalR1 (Habert-Ortoli *et al.*, 1994 ; Burgevin *et al.*, 1995 ; Parker *et al.*, 1995) et le GalR2 (Fathi *et al.*, 1997 ; Howard *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997 ; Bloomquist, 1998 ; Kolakowsky *et al.*, 1998 ; Pang *et al.*, 1998) a permis d'étudier la localisation précise de l'expression de leur ARNm dans le cerveau et de montrer que les ARNm codant ces récepteurs étaient largement exprimés dans la plupart des régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du système à GnRH, en particulier dans le noyau arqué (Mitchell *et al.*, 1997b, 1999a).

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les neurones à POMC pouvaient exprimer les ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2 et donc par ce biais, démontrer que les synapses réalisées par les fibres galaninergiques sur les neurones à POMC étaient fonctionnelles. Nous avons ainsi entrepris l'étude de l'expression de l'ARNm codant le GalR1 ou le GalR2 dans les neurones à POMC par un double marquage par hybridation *in situ*. A cet effet, les ARNm antisens du GalR1 ou du GalR2 ont été marqués lors de leur transcription par l'incorporation de bases marquées au ^{35}S -, alors que

l'ARNm antisens de la POMC, l'a été par incorporation de bases marquées à la digoxigénine. Les sondes marquées à la digoxigénine ont été révélées à l'aide d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline et d'une réaction colorimétrique ; les sondes radiomarquées sont visualisées après dépôt d'une émulsion photographique.

Etant donné que l'activité des neurones à POMC est régulée par la testostérone (Chowen-Breed *et al.*, 1989a, 1989b), dans un deuxième temps, nous avons déterminé si l'expression de l'ARNm codant le GalR1 ou le GalR2 dans les neurones à POMC était stéroïdo-dépendante. Ainsi nous avons quantifié, par analyse d'images, l'expression des taux relatifs d'ARNm codant le GalR1 ou le GalR2 dans les neurones à POMC chez des mâles intacts, orchidectomisés, et orchidectomisés et supplémentés en testostérone. Etant donné l'hétérogénéité des neurones à POMC, le noyau arqué a été subdivisé en quatre régions antéro-postérieures précédemment décrites (confère chapitre II.1., section b). Par ailleurs, l'état physiologique de chaque animal sacrifié a été vérifié par dosage radioimmunologique (RIA) de testostérone plasmatique. Au total 12 animaux ont été étudiés.

Expression of GalR1 and GalR2 Galanin Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Proopiomelanocortin Neurons of the Rat Arcuate Nucleus: Effect of Testosterone*

SEBASTIEN BOURET, VINCENT PREVOT, DOMINIQUE CROIX,
ANDREW HOWARD, ESTELLE HABERT-ORTOLI, SYLVIE JEGOU,
HUBERT VAUDRY, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN, AND VALERIE MITCHELL

INSERM U422, Institut Fédératif de Recherches 22, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale (S.B., V.P., D.C., J.-C.B., V.M.), Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France; Merck Research Laboratories (A.H.), Rahway, New Jersey 07065; Rhône-Poulenc Rorer, Inc. (E.H.-O.), 94400 Vitry, France; and INSERM U413, IFRMP 23, Université de Rouen (S.J., H.V.), 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

ABSTRACT

Previous studies have shown that galanin-containing fibers make synaptic contacts with POMC neurons in the arcuate nucleus. However, the ability of POMC neurons to express galanin receptors has never been assessed. The present study was designed to investigate whether POMC neurons express galanin receptor messenger RNA (mRNA) and whether testosterone could modulate galanin receptor gene expression. A dual-labeling *in situ* hybridization histochemistry, using ³⁵S-labeled (galanin receptors GalR1 or GalR2) and digoxigenin-labeled (POMC) riboprobes, was performed on brain sections from intact, castrated, and testosterone-replaced adult male rats. For analysis, the arcuate nucleus was divided into four rostro-caudal areas. The results revealed that both GalR1 and GalR2 mRNAs were expressed in POMC neurons.

Most POMC neurons expressing galanin receptor mRNAs were found in the rostral parts of the nucleus. Castration reduced the labeling density of galanin receptor mRNAs in POMC neurons, and testosterone prevented the effects of castration in all rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus. Taken together, these data indicate that galanin can directly modulate the activity of POMC neurons, via an action on GalR1 or GalR2 receptors, particularly in the rostral-arcuate nucleus. In addition, testosterone can modulate the expression of GalR1 and GalR2. Because POMC neurons located in the rostral part of the nucleus are known to project preferentially to the preoptic area, POMC neurons expressing the galanin receptor genes may play an important role in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis. (*Endocrinology* 141: 1780–1794, 2000)

POMC IS THE precursor molecule for the opioid peptide β -endorphin, as well as for several other bioactive peptides (including α -MSH and ACTH). The prominent group of POMC neurons, located in the arcuate nucleus of rat hypothalamus (1), send projections to multiple brain regions. In particular, numerous POMC-containing fibers innervate the preoptic area (2) where GnRH cell bodies are located. Several lines of evidence indicate that β -endorphin and α -MSH are implicated in the regulation of reproduction and feeding behavior (3–5) and that the opioid system, notably β -endorphin, exerts a tonic inhibitory influence on gonadotropin release (4, 6). Previous studies have demonstrated that the activity of POMC neurons is under the influence of various factors, including gonadal steroids (2, 7–9), leptin (10, 11), and neuropeptides (4). The neuropeptide galanin, which is involved in the control of pituitary functions and feeding

behavior (4, 12), may play a pivotal role in the regulation of POMC neurons, because synaptic connections between galanin-immunoreactive fibers and β -endorphin-containing perikarya and dendrites have been observed in the arcuate nucleus (13). However, the existence of morpho-functional interactions between galanin and POMC neurons depends on the possibility that POMC neurons express galanin receptors. Two types of galanin receptors, the GalR1 (14, 15) and the GalR2 (16–18), are expressed in the brain. A third subtype of galanin receptor, named GalR3, has recently been cloned (19–21); but it is not clear whether this receptor is expressed in the brain. In contrast, the GalR1 and GalR2 galanin receptors are clearly expressed throughout the arcuate nucleus (22–24); and their distribution pattern exhibits similarities with that of the POMC neurons.

The primary objective of the present study was to determine whether POMC neurons of the arcuate nucleus express GalR1 and GalR2 messenger RNAs (mRNAs). Because the expression of POMC mRNA is controlled by gonadal steroids (2, 7–9) and because gonadal steroids enhance galanin binding in several hypothalamic nuclei (25), we have also investigated the possible effects of testosterone replacement on the expression of GalR1 or GalR2 mRNA in POMC neurons. Using a dual-labeling *in situ* hybridization technique,

Received September 24, 1999.

Address all correspondence and requests for reprints to: Sebastien Bouret, INSERM U422, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. E-mail: bouret@biserte.lille.inserm.fr.

* This work was supported by the Lille-Amiero-Rouen-Caen Neuroscience Network and the University of Lille 2.

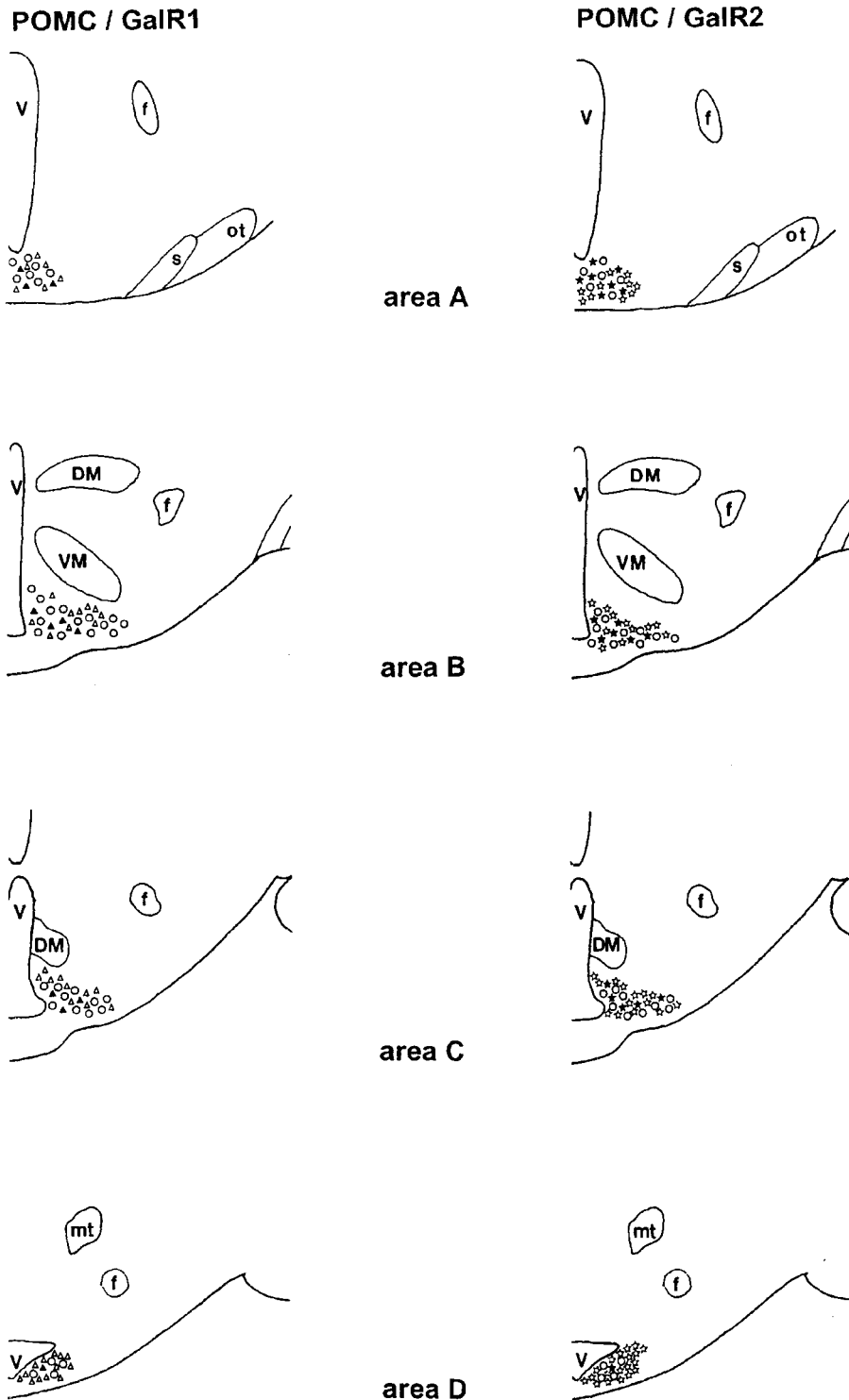


FIG. 1. Schematic drawings depicting the distribution of cells expressing GalR1 mRNA (left panels, open triangles) and GalR2 mRNA (right panels, open stars), POMC mRNA (circles), POMC and GalR1 (solid triangles), or POMC and GalR2 (solid stars) mRNAs, in the four rostro-caudal subdivisions (A–D) of the arcuate nucleus. A is the most rostral, and D is the most caudal subdivision of the nucleus. Each symbol represents two galanin receptor mRNA-expressing cells or two POMC mRNA-expressing cells. f, Fornix; ot, optic tract; s, supraoptic decussation; mt, mammillothalamic tract; V, third ventricle; VM, ventromedial nucleus.

we report that some POMC neurons can express GalR1 or GalR2 mRNA. We also show that testosterone modulates the expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor mRNAs in POMC neurons.

Materials and Methods

Animals and tissue preparation

Adult male Wistar rats (300–350 g; CERJ, Saint-Berthevin, France) were maintained on a 14-h light, 10-h dark cycle (lights on at 0500 h), with food and water available *ad libitum*. The animals were castrated ($n = 10$) or sham-operated ($n = 5$) under ether anesthesia. Immediately after castration, animals received sc a 30-mm SILASTIC brand (Dow Corning, Midland, MI) capsule (id, 1.57 mm; od, 3.18 mm; Harvard Apparatus, Les Ulis, France) that was either empty ($n = 5$) or filled with crystalline testosterone ($n = 5$). These capsules were prepared as previously described (26) and were soaked for 3 days in phosphate buffer (solutions were changed twice daily). Four days after surgery, animals were anesthetized with ketamine (20 mg/kg) and xylazine (0.2 ml/kg). Blood was collected and plasma was stored at -20°C for testosterone RIA. Animals were perfused intracardially with 5–10 ml saline, followed by 500 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The brains were removed and immersed in the same fixative for 2 h. The tissues were washed overnight in 0.05 M Coons veronal buffer (pH 7.4) containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, CA), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14- μm coronal sections were collected from the level of -1.8 to -4.8 mm, relative to Bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (27). The sections were mounted onto gelatin-coated slides and stored at -80°C until used for *in situ* hybridization. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/European Economic Community), regarding mammalian research.

Serum testosterone assay

Testosterone was measured in plasma using an RIA kit (SORIN Biomedica, Antony, France). The sensitivity of the assay was 2 pg/tube, and the intraassay coefficient of variation was 6.5%. All samples were analyzed within the same assay.

³⁵S-Labeled GalR1 and GalR2 receptor complementary RNA probes

The plasmid vector pBluescript IISK containing a HindIII/BamHI fragment of 1600 bp of the full-length rat GalR1 receptor (15) and a pCDNA3 vector containing a HindIII/NotI fragment of 1900 bp isolated from a rat hypothalamic cDNA (complementary DNA) library and containing the full-length GalR2 receptor region (16) were used. BamHI and T7 made the antisense probe, and HindIII with T3 RNA polymerase produced the sense probe for GalR1. NotI plus T7 made the GalR2 antisense probe, and HindIII with Sp6 RNA polymerase produced the sense probe. The radioactive probes were generated by labeling with 200 μCi of [³⁵S]cytidine 5'-triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech, Les Ulis, France) using 1 μl of the appropriate RNA polymerase in a 40- μl transcription reaction volume containing 8 μl of 5 \times transcription buffer, 2 μl of 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 μg linearized plasmid (50 ng/ml), 1 μl *Escherichia coli* transfer RNA (5 mg/ml), 20 U of RNasin, and 1 μl of a 10-mM stock solution of ATP, GTP, and uridine 5'-triphosphate. The transcription reagents were incubated for 4 h at 39 $^{\circ}\text{C}$. Labeled probes were extracted with phenol-chloroform and separated from nonincorporated nucleotides on a Sephadex-G50 column. The ³⁵S-labeled riboprobes were diluted with hybridization buffer to a final concentration of 30,000 dpm/ μl .

Digoxigenin-labeled complementary RNA POMC probe

A 409-bp DNA fragment (position 221–629 bp of the POMC gene exon III) was amplified by PCR from the rat POMC gene subcloned in pBR322 (provided by Dr. J. Drouin, Montréal, Canada). The PCR fragment was subcloned into the vector pCR6II. HindIII and T7 made the antisense probe, and XhoI with Sp6 polymerase produced the sense

probe for POMC. The riboprobes were synthesized *in vitro* with 1 μg linearized POMC cDNA, 1 \times digoxigenin RNA labeling mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France), RNA polymerase, and 1 \times transcription buffer. The mixture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Residual DNA was digested with deoxyribonuclease. The probes were diluted 1:1000 with hybridization buffer for dual-labeling *in situ* hybridization.

Dual-labeling in situ hybridization

Sections were removed from storage at -80°C and placed into 0.1 M glycine-0.2 M Tris-HCl (pH 7.4) for 10 min before treatment with proteinase K (1 mg/ml in 100 mM Tris [pH 8.0] and 50 mM EDTA) for 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Slides were then immersed in 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer for 15 min and treated with 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) for 10 min, followed with 0.25% acetic anhydride for 10 min. The sections were dehydrated in graded concentrations of ethanol and hybridized in a 55- $^{\circ}\text{C}$ oven overnight in diluted probes/hybridization buffer containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1 \times Denhardt's solution, 0.5 mg/ml *Escherichia coli* transfer RNA, 100 mM DTT, and 1% salmon sperm DNA. Four sets of two adjacent sections from each animal were simultaneously hybridized with the digoxigenin-labeled cRNA probes for POMC and with the radiolabeled cRNA probes for GalR1 or GalR2. The slides were washed twice with 4 \times SSC for 30 min and 10 mM DTT for 1 h, in 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, and 50% formamide for 30 min. After treatment with ribonuclease A (20 μg /ml in 0.1 M Tris [pH 8.0], 0.5 M NaCl, and 0.5 M EDTA) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, the sections were rinsed in 2 \times SSC for 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$ and 0.1 \times SSC for 15 min at 60 $^{\circ}\text{C}$. The sections were then washed in buffer 1 (100 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl [pH 7.4]) and incubated for 30 min in blocking buffer (1% Boehringer blocking agent in buffer 1). The sections were incubated for 4 h in buffer 1 containing antidigoxigenin Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase (Roche Diagnostics) diluted 1:250, 1% normal sheep serum, and 2.4 mg levamisole in 10 ml buffer 1. After rinsing for 10 min in buffer 1 and 10 min in buffer 2 (100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, and 100 mM NaCl [pH 9.5]), the sections were incubated in the chromogen solution (buffer 2 containing tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate). The reaction was stopped after 3 h by rinsing twice for 15 min in TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0] and 1 mM EDTA). The slides were dehydrated in 70% ethanol in ammonium acetate and 100% ethanol, and dipped in K5 emulsion (Ilford, Saint-Priest, France). All sections were developed after a 20-day exposure.

TABLE 1. Quantification of GalR1 mRNA across the four rostrocaudal subdivisions of the arcuate nucleus

Subdivisions of the arcuate nucleus	Number of GalR1 mRNA-expressing cells per hemisection	Density of grains per cell in GalR1 mRNA-expressing cells
Area A	20 \pm 3	12.2 \pm 0.9 ^a
Area B	24 \pm 4	17.6 \pm 1.0 ^a
Area C	23 \pm 3	24.2 \pm 1.5 ^b
Area D	27 \pm 5	23.8 \pm 1.6 ^b

A is the most rostral, and D is the most caudal subdivision of the nucleus. The values are mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are noted ^a versus ^b (statistical analysis with the Bonferroni's *t* test).

TABLE 2. Quantification of GalR2 mRNA across the four rostrocaudal subdivisions of the arcuate nucleus

Subdivisions of the arcuate nucleus	Number of GalR2 mRNA-expressing cells per hemisection	Density of grains per cell in GalR2 mRNA-expressing cells
Area A	26 \pm 3 ^a	14.9 \pm 1.1
Area B	28 \pm 4 ^a	17.1 \pm 1.1
Area C	33 \pm 3	12.3 \pm 1.2
Area D	40 \pm 5 ^b	19.6 \pm 0.2

The values are mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$) are noted ^a versus ^b (statistical analysis with the Bonferroni's *t* test).

Controls

The controls for specificity included incubation of the sections with [35 S]- and digoxigenin-labeled sense probes, pretreatment with ribonuclease, and coincubation with a 100-fold excess of unlabeled antisense probe. No significant labeling was observed on control sections.

Rostro-caudal subdivision of the arcuate nucleus

Using the rat brain atlas of Paxinos and Watson (27) as an anatomical guide, the arcuate nucleus was divided into four areas of approximately equal length in the rostral-caudal plane, as commonly used by some authors (2, 8, 28–30). Area A began rostrally at the retrochiasmatic area, where the first POMC-labeled cells are found, and extended caudally to the elongation of the third ventricle. Area B extended caudally to the onset of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DM). Area C extended caudally through the DM to the beginning of the infundibular stalk. Area D began with the most caudal portion of the DM and extended caudally to the end of the arcuate nucleus and/or the disappearance of POMC-labeled neurons.

Quantitative analysis

Four tissue sections per rostro-caudal area from each animal were analyzed (16 slices per animal) for each receptor subtype. For quantitative analysis of autoradiographic grain density, a computer-assisted quantitative system (Densitag computerized program; Biocom, Les Ulis, France) interfaced to an Axiophot microscope (60 \times epiillumination dark-field objective; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) was used. During a first analysis, the grain density corresponding to GalR1 or GalR2 mRNA levels was quantified in non-POMC cells. Cells were identified as labeled with the GalR1 or GalR2 probe if the silver grain optical density over the perikaryon was at least three times higher than the background. During a second analysis, POMC neurons were analyzed for the expression of GalR1 or GalR2 mRNA. POMC mRNA-expressing cells were first isolated under bright-field illumination, and the density of grains atop all POMC neurons was determined. Two types of analysis were applied, giving complementary information. The first approach consisted of counting the grain density over all POMC neurons of each area and calculating the labeling ratio in each neuron. The labeling ratio was defined as the ratio of the total grain density over the POMC neuron to the background measured in a cell-sized region nearby (density of silver grains caused by hybridization/mean background density of silver grains). The data were expressed as frequency distribution of GalR1 or GalR2 mRNA labeling in POMC neurons. This approach which avoided determining an arbitrary threshold might be more representative of the total number of double-labeled POMC neurons. This type of approach has been previously reported for analysis of double-labeled neurons (2). The second approach consisted of analyzing the POMC neurons having a number of silver grains over the perikaryon at least three times higher than the background. The mean cellular GalR1 or GalR2 mRNA content in POMC neurons was thus determined. In this approach, statistical analysis could be performed.

Statistical analysis

The mean density of grains per cell (\pm SEM) was calculated for each group of rats. Differences among areas of the arcuate nucleus were assessed with a one-way ANOVA, followed by a *post hoc* Bonferroni's *t* test, to compare the levels of GalR1 or GalR2 receptor mRNA expression in non-POMC and in POMC neurons in the four areas of the arcuate nucleus. Differences between the areas were regarded as significant when $P < 0.05$.

Results

The distribution of POMC, GalR1, GalR2, and POMC/GalR1 or POMC/GalR2 mRNA-expressing cells is presented on schematic drawings of frontal sections that are representative of the four rostro-caudal areas of the arcuate nucleus examined in the present study (Fig. 1).

POMC mRNA-expressing cells

POMC mRNA-expressing cells were present throughout the arcuate nucleus at all the rostro-caudal levels, extending from the retrochiasmatic to the mammillary recess levels. These neurons were similar, with respect to location, number, and morphology, when compared with previously described POMC neurons (2, 31) and β -END neurons (32). The mean number of POMC mRNA-expressing neurons was 35 ± 3 per section and did not vary significantly after castration and testosterone replacement in any subdivision of the nucleus.

GalR1 mRNA-expressing cells

GalR1 mRNA-expressing cells were observed throughout the rostro-caudal extent of the arcuate nucleus. GalR1 mRNA-expressing cells were distributed in all subdivisions of the nucleus, with a preferential distribution in the ventrolateral subdivision, as previously described (22). In intact animals, the mean number of GalR1 mRNA-expressing cells did not exhibit significant variations ($P > 0.05$) across the four rostro-caudal areas of the nucleus (Table 1). The levels of GalR1 mRNA in arcuate cells varied across the four rostro-caudal areas, the highest levels being observed in the caudal parts of the nucleus ($P < 0.05$) (Table 1).

GalR2 mRNA-expressing cells

Like GalR1 mRNA-expressing cells, GalR2 mRNA-expressing cells were observed in the whole arcuate nucleus, but GalR2 mRNA-expressing cells did not exhibit any specific distribution. The mean number of GalR2 mRNA-expressing cells was higher in the caudal part of the nucleus than in areas A and B ($P < 0.05$) (Table 2). The level of GalR2 mRNA in individual positive cells did not exhibit significant variations across the arcuate nucleus cells (Table 2).

Effects of castration and testosterone replacement on GalR1 or GalR2 mRNA-expressing cells

Plasma testosterone concentration in intact rats was 1.75 ± 0.29 ng/ml. Testosterone levels dropped to 0.005 ± 0.002 ng/ml in castrated rats ($P < 0.001$). Castration significantly decreased the overall number of GalR1 and GalR2 mRNA-expressing cells in the arcuate nucleus (Fig. 2A; $P < 0.05$). Castration also induced a significant decrease ($P < 0.05$) of GalR1 mRNA level per cell but did not affect GalR2 mRNA level (Fig. 2B). In testosterone-implanted animals, plasma testosterone concentration was 1.88 ± 0.61 ng/ml, a value which was not significantly different from that of intact animals ($P > 0.05$). In testosterone-implanted animals, the number of GalR1 and GalR2 mRNA-expressing cells (Fig. 2A) and the level of GalR1 or GalR2 mRNA in arcuate cells (Fig. 2B) did not significantly differ from those of intact animals.

GalR1 expression in POMC neurons and effects of testosterone deprivation

POMC neurons expressing GalR1 mRNA were observed throughout the rostro-caudal extent and in all subdivisions of the arcuate nucleus (Fig. 1). POMC neurons expressed lower levels of GalR1 mRNA than non-POMC-expressing cells. The

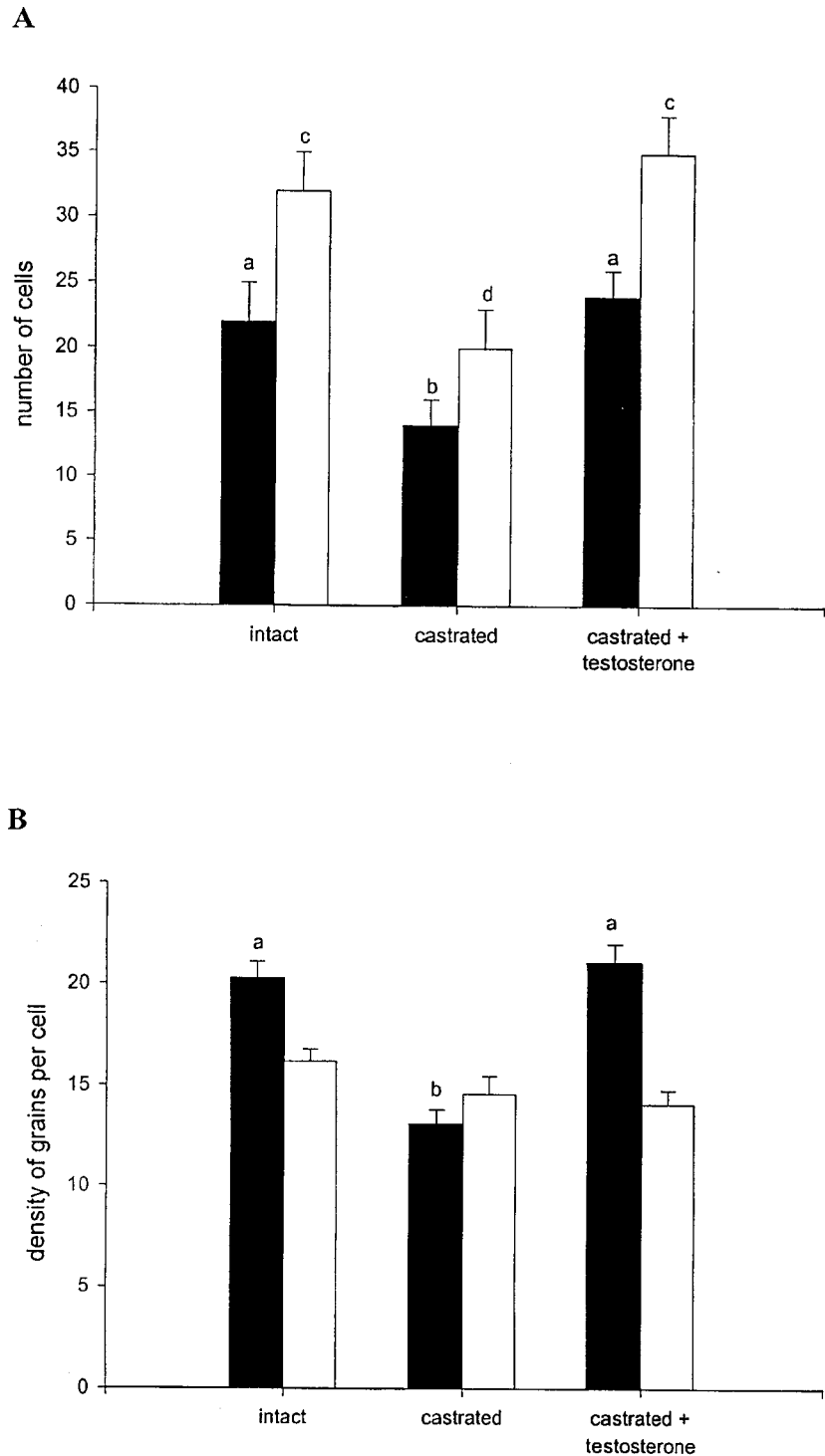


FIG. 2. Mean number of arcuate cells expressing GalR1 mRNA (black columns) or GalR2 mRNA (white columns) per hemisection (A) and relative amount of GalR1 mRNA (black columns) or GalR2 mRNA (white columns) (B), as reflected by density of grains per cell, in intact, castrated, and testosterone-replaced male rats. The values are given as the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$) among the average values are noted as a vs. b and c vs. d (statistical analysis with the Bonferroni's test).

quantitative results are shown in Figs. 3 and 4. The total number of POMC neurons that were examined, in each area, for the presence of GalR1 mRNA expression is indicated in Table 3. Analysis of the frequency distribution of GalR1 mRNA

expression in POMC neurons in intact animals revealed that the number of double-labeled neurons was higher in the rostral and central subdivisions than in the most caudal subdivision of the nucleus (Figs. 3A and 5). Castration shifted

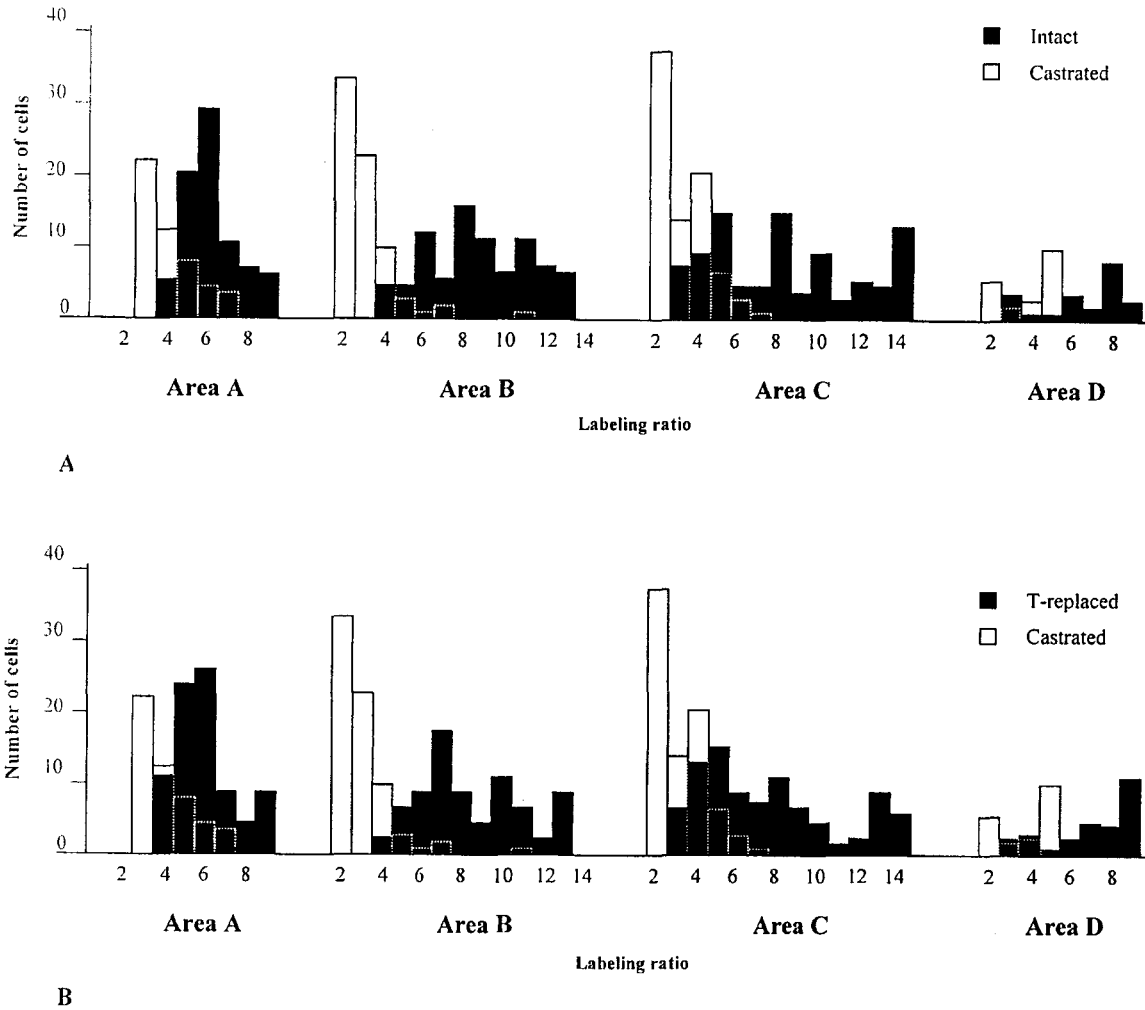


FIG. 3. Frequency distribution of GalR1 mRNA labeling in POMC neurons throughout the four rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus, in intact and castrated animals (A) and castrated and testosterone-treated (T-replaced) animals (B). Area A is the most rostral, and area D is the most caudal subdivision of the nucleus. In all areas of the nucleus, castration shifted the distribution of POMC neurons containing GalR1 mRNA toward lower labeling ratio. Only the POMC neurons presenting a labeling ratio ≥ 2 (i.e. a specific labeling) were shown in this figure.

the frequency of double-labeled neurons toward lower labeling ratio (Fig. 3A). Supplementation of castrated animals with physiological levels of testosterone prevented the effects of castration: the distribution of double-labeled cells in testosterone-treated rats was shifted to higher labeling ratio than that of castrated animals (Fig. 3B), and the total number of double-labeled neurons was similar to that measured in intact animals.

As revealed by the statistical analysis (Fig. 4), the mean cellular concentration of GalR1 mRNA signal in POMC neurons in intact male rats was significantly different in area A and areas B and C ($P < 0.05$). These differences between areas were abrogated in castrated animals ($P > 0.05$). The levels of GalR1 mRNA in POMC neurons were significantly lower in each area of the arcuate nucleus in castrated rats than in intact animals ($P < 0.05$) (Figs. 4 and 6, A and B). In all rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus, the effects of castration on the expression of GalR1 mRNA in POMC neurons were

prevented by replacement with physiological levels of testosterone (Fig. 4).

GalR2 expression in POMC neurons and effects of testosterone deprivation

POMC neurons expressing GalR2 mRNA were also observed throughout the rostro-caudal extent and in all subdivisions of the arcuate nucleus (Fig. 1). Dual-labeled POMC neurons generally expressed lower GalR2 mRNA levels than single-labeled GalR2 cells. The quantitative data are reported in Figs. 7 and 8.

The total number of POMC neurons examined, in each area, for the presence of GalR2 mRNA expression is indicated in Table 4.

The number of POMC neurons expressing GalR2 mRNA was higher in the rostral and central subdivisions (Figs. 7A and 9) than in the caudal one (Figs. 7A and 10). Castration

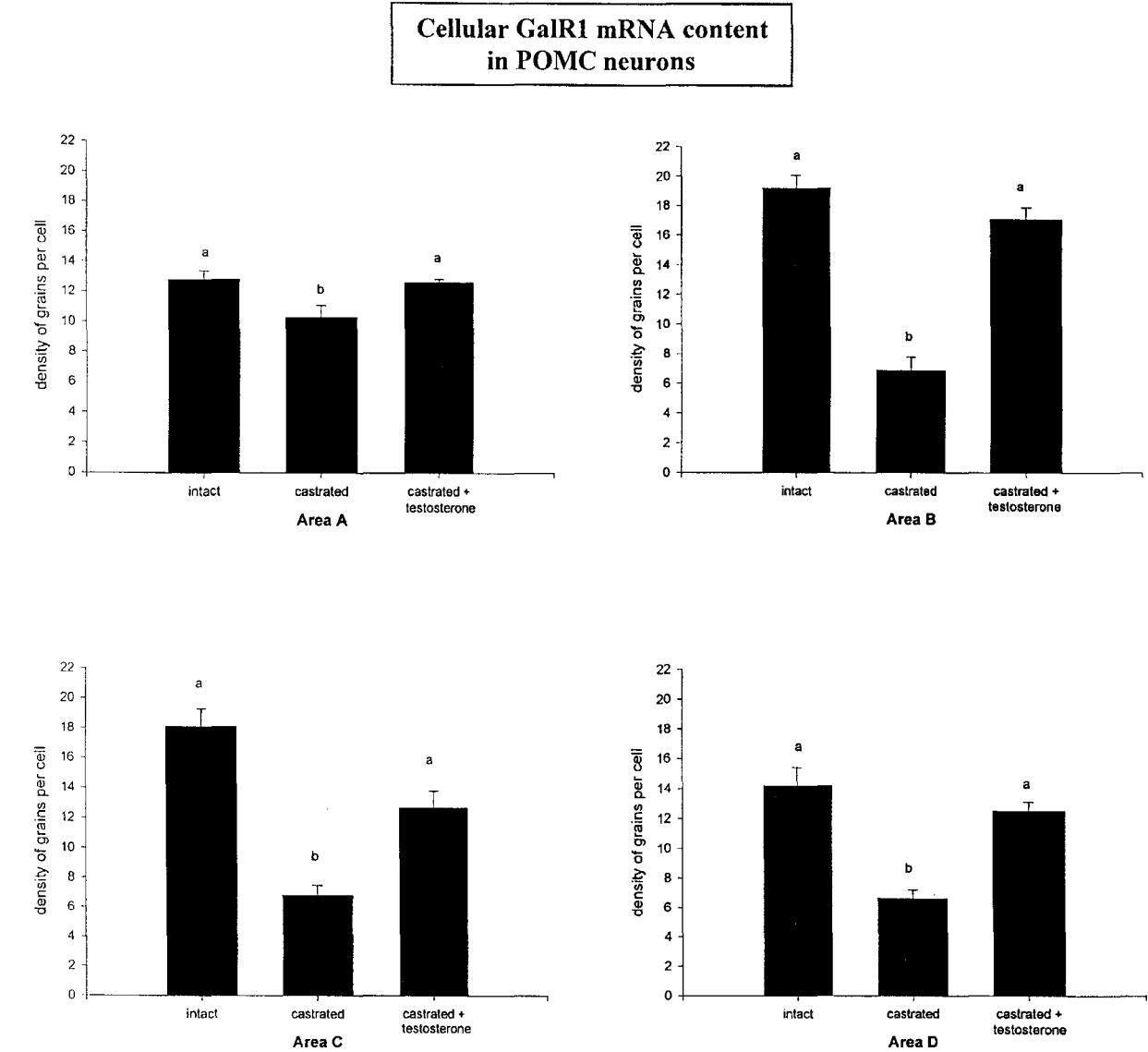


FIG. 4. Relative amounts of GalR1 mRNA in POMC neurons, as reflected by density of grains per cell, throughout the four rostro-caudal subdivisions (A–D) of the arcuate nucleus in intact, castrated, and testosterone-replaced male rats. The values are the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$) among the average values for each area are noted as a vs. b (statistical analysis with the Bonferroni's test).

TABLE 3. Total number of POMC neurons examined for the presence of GalR1 mRNA labeling in Fig. 3

	Area A	Area B	Area C	Area D
Intact	443	675	638	342
Castrated	426	660	612	347
T-replaced animals	421	684	620	339

A is the most rostral, and D the most caudal subdivision of the nucleus. T, Testosterone.

shifted the frequency of double-labeled neurons toward lower labeling ratio (Fig. 7A). These effects of castration were prevented by replacement with physiological levels of testosterone (Fig. 7B).

The statistical analysis of the mean optical density (Fig.

8) revealed that the cellular level of GalR2 mRNA signal in POMC neurons of intact animals did not exhibit any significant variations ($P > 0.05$) across the different areas of the nucleus. In contrast, in the castrated group, significant variations ($P < 0.05$) of GalR2 mRNA levels in POMC neurons were detected between areas A and C, as well as between areas B, C, and D (Fig. 8). Compared with intact rats (Fig. 6C), castrated animals displayed significantly lower GalR2 mRNA levels in POMC neurons in areas A and D (Fig. 6D) ($P < 0.05$; Fig. 8). The effects of castration on the expression of GalR2 mRNA in POMC neurons were prevented in the areas A, B, and C by replacement with physiological levels of testosterone (Fig. 8). However, in area D, testosterone did not reverse the effect of castration.

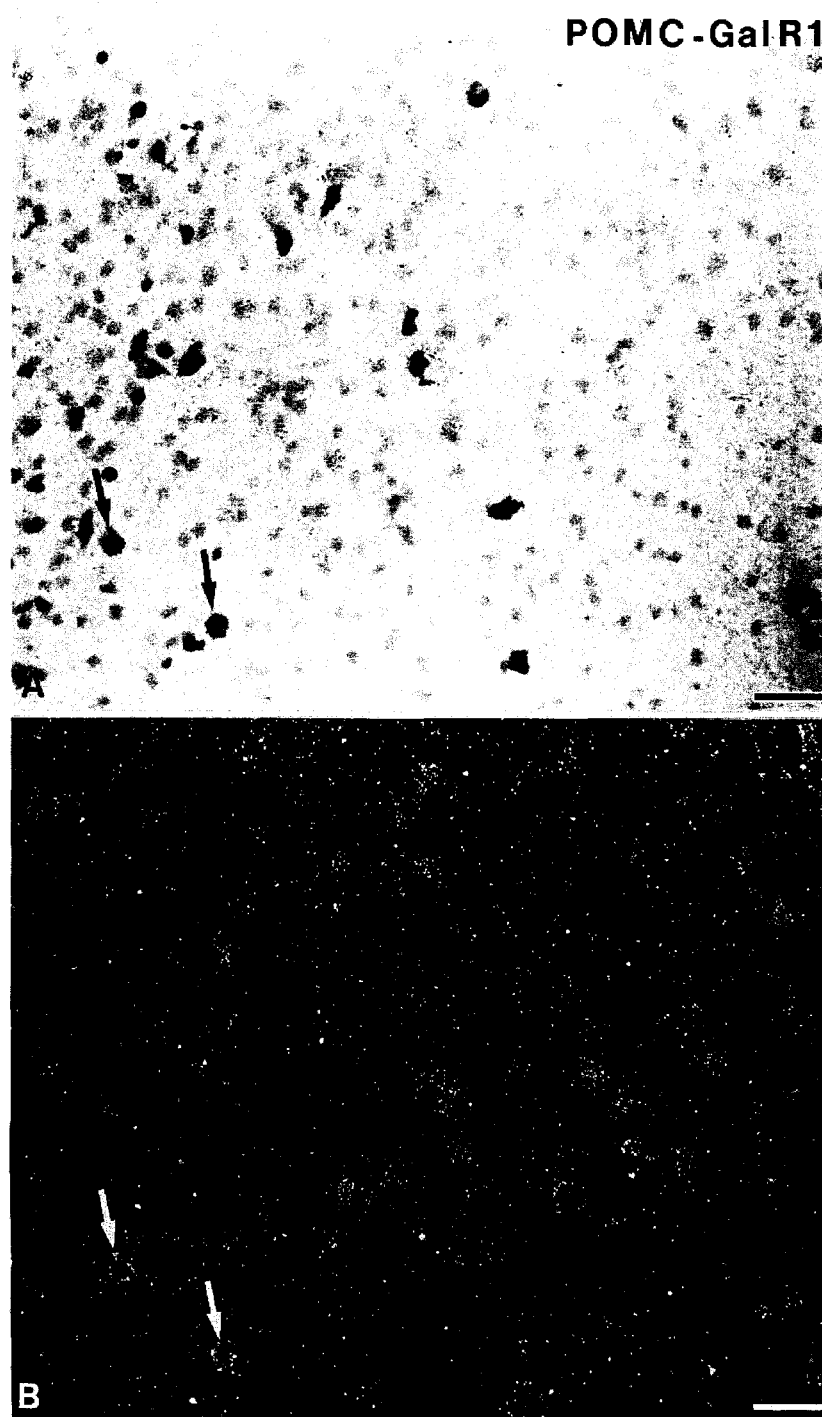


FIG. 5. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs of a representative section of the arcuate nucleus showing expression of GalR1 mRNA (silver grains) in POMC neurons (dark precipitate) in the central subdivision of the arcuate nucleus. Arrows point to neurons that are double-labeled for POMC and GalR1 mRNAs. Scale bars, 55 μ m.

Discussion

The present report describes the occurrence of GalR1 and GalR2 galanin receptor mRNAs in POMC neurons of the arcuate nucleus of male rats and demonstrates that the expression of the GalR1 and GalR2 genes is regulated by an-

drogens. The arcuate nucleus has been divided into four rostro-caudal subdivisions, and each area has been analyzed separately. This partitioning generally facilitates quantitative comparisons between animals (33). It was also based on previous reports indicating that the POMC populations of

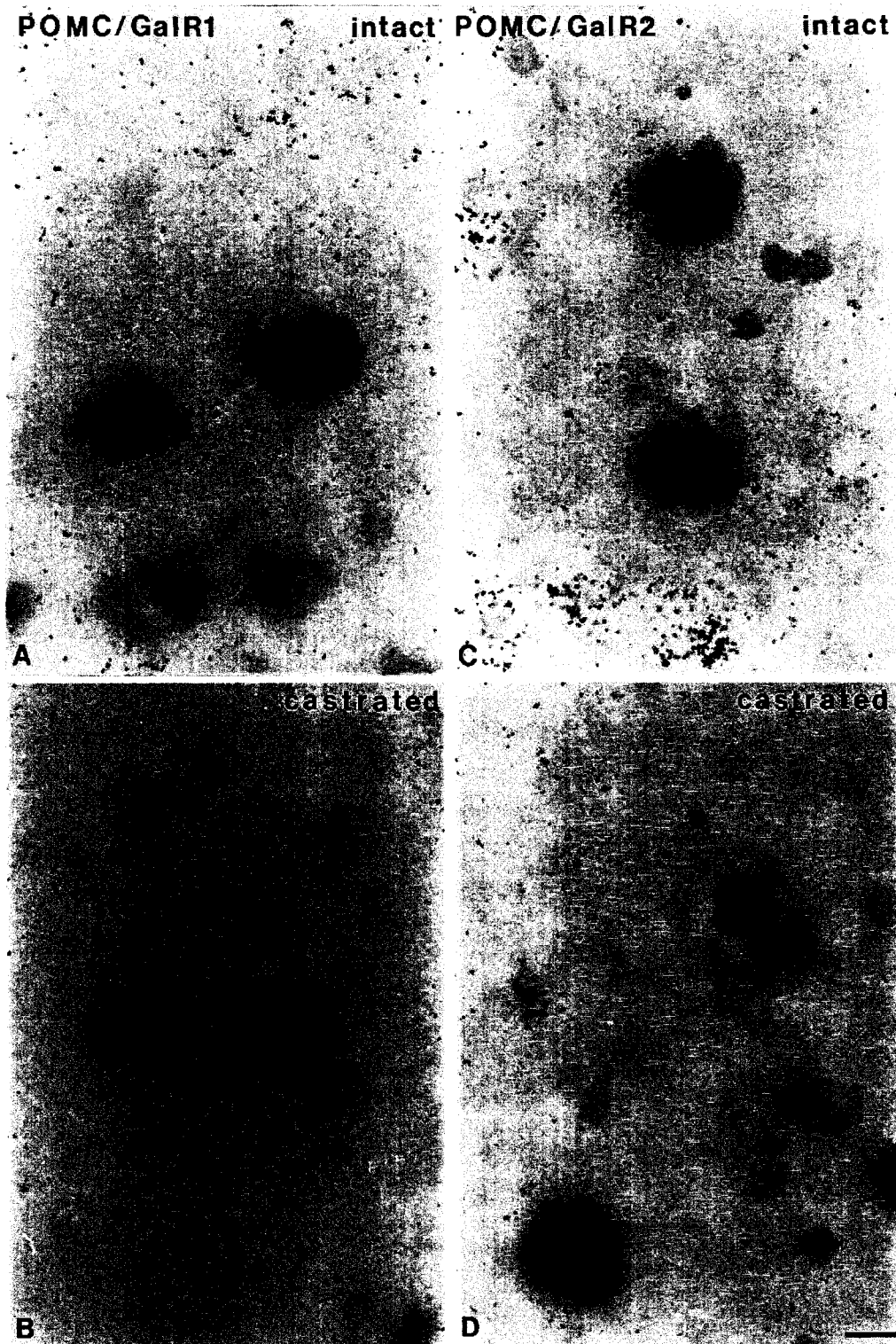


FIG. 6. Bright-field photomicrographs of representative sections of the arcuate nucleus from intact (A and C) or castrated rats (B and D), showing POMC neurons (precipitate) expressing GalR1 (A and B) or GalR2 (C and D) galanin receptor mRNA (*silver grains*). Note the lower level of expression of galanin receptor mRNAs in POMC neurons in castrated animals (B, D), compared with intact animals (A, C). Scale bar, 10 μ m.

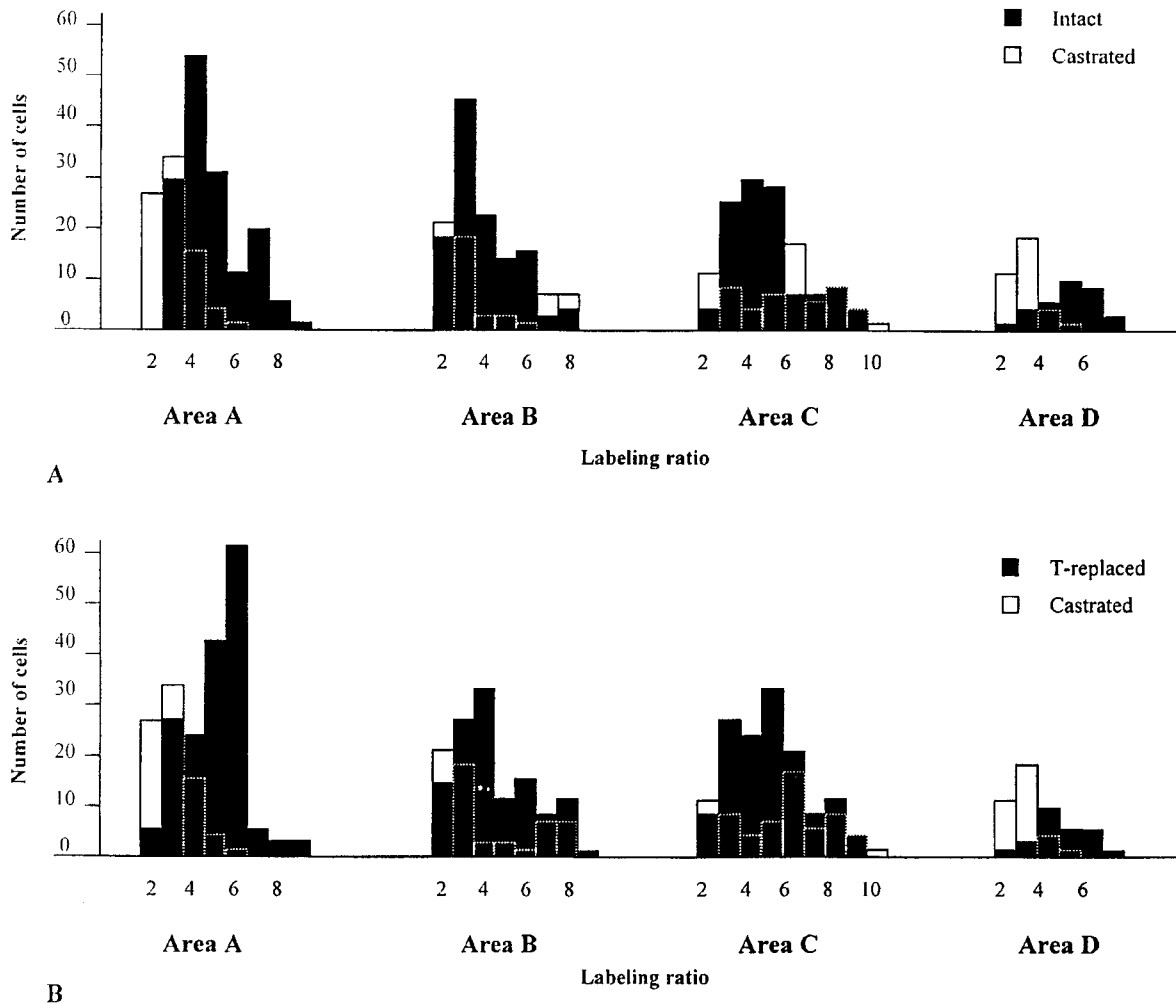


FIG. 7. Frequency distribution of GalR2 mRNA labeling in POMC neurons throughout the four rostro-caudal subdivisions (areas A–D) of the arcuate nucleus, in intact and castrated animals (A) and castrated and testosterone-treated animals (B). In the areas A, B, and D of the nucleus, castration shifted the distribution of POMC neurons containing GalR2 mRNA toward lower labeling ratio. Only the POMC neurons presenting a labeling ratio ≥ 2 (i.e. a specific labeling) were shown in this figure.

the arcuate nucleus are heterogeneous, in terms of projections (2) and sensibility to hormonal treatments (2, 8, 28–30).

As previously reported (22, 24), GalR1 and GalR2 mRNA are expressed in numerous cells of the arcuate nucleus, indicating that a large number of the different cell types present in the nucleus might be able to express galanin receptor mRNAs. Interestingly, the distribution of GalR2 mRNA-expressing cells does not completely overlap with that of GalR1 mRNA-expressing cells, indicating that some cells selectively express either GalR1 or GalR2 mRNA. From a technical point of view, this observation confirms the absence of cross-reactivity between the two riboprobes, which is also supported by the fact that some GalR1 mRNA-expressing cells were observed in hypothalamic nuclei that did not express GalR2 mRNA, e.g. the ventromedial nucleus.

Examination of dual-labeled neurons revealed that a subpopulation of POMC neurons expresses the GalR1 and/or

GalR2 subtypes of galanin receptor mRNAs, and POMC/GalR1- or POMC/GalR2-labeled neurons were not preferentially distributed in a locoregional subdivision of the arcuate nucleus. These observations strongly suggest that galanin can directly regulate the activity of POMC neurons via at least two receptor subtypes, GalR1 and GalR2. These results raise the question of the localization of the action of galanin on POMC neurons: cell body or nerve terminals? Actually, the presence of receptor mRNAs does not automatically imply the existence of functional galanin receptor proteins at the level of the cell body. However, a high density of galanin binding sites has been detected in the arcuate nucleus (25), suggesting that POMC neurons may bear galanin receptor proteins on their cell body membranes. It has also been shown that galanin-immunoreactive fibers make synaptic contacts with β -END cell bodies (13). These nerve terminals may originate from intrinsic neurons, because de-

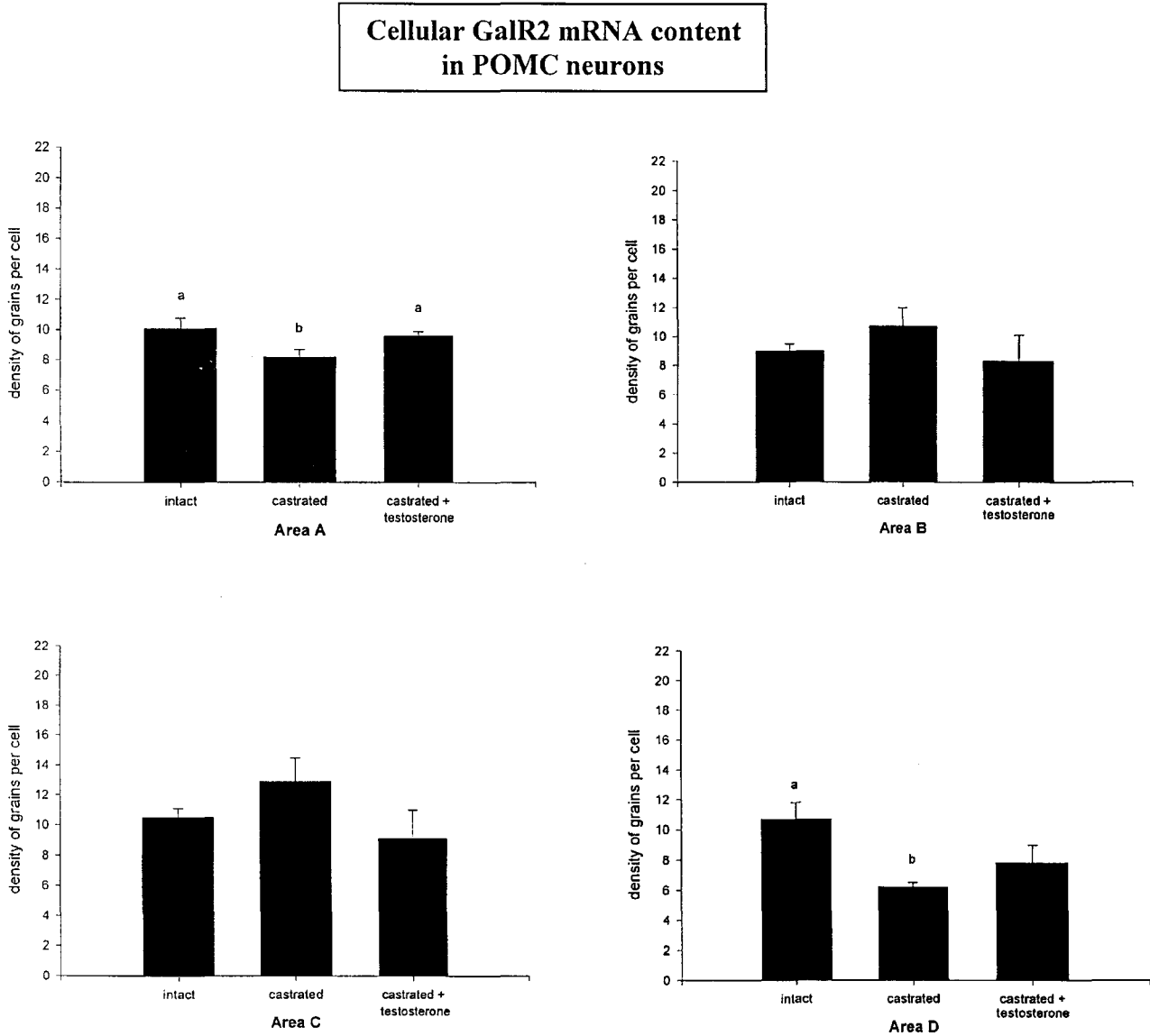


FIG. 8. Relative amounts of GalR2 mRNA in POMC neurons, as reflected by density of grains per cell, throughout the four rostro-caudal subdivisions (A–D) of the arcuate nucleus in intact, castrated, and testosterone-replaced male rats. The values are the mean ± SEM. Significant differences ($P < 0.05$) among the average values for each area are noted as a vs. b (statistical analysis with the Bonferroni's test).

TABLE 4. Total number of POMC neurons examined for the presence of GalR2 mRNA labeling in Fig. 7

	Area A	Area B	Area C	Area D
Intact	432	677	609	351
Castrated	423	656	640	322
T-replaced animals	445	696	628	314

A is the most rostral, and D the most caudal subdivision of the nucleus.

struction of the arcuate nucleus with monosodium glutamate treatment results in a significant decrease in galanin immunoreactive fibers (34), and because deafferentation of the arcuate nucleus does not alter the staining for galanin in the

nucleus (13). Altogether, these data suggest that an arcuate galaninergetic pathway might directly modulate the activity of POMC neurons at their cell body level.

The number of POMC neurons expressing GalR1 or GalR2 galanin receptor messenger exhibited a gradient across the four rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus, with more numerous double-labeled neurons in the most rostral areas. Because the most rostral POMC neurons project preferentially toward the preoptic area where the GnRH cell bodies are located (2), our results strongly suggest that POMC neurons expressing galanin receptor mRNAs are preferentially involved in the regulation of the activity of GnRH neurons. Concurrently, because both POMC-derived

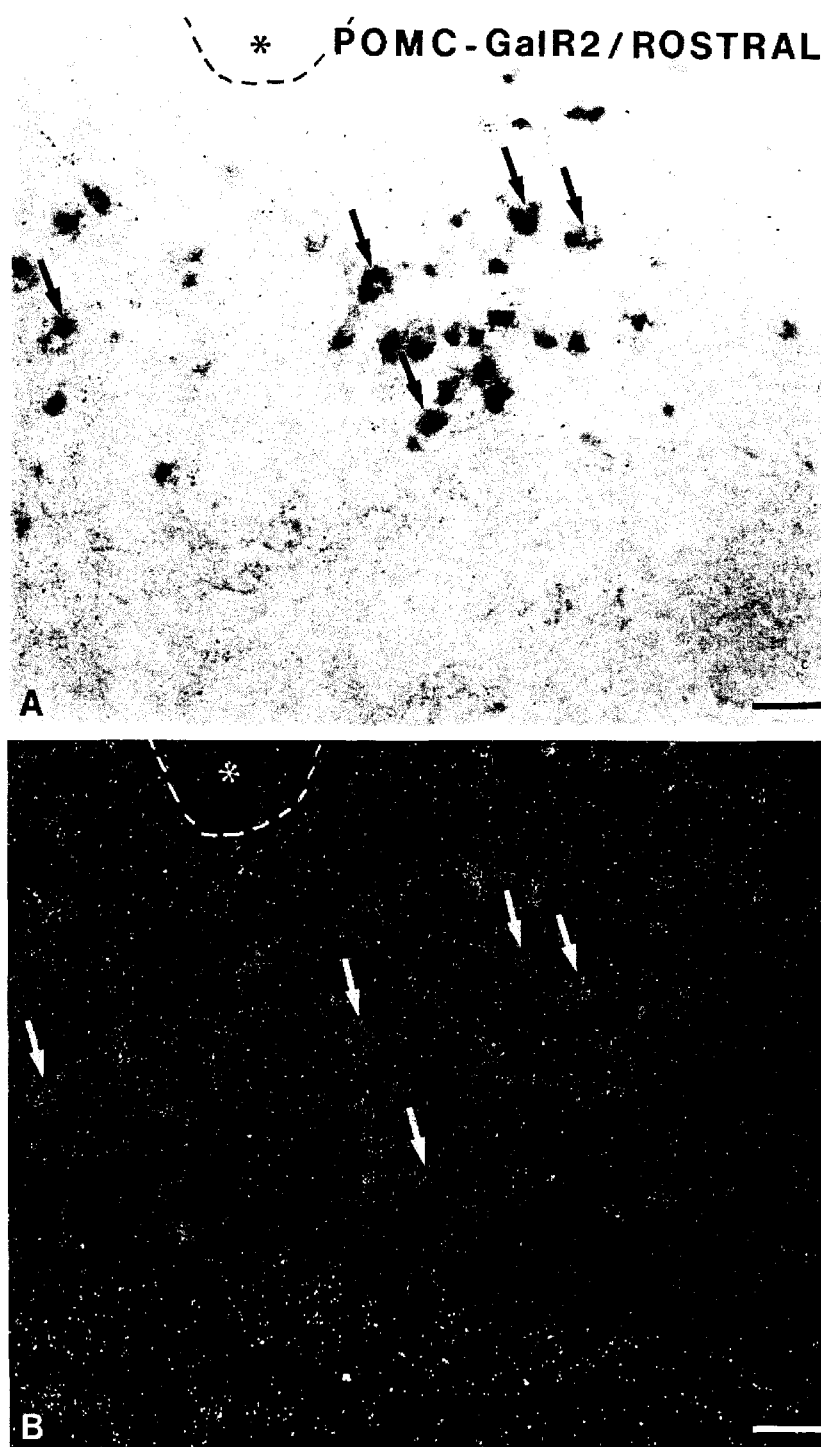


FIG. 9. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs of a representative section of the rostral subdivision (area A) of the arcuate nucleus where a double-labeling *in situ* hybridization technique with riboprobes complementary to POMC (dark precipitate) and GalR2 mRNA (silver grains) was performed. Many POMC neurons expressed GalR2 mRNA (arrows) in this area. Scale bars, 55 μ m.

peptides, such as β -endorphin and α -MSH, and galanin are also known to regulate feeding behavior (3), a direct regulatory influence of galanin on POMC neurons may also play a role in the control of food intake.

The number of POMC neurons detected by the digoxige-

nin-labeling method was not affected by castration or testosterone replacement, indicating that androgens do not regulate the number of POMC-expressing neurons. Conversely, in general, castration decreased the amounts of GalR1 or GalR2 mRNA expressed in POMC neurons, and these effects

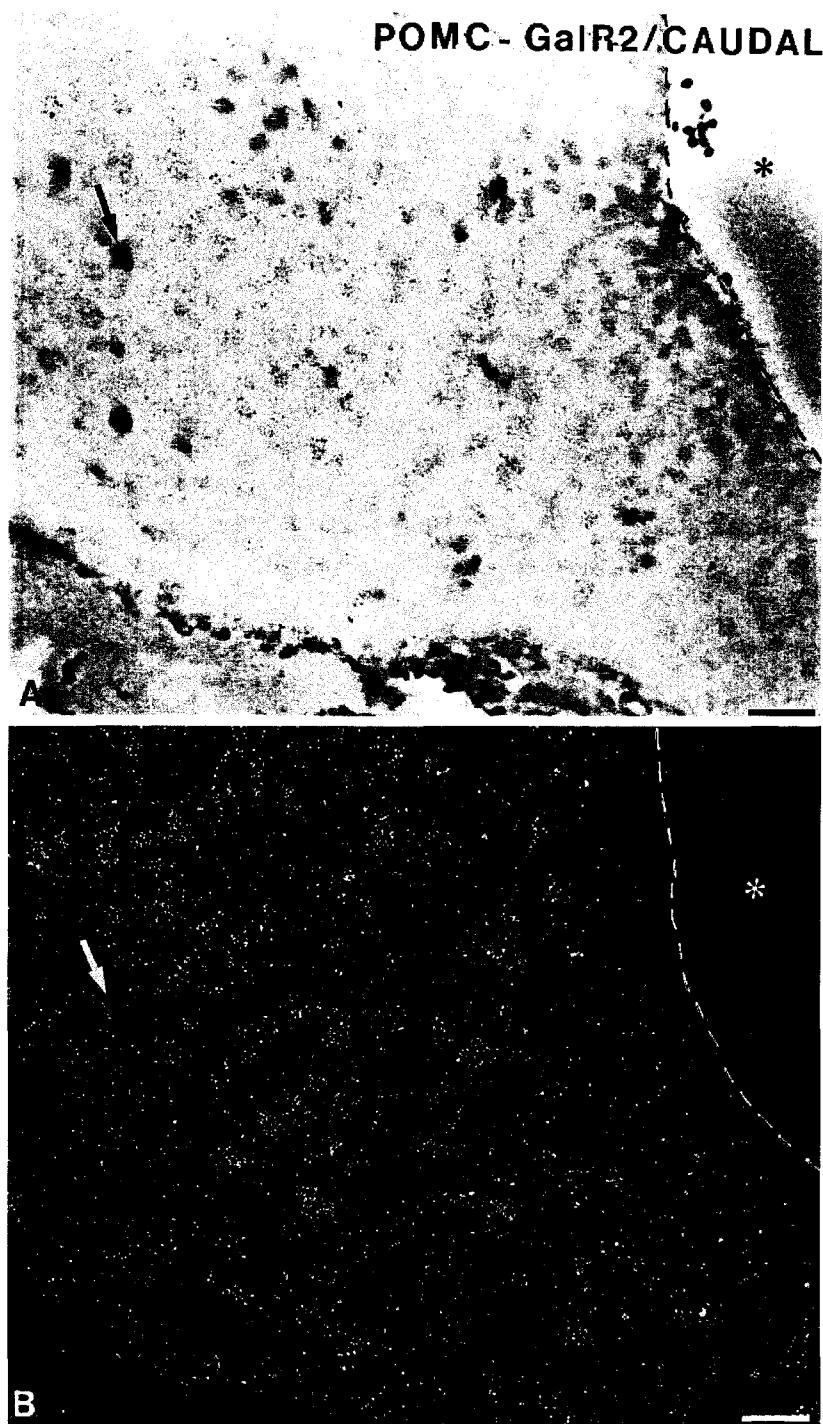


FIG. 10. Bright-field (A) and dark-field (B) photomicrographs of a representative section of the caudal subdivision (area D) of the arcuate nucleus where a double-labeling *in situ* hybridization technique with riboprobes complementary to POMC (dark precipitate) and GalR2 mRNA (*silver grains*) was performed. In this area, few POMC neurons expressed GalR2 mRNA (*arrow*), whereas numerous non-POMC cells expressed GalR2 mRNA. Scale bars, 55 μ m.

were abolished by testosterone replacement in all rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus. These data show that androgens stimulate the expression of GalR1 and GalR2 genes, as already reported for glutamate receptors in hypothalamic neurons (35). Consequently, it seems that testosterone has a stimulatory effect on galanin receptor mRNA

expression in POMC neurons. Because both the POMC neuronal system and testosterone are strongly implicated in the regulation of the GnRH axis, it seems that testosterone can modulate the GnRH neuroendocrine axis, in part, via the regulation of galanin receptor expression in POMC neurons. The observation that castration decreased the expression lev-

els of galanin receptor mRNAs in POMC neurons is consistent with previous studies that showed that POMC neurons are regulated by gonadal steroids (2, 7–9). However, the effects of testosterone deprivation on galanin receptor mRNA expression are not restricted to POMC neurons, because castration also decreased the number of non-POMC cells expressing galanin receptors and/or the levels of galanin receptor message in non-POMC cells of the arcuate nucleus. In agreement with this finding, it has been observed that androgen receptor mRNA-expressing cells are widely distributed in the arcuate nucleus (36).

To our knowledge, this is the first report describing the effects of castration on the expression of GalR1 and GalR2 mRNA in the arcuate nucleus. Up to now, few studies have been conducted to investigate the effect of testosterone on the expression of galanin receptors. It has been found that, in male rat, the density of galanin binding sites increases during puberty in some brain areas, in correlation with the variations of sex steroid hormone concentration (25). We have recently shown that gonadal steroids regulate the expression of GalR1 mRNA in the preoptic area of the female rat (37). It has also been reported that male gonadal steroids enhance the expression of the galanin precursor gene (38–40). Thus, male gonadal steroids seem to modulate components of the galaninergic pathway, including the expression of galanin receptors in target cells.

The fact that POMC neurons express GalR1 or GalR2 mRNA suggests that galanin may exert complex effects on POMC neuron activity, depending, for instance, on the relative affinity of each receptor subtype. In support of this hypothesis, it has been shown that GalR1 is coupled with a $G_{i\beta\gamma}$ protein, whereas GalR2 is coupled with a G_o or G_q/G_{11} protein (41), indicating that galanin may have either a stimulatory or an inhibitory influence, according to the receptor subtype which is activated.

In summary, this study has demonstrated that, in the arcuate nucleus, galanin might directly modulate the activity of POMC neurons via an action on GalR1 or GalR2 galanin receptors. Because these receptors are preferentially expressed by the most rostral POMC neurons, known to project predominantly to the preoptic area, and since galanin receptor expression in POMC neurons is affected by testosterone, we can speculate that POMC neurons, which express galanin receptor genes, may play a key role in the regulation of the activity of GnRH neurons.

Acknowledgments

The authors thank Mrs. G. Mortreux for excellent technical assistance with the RIAs.

References

- Mezey E, Kiss JZ, Mueller GP, Eskay R, O'Donohue TL, Palkovits M 1985 Distribution of the proopiomelanocortin derived peptides, adrenocorticotrophic hormone, α -melanocyte-stimulating hormone and β -endorphin (ACTH, α -MSH, β -END) in the rat hypothalamus. *Brain Res* 328:341–347
- Cheung S, Hammer Jr RP 1995 Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat. *Neuroendocrinology* 62:283–292
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS 1999 Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68–100
- Kalra SP, Kalra PS 1996 Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. *Front Neuroendocrinol* 17:371–401
- Caballero C, Celis ME 1993 The effect of the blockade of alpha-melanocyte-stimulating hormone on LH release in the rat. *J Endocrinol* 137:197–202
- Kalra SP 1993 Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507–538
- Chowen-Breed JA, Fraser HM, Vician L, Damassa DA, Clifton DK, Steiner RA 1989 Testosterone regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus of the male rat. *Endocrinology* 124:1697–1702
- Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA 1989 Regional specificity of testosterone regulation of proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the male rat brain. *Endocrinology* 124:2875–2881
- Chowen JA, Argente J, Vician L, Clifton DK, Steiner RA 1990 Proopiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52:581–588
- Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA 1997 Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138:5063–5066
- Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA 1997 Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489–4492
- Crawley JN 1995 Biological actions of galanin. *Regul Pept* 59:1–16
- Horvath TL, Kalra SP, Naftolin F, Leranth C 1995 Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 7:579–588
- Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M, Mayaux JF 1994 Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9780–9783
- Burgevin MC, Loquet I, Quarteron D, Habert-Ortoli E 1995 Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J Mol Neurosci* 6:33–41
- Howard AD, Tan C, Shiao LL, Palyha OC, McKee KK, Weinberg DH, Feighner SD, Cascieri MA, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Sullivan KA 1997 Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin. *FEBS Lett* 405:285–290
- Wang S, Hashemi T, He C, Strader C, Bayne M 1997 Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype. *Mol Pharmacol* 52:337–343
- Fathi Z, Cunningham AM, Iben LG, Battaglino PB, Ward SA, Nichol KA, Pine KA, Wang J, Goldstein ME, Iismaa TP, Zimanyi IA 1997 Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol Brain Res* 51:49–59
- Wang S, He C, Hashemi T, Bayne M 1997 Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes. *J Biol Chem* 272:31949–31952
- Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao WJ, Vayssie PJ, Branchek TA, Gerald C, Jones KA 1998 Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 273:23321–23326
- Kolakowski Jr LE, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateaufneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG, O'Dowd BF 1998 Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* 71:2239–2251
- Mitchell V, Habert-Ortoli E, Epelbaum J, Aubert JP, Beauvillain JC 1997 Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 66:160–172
- Gustafson EL, Smith KE, Durkin MM, Gerald C, Branchek TA 1996 Distribution of a rat galanin receptor mRNA in rat brain. *Neuroreport* 7:953–957
- Mitchell V, Bouret S, Howard AD, Beauvillain JC 1999 Expression of the galanin receptor subtype Gal-R2 mRNA in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16:265–277
- Planas B, Kolb PE, Raskind MA, Miller MA 1994 Activation of galanin pathways across puberty in the male rat: assessment of regional densities of galanin binding sites. *Neuroscience* 63:859–867
- Steiner RA, Bremner WJ, Clifton DK 1982 Regulation of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude by testosterone in the adult male rat. *Endocrinology* 111:2055–2061
- Paxinos G, Watson C 1982 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York
- Mann PE, Foltz G, Rigero BA, Bridges RS 1999 The development of POMC gene expression in the medial basal hypothalamus of prepubertal rats. *Dev Brain Res* 116:21–28
- Tong Y, Zhao HF, Labrie F, Pelletier G 1990 Regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. *Neurosci Lett* 112:104–108
- Tong Y, Pelletier G 1992 Prolactin regulation of proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 56:561–565
- Wilcox JN, Roberts JL 1985 Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 117:2392–2396
- Finley JCW, Lindström P, Petrusz P 1981 Immunocytochemical localization

- of β -endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33:28–42
33. Blasquez C, Jegou S, Feuilloley M, Rosier A, Vandesande F, Vaudry H 1994 Visualization of gamma-aminobutyric acid A receptors on proopiomelanocortin-producing neurons in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 135:2759–2764
 34. Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E 1989 Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76:343–368
 35. Diano S, Naftolin F, Horvath TL 1997 Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinology* 138:778–789
 36. 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
 37. Faure-Virelizier C, Croix D, Bouret S, Prevot V, Reig S, Beauvillain JC, Mitchell V 1998 Effects of estrous cyclicity on the expression of the galanin receptor Gal-R1 in the rat preoptic area: a comparison with the male. *Endocrinology* 139:4127–4139
 38. Planas B, Kolb PE, Raskind MA, Miller MA 1994 Activation of galanin pathways across puberty in the male rat: galanin gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis and medial amygdala. *Neuroscience* 63:851–858
 39. Miller MA, Kolb PE, Raskind MA 1993 Testosterone regulates galanin gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 611:338–341
 40. Delemarre-van de Waal HA, Burton KA, Kabigting EB, Steiner RA, Clifton DK 1994 Expression and sexual dimorphism of galanin messenger ribonucleic acid in growth hormone-releasing hormone neurons of the rat during development. *Endocrinology* 134:665–671
 41. Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE 1998 Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochemistry* 37:6711–6717

Les résultats obtenus montrent que les neurones à POMC expriment les ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2. La régionalisation selon le plan antéro-postérieur du noyau arqué nous permet de déterminer que le récepteur GalR2 est préférentiellement exprimé dans les neurones à POMC du noyau arqué antérieur. De façon intéressante, de nombreuses études ont impliqué les neurones à POMC du noyau arqué antérieur dans la régulation du système à GnRH (Chowen-Breed *et al.*, 1989b ; Tong *et al.*, 1990 ; Bohler *et al.*, 1991 ; Tong et Pelletier, 1992 ; Cheung et Hammer, 1995a ; Mann *et al.*, 1999).

De plus, nous montrons que les stéroïdes gonadiques modulent l'expression des récepteurs de la galanine. En effet, les expériences de castrations et supplémentations en testostérone révèlent que l'absence de testostérone induit une diminution des niveaux d'expression des ARNm des récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2. Cet effet est observé dans de nombreuses cellules du noyau arqué et plus précisément dans les neurones à POMC, où la castration induit une diminution significative du nombre de neurones doublement marqués et du niveau d'expression des ARNm codant les récepteurs de la galanine. La régionalisation nous permet, là encore, d'affiner nos résultats en mettant en évidence que la testostérone module l'expression des récepteurs de la galanine principalement dans les neurones à POMC du noyau arqué antérieur.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que la galanine peut directement moduler l'activité des neurones à POMC via ses récepteurs GalR1 et GalR2 et que cette interrelation est stéroïdo-dépendante. De plus, étant donné que les récepteurs de la galanine sont préférentiellement exprimés dans les neurones à POMC du noyau arqué antérieur, neurones

fortement impliqués dans la régulation du système à GnRH, nous pouvons envisager que la galanine du noyau arqué module, via les neurones à POMC, l'activité des neurones à GnRH.

Article 2

" Modulation of proopiomelanocortin neuronal activity by galanin in
the rat mediobasal hypothalamus "

S. Bouret, D. Croix, M. Tran Van Chuoi-Mariot, V. Prevot, A.
Loyens, G. Tramu, S. Jégou, H. Vaudry, J.C. Beauvillain, V. Mitchell

- *soumis* -

I.2. Modulation de l'activité des neurones à POMC par la galanine dans l'hypothalamus médiobasal

Notre première étude nous a permis de déterminer que la galanine pouvait avoir une action directe, via ses récepteurs GalR1 et GalR2, sur les neurones à POMC. La question se posait alors de connaître la nature de l'action exercée par la galanine sur l'activité des neurones à POMC. Afin de répondre à cette question, nous avons entrepris une approche *ex vivo* qui consiste à incuber des fragments d'hypothalamus médiobasaux de rats mâles (incluant le noyau arqué et l'éminence médiane) avec des doses croissantes de galanine. Cette approche nous a permis de déterminer, dans les mêmes conditions expérimentales, l'effet de la galanine à la fois sur la libération de β -endorphine et l'expression de l'ARNm codant la POMC. En parallèle, afin de vérifier que les effets de la galanine impliquaient effectivement les récepteurs de la galanine, nous avons incubé des fragments d'hypothalamus médiobasaux avec de la galanine en présence de galantide, antagoniste non sélectif des récepteurs de la galanine. Pour chaque expérience, les taux de β -endorphine libérés dans le milieu de survie ont été dosés toutes les 30 minutes par RIA. Après la période d'incubation (soit après 180 min), les fragments d'hypothalamus médiobasaux ont été fixés, coupés au cryostat et soumis à une hybridation *in situ* utilisant une ribosonde POMC radiomarquée afin de quantifier les taux relatifs d'ARNm POMC par analyse d'images. Les concentrations de β -endorphine présentes dans les fragments d'hypothalamus médiobasaux ont également été dosées par RIA à la fin de la période d'incubation.

Etant donné les résultats obtenus, nous avons également recherché le mécanisme par lequel la galanine induisait ses effets sur la libération de β -endorphine. Puisque l'activation de la calcineurine, encore connue sous le nom de protéine phosphatase 2B, serait mise en jeu dans certains des effets inhibiteurs de la galanine sur la libération de neurotransmetteurs ou

d'hormones (Renstrom *et al.*, 1996), nous avons étudié la libération de β -endorphine après ajout de galanine en présence de FK-506, inhibiteur de la calcineurine.

Nous avons également entrepris, par RT-PCR, de vérifier que l'expression de l'ARNm des trois sous-types des récepteurs de la galanine clonés (GalR1, GalR2, et GalR3) était présente dans les fragments d'hypothalamus médiobasaux après 180 min d'incubation *ex vivo*.

Modulation of Proopiomelanocortin Neuronal Activity by Galanin in the Rat Mediobasal Hypothalamus*

SEBASTIEN BOURET, DOMINIQUE CROIX, MYRIAM TRAN VAN CHUOI-MARIOT, VINCENT PREVOT, ANNE LOYENS, GERARD TRAMU, SYLVIE JEGOU, HUBERT VAUDRY, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN, AND VALERIE MITCHELL

INSERM U-422 (S.B.; D.C.; M.TVC-M.; V.P.; A.L.; J.-C.B.; V.M.), IFR 22, Neuroendocrinology and Neuronal Physiopathology, IFR 22, Place de Verdun, 59045 Lille, France; CNRS URA 339 (G.T.), University of Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France; INSERM U-413 (S.J.; H.V.), IFRMP 23, Mont-Saint-Aignan, France.

Abbreviated title: galanin and POMC neuronal activity

Key words: beta-endorphin, arcuate nucleus, POMC, galanin receptors, hypothalamus

Address all correspondence and request for reprints to: Sebastien Bouret, INSERM U-422, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France ; Phone: +33 (0)3 2062 2062 ; Fax: +33 (0)3 2062 2061 ; E-mail address: bouret@biserte.lille.inserm.fr

* This work was supported by the Lille-Amiens-Rouen-Caen (LARC) network.

ABSTRACT

It has become apparent that galanin as well as POMC-derived peptides such as β -endorphin, play an important role in the hypothalamic circuitry that regulates neuroendocrine functions and appetite behavior. We have recently shown that GalR1 and GalR2 galanin receptor mRNAs are expressed in POMC neurons of the arcuate nucleus, suggesting a direct modulatory action of galanin on the POMC neuronal system. The purpose of the present study was to investigate the precise role of galanin on the activity of POMC neurons. To elucidate this question, male rat mediobasal hypothalamic (MBH) fragments were exposed to graded concentrations of rat galanin and the amount of β -endorphin released in the incubation medium was determined by radioimmunoassay. Galanin induced a decrease of spontaneous β -endorphin release within the first 30-60 min of incubation and this effect was blocked by the galanin receptor antagonist galantide. We then examined whether calcineurin, a protein phosphatase involved in the control of exocytosis, was implicated in the galanin-evoked decrease in β -endorphin release. Co-incubation of galanin with FK-506, a calcineurin inhibitor, suppressed the inhibitory effect of galanin on β -endorphin release. Measurement of β -endorphin levels in the tissues at the end of the incubation period revealed that galanin caused a massive accumulation of β -endorphin peptide in the MBH tissues. The effect of galanin on the relative POMC mRNA levels within the MBH fragments was assessed by *in situ* hybridization using a radiolabeled POMC riboprobe. Galanin induced an increase in the mean density of silver grains overlying POMC neurons after 60 min of incubation. The effect of galanin on POMC mRNA expression was antagonized by galantide. Finally, the expression of the mRNAs encoding for the three-galanin receptor subtypes (GalR1, GalR2, and GalR3) was examined by RT-PCR analysis. The mRNAs encoding for all three subtypes of galanin receptor were expressed in the MBH fragments at the end of the incubation. In conclusion, the present study, together with our previous report showing the expression of galanin receptors in arcuate POMC neurons, suggests that galanin exerts dual effects on POMC gene expression and β -endorphin release in the rat MBH. Our data also show that these effects are mediated by galanin receptors. These interactions between galanin and POMC neurons may contribute to the elucidation of the neuronal circuitry that controls GnRH secretion.

INTRODUCTION

Galanin, a 29 amino acid peptide, is widely distributed in the central nervous system (1). A number of *in vivo* studies have shown that galanin exerts a wide range of physiological effects including the control of neurotransmitter and hormone release, feeding behavior, nociception, and neuroendocrine functions (for review, see 2). The multiple actions of galanin are mediated through interaction of the peptide with G-protein-coupled receptors (for review, see 3). To date, three galanin receptor subtypes, GalR1, GalR2, and GalR3, have been cloned (4-6) but it is certainly possible that other galanin receptor subtypes exist.

The hypothalamus contains a high concentration of galanin immunoreactivity (1) and a high density of galanin binding sites and galanin receptor mRNAs (7-12). There is now clear evidence that galanin is involved in the regulation of multiple hypothalamic functions. Intracerebroventricular injection of galanin stimulates food intake, and increases plasma levels of luteinizing hormone (LH) and growth hormone (GH) (for review, see 13). Galanin stimulates the release of GnRH, GHRH and SRIF from mediobasal hypothalamic (MBH) fragments (14,15). Interestingly, proopiomelanocortin (POMC) neurons are implicated in most of the physiological processes regulated by galanin. This observation suggests the possible existence of an interaction between these two neuropeptidergic systems, *e.g.* galanin may exert some of its effects through modulation of POMC neurons. Our recent findings that GalR1 and GalR2 receptor mRNAs are expressed in POMC neurons in the arcuate nucleus (12) support the hypothesis that galanin may directly modulate POMC neuronal activity.

The main purpose of the present study was to determine the effect of galanin on the activity of POMC neurons in the MBH. To this aim, we have incubated *in vitro* MBH fragments to investigate the effect of galanin on 1) the release of β -endorphin, a major cleavage product of POMC in the arcuate nucleus, 2) the levels of POMC mRNA at the cellular level, and 3) β -endorphin content in MBH tissues. In order to determine the mechanism by which galanin induces its effects on β -endorphin release, we have evaluated the action of FK-506, a calcineurin inhibitor, on the effect of galanin on β -endorphin release. We have also examined, by RT-PCR, whether the mRNAs for the three galanin receptor subtypes were still present in the MBH fragments at the end of the experiments.

Morphological controls of the preservation of the tissues at the electron microscopic level were conducted after the incubation period to verify the integrity of the MBH explants.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (CERJ, St-Berthevin, France), weighing 300 g, were used in all experiments. Animals were housed four per cage and given free access to food and water. They were subjected to fixed conditions of lighting (from 0500-1900 h). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Dissection procedure and incubation system

Animals were killed by decapitation. The brain was rapidly removed and the MBH was microdissected under a binocular magnifying glass by cutting the floor of the fornix at the posterior border of the optic chiasm and the anterior border of the mamillary bodies. The total dissection time was less than 3 min from decapitation. After dissection, MBH fragments were washed twice in Krebs-Ringer bicarbonate / glucose buffer (KRB, pH 7.4) containing bacitracine (23 μ M ; Sigma., St. Louis, MO) in an atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ and then incubated *in vitro* at 35 C in KRB as previously described (16). Briefly, after a 60-min preincubation-period, MBH fragments (3 per tube) were incubated for an additional 120 min in the absence or presence of drugs as described below. The medium was changed every 30 min. Six series of experiments were conducted with these tissue fragments.

Experiment 1. Effect of galanin on β -endorphin release from MBH fragments

For dose-response experiments, MBH fragments were exposed to various concentrations (5, 50, 500, and 5000 nM) of galanin during 30 min. Rat galanin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was initially dissolved in sterile water and diluted in KRB at the appropriate concentration and then added in the incubation medium. In parallel, the antagonistic action of galantide on the effect of galanin on β -endorphin release was tested by incubating MBH fragments with galantide (500 nM) (Peninsula Laboratories) in the presence or absence of galanin (500 nM). For time-course experiments, MBH fragments were incubated with 500 nM of galanin during 120-min and β -endorphin levels in the survival medium were determined every 30 min by radioimmunoassay (RIA).

Experiment 2. Effect of a calcineurin inhibitor on the action of galanin on β -endorphin release from MBH fragments

MBH fragments were incubated with the calcineurin inhibitor (protein phosphatase 2B inhibitor) FK-506 (10 μ M) (Calbiochem, Meudon, France) in the presence of galanin (500 nM) during 30 min and β -endorphin levels in the survival medium were determined by RIA.

Experiment 3. Effect of galanin on β -endorphin levels in MBH tissues

MBH fragments were incubated in the absence or presence of 500 nM of galanin and the β -endorphin content in the tissue at the end of the 120-min of incubation period was determined by RIA.

Experiment 4. Effect of galanin on POMC mRNA levels

For dose-response experiments, MBH fragments were exposed to various concentrations (5, 50, 500, and 5000 nM) of galanin during 120 min. For a time-course experiments, 500 nM of galanin was added to the survival medium 0, 30, 60, and 120 min before the end of the incubation period. The antagonistic action of galantide on the effect of galanin on POMC mRNA levels was evaluated by incubating MBH fragments with galantide (500 nM) in the absence or presence of galanin (500 nM) during 120 min. POMC mRNA levels were then determined using *in situ* hybridization and image analysis.

Experiment 5. Expression of galanin receptor mRNAs in the MBH at the end of the incubation period

MBH fragments were incubated during 120 min in the presence or absence of galanin (500 nM). Then, galanin receptor mRNA expression (GalR1, GalR2, and GalR3) were determined by RT-PCR.

Experiment 6. Preservation of MBH fragments after the incubation period

At the end of the incubation-period, β -endorphin and POMC mRNA expressions were examined in MBH fragments by means of immunohistochemistry and *in situ* hybridization technique, respectively. In addition, ultrastructural preservation of MBH fragments was examined at the electron microscopic level.

Determination of β -endorphin release

Tissue fragments were incubated as described above. At the end of each experiment, EDTA (10^{-2} M), puromycine (10^{-2} M), and phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF, 60 nM) were added in each aliquot of incubation medium. Medium samples were stored at -80°C until

assayed. β -endorphin concentrations were measured in duplicate by RIA. The sensitivity of the assay was 20 pg/tube, and the intraassay variability was 3.4%.

Measurement of β -endorphin contained in MBH tissues

Tissues treated 120 min with 500 nM of galanin and controls, were frozen in liquid nitrogen. The samples were then weighed, homogenized, expelled into 0.2 N HCl and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The supernatant was assayed for β -endorphin by RIA as described above.

Determination of POMC mRNA levels

Tissue preparation. The tissue fragments were incubated as described above. At the end of each experiment, MBH fragments were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde / 0.1 M phosphate buffer for 18 h at 4 C, washed for 6 h in 0.05 M Coons veronal buffer (pH 7.4) containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, CA), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14- μ m coronal sections were collected, mounted onto gelatin-coated slides and stored at -80 C until use. In order to evaluate the relative POMC mRNA level in the MBH from each group, a single-label *in situ* hybridization was performed.

³⁵S-labeled POMC complementary RNA probes. The pCRII vector containing a 409 bp HindIII/XhoI fragment of rat POMC cDNA (position 221-629 bp of the POMC gene exon III) was linearized by cutting at a single site with HindIII for the antisense probe or XhoI for the sense probe. *In vitro* transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense POMC probes and [α -³⁵S]CTP (Amersham, France).

In situ hybridization. A single-label *in situ* hybridization was performed following a protocol described previously in detail (12). Briefly, processed sections were hybridized with the riboprobe-hybridization buffer mix, which contained the ³⁵S-labeled POMC cRNA probe (30,000 cpm/ μ l). Overnight hybridization at 55 C was followed by RNase treatment, a series of stringent washes, including a high-stringency wash at 60 C. Hybridized slides were dehydrated in 70% and 100% ethanols in ammonium acetate, and dipped in K5 emulsion (Integra Biosciences, France). Slides were developed after a 10-day exposure. Specificity

controls included incubation of the sections with ^{35}S sense probe, pretreatment with ribonuclease and coincubation with a 100-fold excess of unlabeled antisense probe.

Image analysis. The grain density corresponding to relative POMC mRNA levels was quantified by using the DensiRag computerized program of Biocom (Les Ulis, France). The boundaries of the arcuate nucleus were determined by observing the corresponding azure blue-stained sections. Sections were examined under a $\times 25$ epiillumination darkfield objective. Video images were obtained with a camera attached to the microscope. The optical density over the third ventricle adjacent to the arcuate nucleus was measured and used to calculate the mean background density, which was subtracted from the optical density measurement of signal over the POMC neurons. Neurons were identified as labeled with the POMC probe when the optical density was at least three times higher than the background. For each experimental group, the density of silver grains per cell was calculated from at least 800 neurons from 5 animals per group. No specific labeling was observed on the control sections.

Expression of galanin receptor (GalR1, GalR2, and GalR3) mRNAs in the MBH

Total RNA was isolated from MBH tissues based on a method previously described (17). After treatment with RNase-free DNaseI (Boehringer-Roche Diagnostics, Meylan, France), the purity and quantity of total RNA was determined by measurement of the absorbance at 260/280 nm. cDNA was synthesized using 5 μg of total RNA, and Moloney Murine Leukaemia virus transcriptase (Gibco Life Technology) according to the manufacturer's instruction. RT negative control was performed by omitting reverse transcriptase from the reaction.

RT-PCRs were performed using gene specific primers presented in Table 1 (Genset, France). Primers for galanin receptors (Table 1) were designed using DNASTAR lasergene Primerselect Program (DNASTAR, Madison, WI) and were chosen in regions where less homology between GalR1, GalR2 and GalR3 was present. β -actin cDNA molecules were equalized for each sample using a multispecific internal control (18,19) and normalized to perform galanin receptors RT-PCRs.

PCR was performed on 1 μl of the cDNA using ampliTaq Gold (Perkin Elmer, Foster City, CA) under the following conditions: 1 cycle of denaturation at 94 C for 7 min, 35 cycles

of denaturation at 94 C for 1 min, primer annealing for 1 min at 55 C for β -actin, 59 C for GalR1 and GalR3, and 57 C for GalR2 and primer extension for 1.5 min at 72 C using a Gene Amp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA, USA). Negative control was performed by omitting cDNA from the PCR reaction mix. Separation of PCR products was achieved by electrophoresis in 3% agarose gel. cDNA plasmids containing the full length coding region of GalR1 (4), GalR2 (5), or GalR3 (6) were used as positive controls.

β -endorphin and POMC expressions, morphological preservation

β -endorphin immunoreactivity was examined to ascertain that the peptide was still present in cell bodies and fibers in the MBH after 180 min of incubation. The tissue sections (14- μ m) were prepared as described above. Slides were rinsed in 0.1 M Tris-buffered saline (TBS) and incubated overnight at room temperature with a rabbit polyclonal β -endorphin antibody diluted at 1:2000 with TBS containing 0.3 % Triton. Antigen-antibody binding sites were visualized using biotinylated-linked donkey anti-rabbit (1:200, for 90 min) (Vector laboratories, Burlingame, CA) and the standard peroxidase ABC amplification method (for 90 min) (Vector laboratories). After the DAB reaction, sections were observed with light microscopy. POMC mRNA expression in the MBH was assessed by *in situ* hybridization, as described above.

Microscopic analysis was also performed. MBH fragments, after 180-min of incubation in the survival medium or immediately after decapitation for controls, were immersed for 2 h in a fixative mixture of 2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 2 h at 4 C. Pieces of tissue were postfixed for 1 h at room temperature with 1% OsO₄ in phosphate buffer, and embedded in Araldite after dehydration. Ultrathin sections (80-90 nm thick) were obtained to observe the ultrastructural aspect of the MBH.

Statistical analysis

All experiments were conducted on at least five animals for each experimental condition. Results were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures, and the significance of differences was determined by the Bonferroni's *t*-test. Differences between groups were considered significantly different when $P < 0.05$.

Results

Effect of galanin on β -endorphin release from MBH fragments

We first determined the levels of β -endorphin release from MBH fragments exposed to various concentrations of galanin. Galanin induced a decrease of β -endorphin release from MBH fragments with respect to controls (Fig. 1). At the concentration of 500 nM, galanin induced, after 30 min of application, a 55% decrease of basal β -endorphin release ($P < 0.01$) (mean concentration of β -endorphin in the survival medium: 2.30 ± 0.22 ng/ml *versus* control: 5.01 ± 0.34 ng/ml) (Fig. 1A). The decrease in basal β -endorphin release occurred within 30 minutes after the addition of galanin into the medium and persisted during the following 30 minutes period ($P < 0.01$) (Fig. 1B). Galantide, a non-selective galanin receptor antagonist, did not significantly affect basal β -endorphin secretion but abrogated the inhibitory effect of galanin on β -endorphin release (concentration of β -endorphin in the survival medium: 4.60 ± 0.77 ng/ml, *versus* galanin 500 nM: 2.30 ± 0.22 ng/ml) (Fig. 1C).

Effect of a calcineurin (protein phosphatase 2B) inhibitor on galanin-induced inhibition of β -endorphin release

Since the activation of calcineurin has been suggested to underlie the inhibitory effect of galanin on exocytosis (20), MBH fragments were exposed to FK-506, a calcineurin inhibitor. FK-506 (10 μ M) reversed the inhibitory effect of galanin on β -endorphin release (concentration of β -endorphin in the survival medium: 7.01 ± 1.76 ng/ml, *versus* galanin 500 nM: 2.30 ± 0.22) (Fig. 2).

Effect of galanin on β -endorphin content in MBH tissues

β -endorphin levels were measured in MBH tissues after the 120-min of incubation-period. Exposure of MBH fragments to 500 nM galanin induced 2-fold increase ($P < 0.01$) in β -endorphin content (Fig. 3).

Effect of galanin on POMC mRNA levels

In situ hybridization histochemistry-coupled to densitometric analysis was performed in order to determine the relative changes in POMC mRNA levels in MBH fragments exposed to

various concentrations of galanin. Galanin induced an increase of the mean density of silver grains overlying POMC neurons compared to controls ($P < 0.01$) (Figs. 4 and 5). At a concentration of 500 nM galanin, a 30% increase in POMC mRNA levels was observed (Fig. 4A). The shortest lapse of time necessary for galanin (500 nM) to induce an increase in the POMC mRNA levels in MBH fragments was 60 min and the effect was more pronounced after 120 min of incubation with galanin (Fig. 4B). The non-selective galanin receptor antagonist galantide (500 nM) significantly inhibited the increase in POMC mRNA levels induced by 500 nM galanin (Fig. 4C). Galantide alone had no significantly effect on POMC mRNA levels compared to controls (Fig. 4C).

Expression of galanin receptor mRNAs in the MBH at the end of the incubation-period

In order to determine whether galanin receptor mRNAs were still expressed at the end of the incubation period, RT-PCR analysis was performed to investigate the expression of galanin receptor subtypes in MBH fragments incubated in the presence or absence of galanin (500 nM). Figure 6 shows that GalR1, GalR2, and GalR3 mRNAs were present in MBH fragments incubated at the end of a 120-min incubation period.

Preservation of MBH fragments after the incubation period

Several morphological controls were performed in order to assess the preservation of the MBH fragments at the end of the incubation period. Numerous β -endorphin immunoreactive- and POMC mRNA-expressing cells were still observed in the MBH after 180 min of incubation (Fig. 7, A and C). β -endorphin immunoreactivity was present in cell bodies and fibers (Fig. 7A and B). POMC mRNA-expressing cells were seen throughout the arcuate nucleus (Fig. 7C). These neurons were similar in number, location and morphology to previously described POMC neurons (12). Electron microscopic examination of MBH fragments revealed that the ultrastructure was well preserved after 180 min of incubation, and that the morphological aspect of the tissue was comparable to that of freshly dissected MBH fragments (Fig. 8). Precisely, the nerve endings were in close of contact cell bodies of the arcuate nucleus and the different organelles were well preserved (Fig. 8).

Discussion

The present study has demonstrated for the first time that galanin modulates POMC neuronal activity: galanin induces a transient decrease of spontaneous β -endorphin release associated with an increase in POMC mRNA levels in MBH fragments. Consistent with both the decrease in β -endorphin secretion and the increase in POMC mRNA expression, galanin treatment caused an accumulation of β -endorphin peptide in hypothalamic tissues. These effects appeared to be mediated through activation of galanin receptors inasmuch as they were antagonized by the non-selective galanin receptor antagonist galantide. The mRNAs encoding the 3 galanin receptor subtypes (GalR1, GalR2, and GalR3) were still expressed in the MBH tissues at the end of the incubation period suggesting their potential implication in the modulation of POMC neurons. In addition, the fact that FK-506 treatment reversed the effect of galanin on β -endorphin release, indicates that the protein phosphatase calcineurin is involved in the signaling pathway leading to the transient inhibition of β -endorphin release by galanin.

It is likely that most of the β -endorphin measured in the survival medium after our experiments resulted from β -endorphin release from the nerve endings located in the arcuate nucleus and/or from the few nerve endings located in the internal layer of the median eminence. The overall decrease in β -endorphin levels in the medium induced by galanin treatment could be ascribed to either a decrease in the release of β -endorphin or an increase in the degradation of β -endorphin. However, since the calcineurin inhibitor FK-506 abrogated the inhibitory effect of galanin on β -endorphin release, and since β -endorphin levels in MBH tissues were higher after application of galanin during 120-min, it appears that the inhibitory effect of galanin on β -endorphin release can be accounted for by a decrease of the release rather than an increase in the degradation of the peptide. Activation of calcineurin is thought to underlie the inhibitory effect of galanin on exocytosis (20). Calcineurin interacts with the signal transduction system inside the cells, specifically with the phosphorylation of calcium channels (21-23). In other models, previous reports indicate that protein dephosphorylation affected by calcineurin may suppress voltage-dependant Ca^{2+} -channel activity and, in doing so, inhibits evoked glutamate release from cerebral nerve terminals (24). The crucial role of an

increased cytoplasmic Ca^{2+} concentration for the initiation of exocytosis in neuroendocrine cells and nerve terminals has been extensively documented.

We found that galanin induces an increase in POMC mRNA levels. This effect of galanin on POMC mRNA levels might be due either to an increase of transcriptional activity or to an increase of POMC mRNA stability. It is also conceivable that, in addition to a direct effect of galanin on POMC neurons, the increase in POMC mRNA levels may result from the decrease in β -endorphin secreted in the medium after galanin treatment. Indeed, β -endorphin directly modulates POMC neuronal activity (25), particularly by decreasing POMC mRNA levels (26). Thus, the reduction of β -endorphin concentration in the survival medium may induce an increase of POMC mRNA levels. We can also speculate that the galanin-induced decrease in β -endorphin secretion together with the galanin-induced increase in POMC gene expression may cause the accumulation of β -endorphin peptide in the MBH fragments that we observed at the end of the incubation-period.

It is very likely that galanin exerts its modulatory effect directly on POMC neurons since (i) galanin-containing fibers make synaptic contacts with β -endorphin perikarya in the arcuate nucleus (27), (ii) high concentrations of ^{125}I -galanin binding sites occur in the arcuate nucleus and in the median eminence and the distribution of the recognition sites overlap with that of β -endorphin-immunoreactive cell bodies and nerve terminals (28), (iii) GalR1 and GalR2 receptor mRNAs are expressed in arcuate POMC neurons (12). In addition to an action through the GalR1 and GalR2 receptor subtypes, it cannot be excluded that galanin exerts its effect through the GalR3 receptor since we found by RT-PCR that the mRNA for this receptor is expressed in the MBH. Because of the lack of selective ligands for galanin receptors, it is not currently possible to determine the specific role of each receptor subtype in the modulation of POMC neuronal activity.

The differential effects of galanin on β -endorphin release and POMC mRNA levels can be accounted for by the distinct signal transduction pathways recruited by the three galanin receptor subtypes. GalR1 and GalR3 mediate some of their actions through Gi-linked pathways whereas GalR2 can pleiotropically couple through 3 distinct classes of G proteins with an approximately rank of order of $\text{Go} = \text{Gq} > \text{Gi}$ (29). These various signal transduction pathways induced by galanin receptor activation may lead to various intracellular events such as stimulation of inositol phosphate production and mitogen-activated protein kinase,

inhibition of adenylate cyclase and cAMP production (29), opening of K⁺ channels (30-32), and inhibition of voltage-gated Ca²⁺ channels (33-35). These various cellular events induced by activation of specific galanin receptor subtypes may then produce both stimulatory and inhibitory effects on the target cell.

The present data, together with previous studies showing the presence of an abundant network of galanin nerve terminals in the mediobasal hypothalamus (1), support the notion that the galanin may play an important physiological role in the regulation of β -endorphin release and POMC gene expression. Galanin as well as POMC have been shown to modulate various physiological functions such as reproduction, feeding behavior, or growth (for review, see 13). Furthermore, there is strong evidence that the galanin/POMC interrelation may be implicated in the regulation of GnRH neuronal activity. It has been reported that galanin stimulates GnRH release from arcuate nucleus-median eminence fragments (14). The fact that β -endorphin inhibits GnRH release (36) together with the present study showing that galanin decreases spontaneous β -endorphin release from MBH fragments, strongly suggests that the stimulatory effect of galanin on GnRH secretion can be mediated, at least in part, by attenuation of the β -endorphin-induced inhibition of GnRH secretion. Consistent with this hypothesis, we have recently shown that GalR1 and GalR2 mRNAs are preferentially expressed in rostral POMC neurons (12), a subpopulation of POMC neurons known to project preferentially to the preoptic area (37), and we have found that gonadal steroids modulate the expression of galanin receptors (12).

In addition, the modulatory effect of galanin on POMC neuronal activity may also be involved in the feedback exerted by estrogens at the level of the arcuate nucleus, on GnRH neurons. Indeed, almost half of the MBH galaninergic neurons express estrogen receptors (38) and galanin fibers observed within the arcuate nucleus originate from intrinsic neurons (27,39). However, while it is admitted that POMC neurons play a role in the estrogen feedback on GnRH neurons, only 5% of arcuate POMC neurons possess estrogen receptor (40-42) and there is little evidence supporting a role for β -endorphin neurons as direct estrogen-sensitive primary afferents to GnRH neurons (42). Thus, these data suggest that the estrogen feedback occurring on the POMC-GnRH network could be mediated, at least in part, by galanin neurons of the arcuate nucleus.

In conclusion, the present study provides new evidence for a functional relationship between galanin and POMC neurons in the hypothalamus. Our data show that galanin exerts a complex effect on POMC neuronal activity including a transient decrease in β -endorphin release associated with an increase in POMC mRNA levels and β -endorphin content in MBH tissues. Since POMC neurons expressing galanin receptors are likely to play a role in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis (12), we surmise that galanin may exert part of its effects on GnRH neuronal activity via the POMC neuronal system at the MBH level. This interrelationship between galanin and POMC neurons may contribute to the estrogen feedback occurring within the arcuate nucleus on GnRH neurons.

Acknowledgments

The authors thank Mrs G. Mortreux and V. Jérónimo for their excellent technical assistance and the Service Commun d'Imagerie Cellulaire (University of Lille II) for the image analysis system.

References

1. **Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A** 1986 Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 248:475-517
2. **Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A** 1993 Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40:711-769
3. **Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW** 2000 Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21:109-117
4. **Burgevin MC, Loquet I, Quarteronet D, Habert-Ortoli E** 1995 Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J Mol Neurosci* 6:33-41
5. **Howard AD, Tan C, Shiao LL, Palyha OC, McKee KK, Weinberg DH, Feighner SD, Cascieri MA, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Sullivan KA** 1997 Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin. *FEBS Lett* 405:285-290
6. **Kolakowski LF Jr, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateauneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG, O'Dowd BF** 1998 Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* 71:2239-2251
7. **Melander T, Hokfelt T, Nilsson S, Brodin E** 1986 Visualization of galanin binding sites in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 124:381-382
8. **Lagny-Pourmir I, Epelbaum J** 1992 Regional stimulatory and inhibitory effects of guanine nucleotides on [¹²⁵I]galanin binding in rat brain: relationship with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin. *Neuroscience* 49:829-847
9. **Mitchell V, Habert-Ortoli E, Epelbaum J, Aubert JP, Beauvillain JC** 1997 Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 66:160-172
10. **Mitchell V, Bouret S, Howard AD, Beauvillain JC** 1999 Expression of the galanin receptor subtype Gal-R2 mRNA in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16:265-277
11. **Waters SM, Krause JE** 2000 Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95:265-271
12. **Bouret S, Prevot V, Croix D, Howard A, Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V** 2000 Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus: effect of testosterone. *Endocrinology* 141: 1780-1794

13. **Crawley JN** 1995 Biological actions of galanin. *Regul Pept* 59:1-16
14. **Lopez FJ, Negro-Vilar A** 1990 Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* 127:2431-2436
15. **Aguila MC, Marubayashi U, McCann SM** 1992 The effect of galanin on growth hormone-releasing factor and somatostatin release from median eminence fragments in vitro. *Neuroendocrinology* 56:889-894
16. **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
17. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
18. **Wang AM, Doyle MV, Mark DF** 1989 Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9717-9721.
19. **Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty A.J, Shire D** 1992 Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 β stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multi-specific control. *Eur Cytokine Net* 3:553-563.
20. **Renstrom E, Ding WG, Bokvist K, Rorsman P** 1996 Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron* 17:513-522
21. **Schreiber SL, Crabtree GR** 1992 The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13:136-142
22. **Chad JE, Eckert R** 1986 An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed Helix neurones. *J Physiol* 378:31-51
23. **Armstrong DL** 1989 Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci* 12(3):117-122
24. **Sihra TS, Nairn AC, Kloppenburg P, Lin Z, Pouzat C** 1995 A role for calcineurin (protein phosphatase-2B) in the regulation of glutamate release. *Biochem Biophys Res Commun* 212:609-616
25. **Bouret S, Prevot V, Croix D, Jegou S, Vaudry H, Stefano GB, Beauvillain JC, Mitchell V** 1999 Mu-opioid receptor mRNA expression in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus. *Brain Res Mol Brain* 70:155-158

26. **Garcia de Yebenes E, Pelletier G** 1993 Opioid regulation of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the rat brain as studied by in situ hybridization. *Neuropeptides* 25:91-94
27. **Horvath TL, Kalra SP, Naftolin F, Leranth C** 1995 Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 7:579-588
28. **Nordstrom O, Melander T, Hokfelt T, Bartfai T, Goldstein M** 1987 Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence. *Neurosci Lett* 73:21-26
29. **Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE** 1998 Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochemistry* 37:6711-6717
30. **Ahren B, Berggren PO, Bokvist K, Rorsman P** 1989 Does galanin inhibit insulin secretion by opening of the ATP-regulated K⁺ channel in the beta-cell? *Peptides* 10:453-457
31. **Dunne MJ, Bullett MJ, Li GD, Wollheim CB, Petersen OH** 1989 Galanin activates nucleotide-dependent K⁺ channels in insulin-secreting cells via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *EMBO J* 8:413-420
32. **Papas S, Bourque CW** 1997 Galanin inhibits continuous and phasic firing in rat hypothalamic magnocellular neurosecretory cells. *J Neurosci* 17:6048-6056
33. **Merriam LA, Parsons RL** 1995 Neuropeptide galanin inhibits omega-conotoxin GVIA-sensitive calcium channels in parasympathetic neurons. *J Neurophysiol* 73:1374-1382
34. **Drews G, Debuyser A, Nenquin M, Henquin JC** 1990 Galanin and epinephrine act on distinct receptors to inhibit insulin release by the same mechanisms including an increase in K⁺ permeability of the B-cell membrane. *Endocrinology* 126:1646-1653
35. **Drews G, Debuyser A, Henquin JC** 1994 Significance of membrane repolarization and cyclic AMP changes in mouse pancreatic B-cells for the inhibition of insulin release by galanin. *Mol Cell Endocrinol* 105:97-102
36. **Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, Seilicovich A, Gimeno M, McCann SM, Rettori V** 1999 beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1722-1726
37. **Cheung S, Hammer RP Jr** 1995 Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat. *Neuroendocrinology* 62:283-292

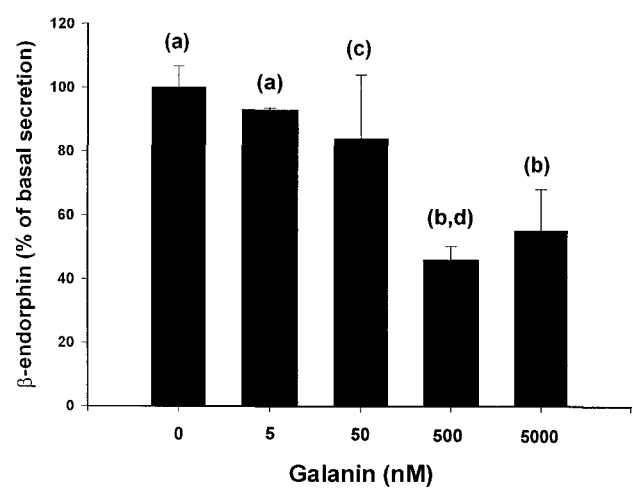
38. **Horvath TL, Leranth C, Kalra SP, Naftolin F** 1995 Galanin neurons exhibit estrogen receptor immunoreactivity in the female rat mediobasal hypothalamus. *Brain Res* 675:321-324
39. **Meister B, Ceccatelli S, Hökfelt T, Anden NE, Anden M, Theodorsson E** 1989 Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76:343-368
40. **Morrell JI, McGinty JF, Pfaff DW** 1985 A subset of beta-endorphin- or dynorphin-containing neurons in the medial basal hypothalamus accumulates estradiol. *Neuroendocrinology* 41:417-426
41. **Jirikowski GF, Merchenthaler I, Rieger GE, Stumpf WE** 1986 Estradiol target sites immunoreactive for beta-endorphin in the arcuate nucleus of rat and mouse hypothalamus. *Neurosci Lett* 65:121-126
42. **Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE** 1999 Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 411:346-358

TABLE 1. Sense and antisense primers for β -actin, GalR1, GalR2, and GalR3

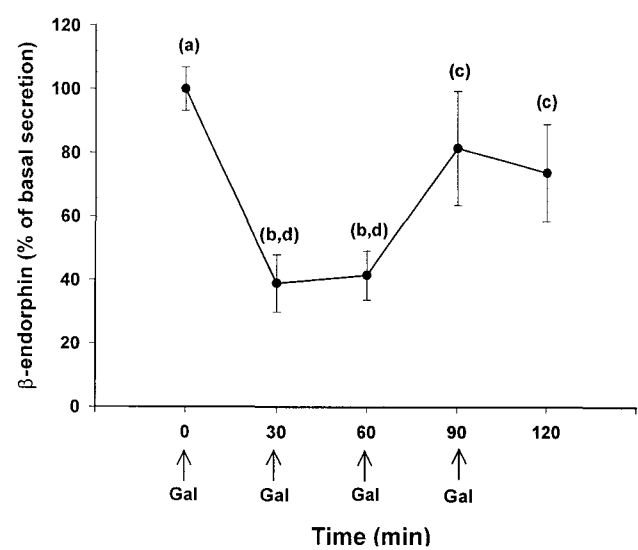
Primer pair	Sequence
β -actin sense	5'-GCAAGCGCTCCTACTCCAT-3'
β -actin anti-sense	5'-TCACTGGCCCTTCTTGTGCA-3'
GalR1 sense	5'-AACCTCCAGCGGAACCCAGG-3'
GalR1 anti-sense	5'-CATAGCGATCCACAGACATCG-3'
GalR2 sense	5'-ATGAATGGCTCCGGCAGCCA-3'
GalR2 anti-sense	5'-AACAGCCTTGCAGAGCAGCG-3'
GalR3 sense	5'-CTGTGGCAGTGCCTGTGATC-3'
GalR3 anti-sense	5'-TGCCGCACAGCCAGGTACCT-3'

Fig. 1. Effect of galanin on β -endorphin release by rat MBH fragments. (A) Effect of graded concentrations of galanin (30 min) on β -endorphin release. (B) Time-course of the effect of galanin (500 nM) on β -endorphin release. MBH fragments were incubated with 500 nM galanin for 120 min and β -endorphin levels were measured in the survival medium every 30 min. (C) Effect of the non-selective galanin receptor antagonist galantide on basal and galanin-induced inhibition of β -endorphin release. MBH fragments were incubated for 30 min with 500 nM galanin in the absence or presence of 500 nM galantide. Values are mean \pm SEM. Statistical differences ($P < 0.01$) among the average values for each concentration of galanin are indicated as a *versus* b, and c *vs.* d.

A



B



C

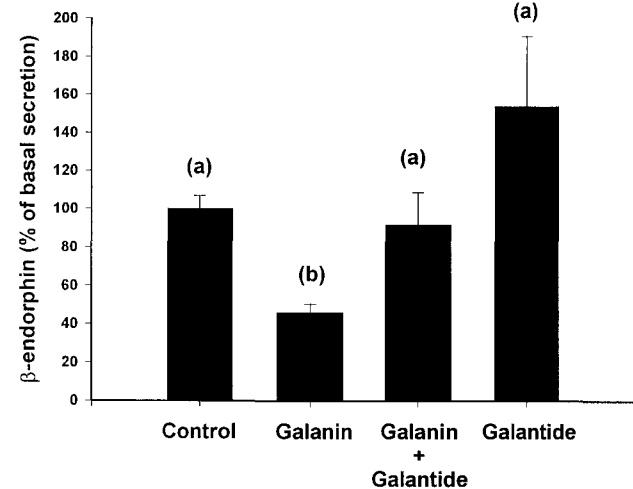


Fig. 2. Effect of the calcineurin inhibitor FK-506 on the galanin-evoked inhibition of β -endorphin release. MBH fragments were incubated for 30 min with 500 nM galanin in the absence or presence of 10 μ M FK-506. Controls consisted in incubating MBH fragments with buffer alone. Values are mean \pm SEM. Statistical differences ($P < 0.01$) among the average values for each conditions are indicated as a *versus* b.

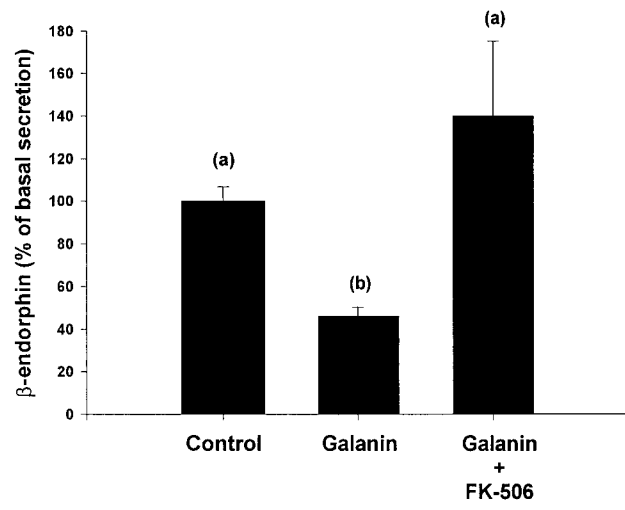


Fig. 3. β -endorphin content in MBH tissues incubated in absence (control) or presence of 500 nM galanin for 120 min. Values are mean \pm SEM. Statistical differences ($P < 0.01$) among the average values for each concentration of galanin are indicated as a *versus* b.

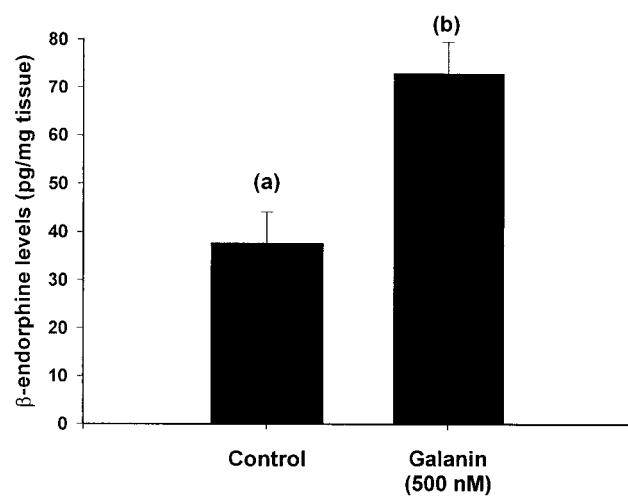
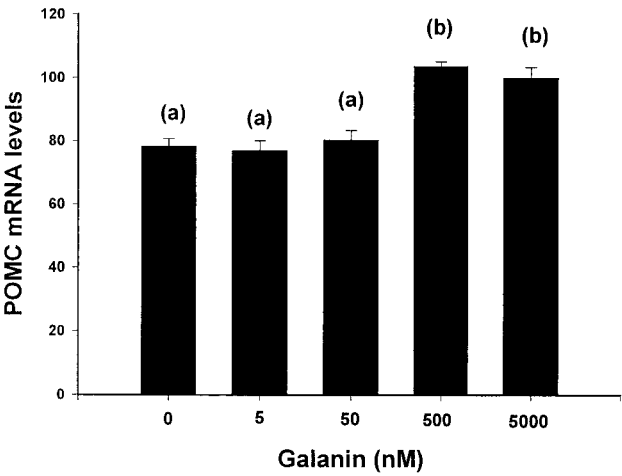
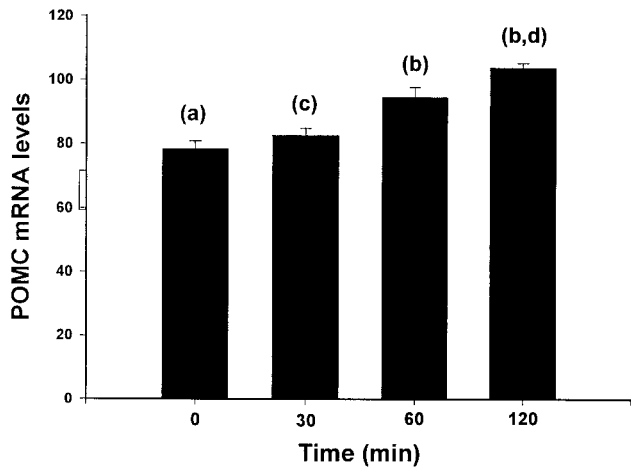


Fig. 4. Effect of galanin on POMC mRNA levels. The relative concentrations of POMC mRNA were quantified by *in situ* hybridization. (A) Effect of graded concentrations of galanin (120 min) on POMC mRNA levels. (B) Time-course of the effect of galanin on POMC mRNA levels. Galanin (500 nM) was added 0, 30, 60, or 120 min before the end of the incubation period. (C) Effect of the non-selective galanin receptor antagonist galantide on basal and galanin-induced POMC mRNA levels. Values are mean \pm SEM. Statistical differences ($P < 0.01$) among the average values are indicated as a *versus* b, and c *vs.* d.

A



B



C

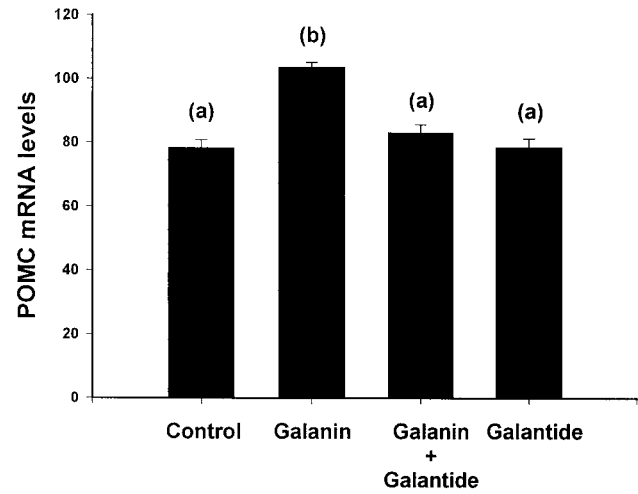


Fig. 5. Darkfield photomicrographs showing POMC mRNA-expressing neurons in the arcuate nucleus from galanin (500 nM)-treated or control MBH fragments. Note the higher level of expression of POMC mRNA in galanin-treated (A) as compared to control (B) MBH fragments. Scale bar, 15 μ m.

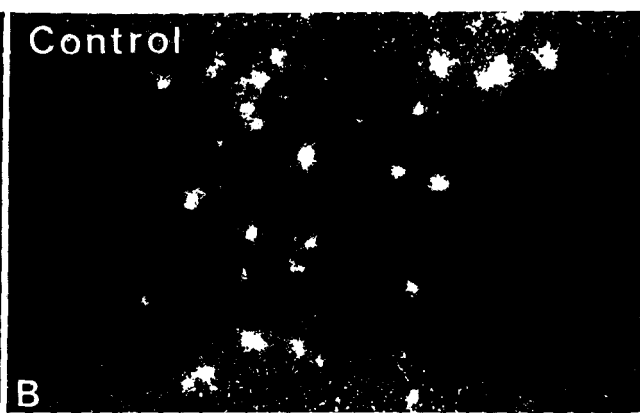
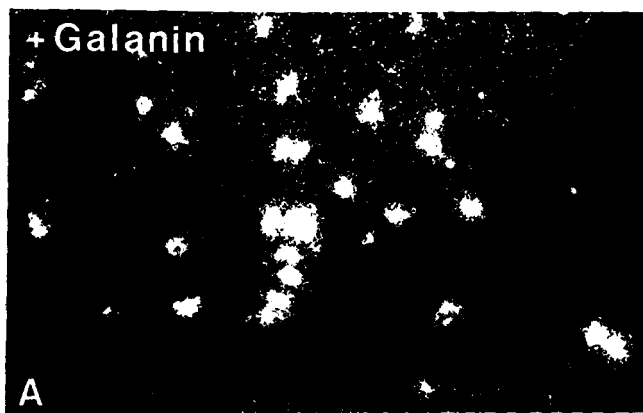


Fig. 6. RT-PCR analysis of GalR1, GalR2, and GalR3 mRNA expression. RT products, isolated from MBH fragments incubated for 120 min in the presence (lanes 1-3) or absence (lanes 4-6) of 500 nM galanin, were used in PCR reactions with galanin receptor or β -actin primers. Primers for GalR1, GalR2, and GalR3 generated the expected nucleotide fragment (351 bp, 640 bp, and 327 bp respectively) as shown by plasmid control amplified products (lane P). β -actin (238 bp) was amplified as internal control. M, molecular size markers.

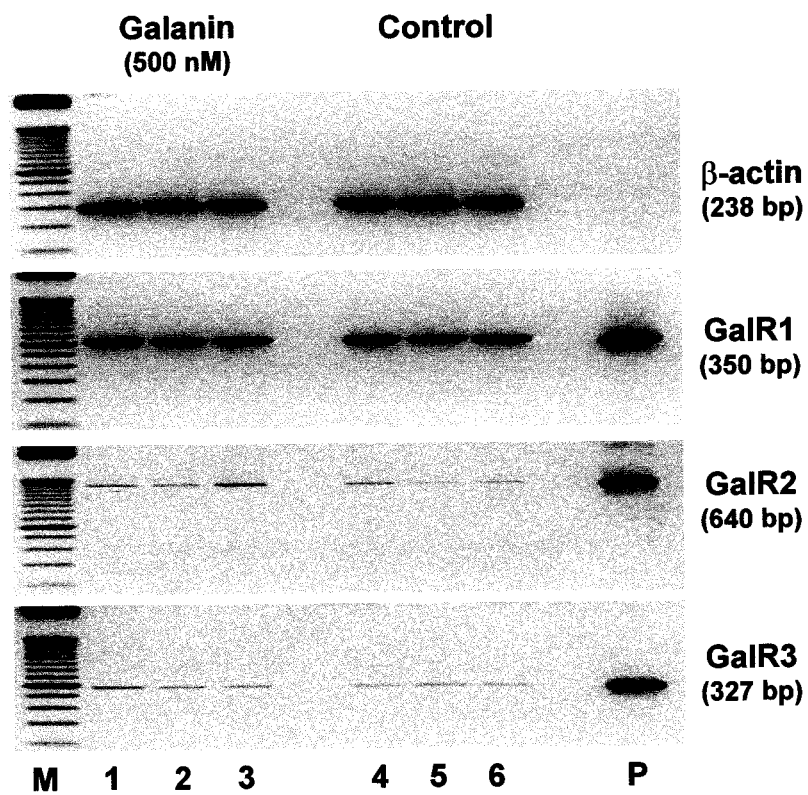


Fig. 7. Brightfield photomicrographs showing β -endorphin-immunoreactive (A,B) and POMC mRNA-expressing (C) neurons in MBH fragments after 180 min of incubation. *Dark* precipitates (A, B) indicate processes immunoreactive for β -endorphin. *Black* silver grains (C) indicate cells labeled with a ^{35}S cRNA probe for POMC mRNA. Small arrows point to β -endorphin-immunoreactive fibers and large arrows point to β -endorphin-immunoreactive cell bodies. Asterisk, third ventricle. Scale bar, 100 μm (A,C); 20 μm (B).

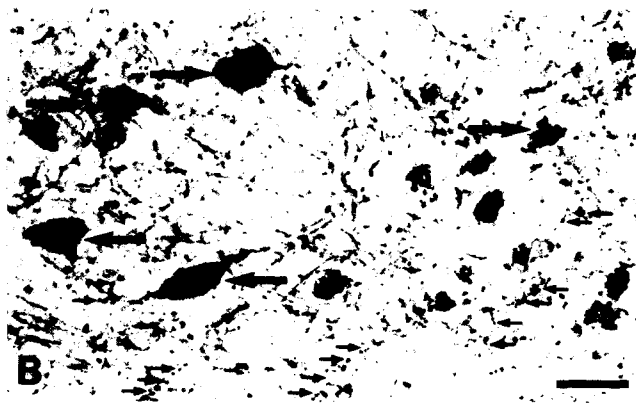
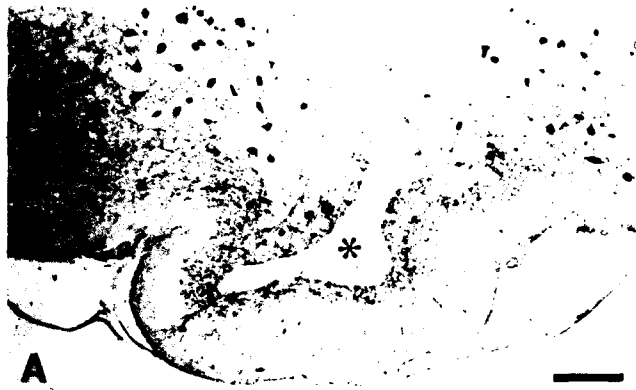
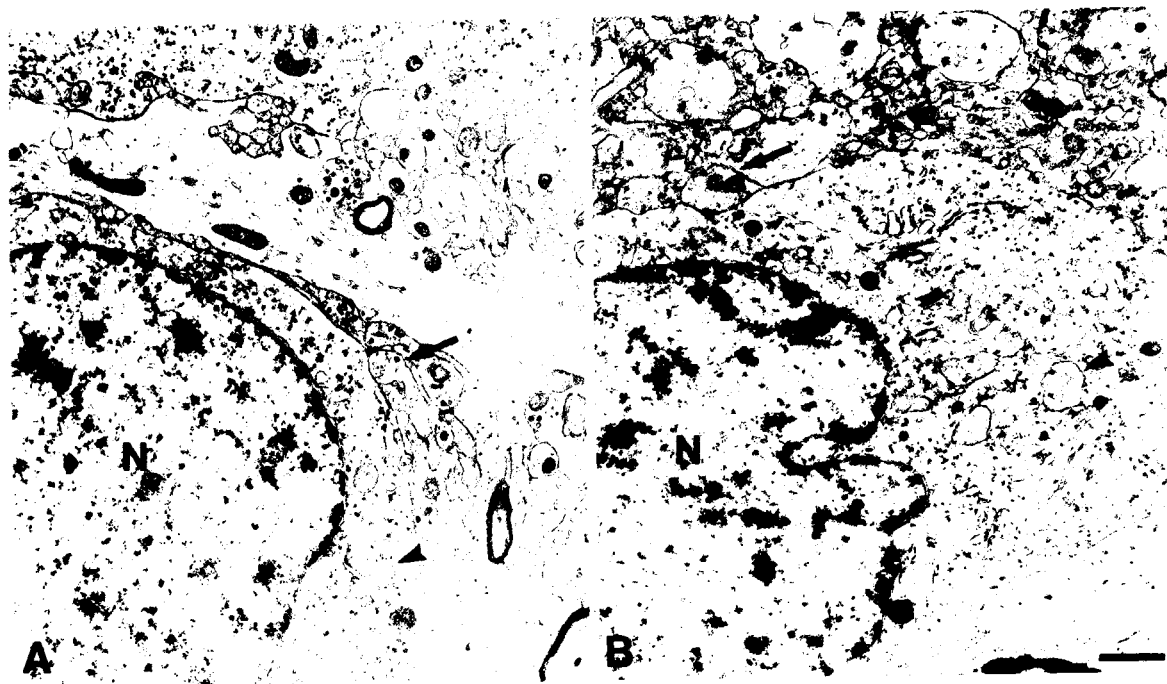


Fig. 8. Electron microphotographs of ultrathin sections showing the ultrastructure of the arcuate nucleus from freshly dissected (A) or 180 min-incubated (B) MBH fragments. Arrows point to nerve endings; arrowheads point to mitochondria. N, nucleus. Scale bar, 0.45 μm



Les résultats de notre étude montrent que la galanine induit une inhibition de la libération spontanée de β -endorphine à partir de fragments d'hypothalamus médiobasaux. Cet effet est observé, et est maximal, dès les trente premières minutes d'application de galanine. De plus, l'inhibition des effets de la galanine par le FK-506 suggère que la galanine inhibe la libération de β -endorphine par activation de la calcineurine. Dans un deuxième temps, c'est à dire après 60 min d'application, la galanine induit une augmentation des taux relatifs d'ARNm codant la POMC présents dans les neurones du noyau arqué. Par ailleurs, la galantide antagonise les effets de la galanine sur la libération de β -endorphine et l'expression de l'ARNm codant la POMC, ce qui suggère que la galanine agit spécifiquement via l'activation de ses récepteurs.

L'ensemble de ces résultats nous permet d'envisager que la galanine induit une accumulation de β -endorphine dans le neurone (à la fois en augmentant l'activité transcriptionnelle ou la stabilité du transcrit POMC et en inhibant la libération du peptide). Cette hypothèse est confirmée par nos dosages de β -endorphine réalisés dans les tissus après incubation et montrant une accumulation massive de β -endorphine, après 120 minutes d'incubation avec la galanine, dans les fragments d'hypothalamus médiobasaux.

Enfin nous ne pouvons écarter l'hypothèse selon laquelle la galanine induirait ses effets via le GalR3 puisque nos résultats de RT-PCR montrent que l'ARNm codant ce récepteur est exprimé, au même titre que le GalR1 et le GalR2, dans les fragments d'hypothalamus médiobasaux incubés.

Article 3

" μ -opioid receptor mRNA expression in proopiomelanocortin
neurons of the rat arcuate nucleus "

S. Bouret, V. Prevot, D. Croix, S. Jégou, H. Vaudry, G.B. Stefano,
J.C. Beauvillain, V. Mitchell

Molecular Brain Research 1999 Vol. 70, N°1, pp. 155-158

II. Auto-régulation des neurones à POMC par la β -endorphine

L'utilisation de la morphine a permis d'établir que les opioïdes modulaient l'activité des neurones à POMC. En effet, l'injection périphérique de morphine induit une diminution des niveaux d'expression d'ARNm POMC dans le noyau arqué (Bronstein *et al.*, 1990 ; Garcia de Yebenes et Pelletier, 1993 ; Wardlaw *et al.*, 1996 ; Fang *et al.*, 1998). Ainsi, lors de cette troisième étude, il nous est apparu important de déterminer si l'action de la β -endorphine sur l'activité des neurones à POMC était directe. En d'autres termes, l'existence de contacts synaptiques aso-somatiques et axo-dendritiques entre les neurones à POMC ayant déjà été démontrée (Chen et Pelletier, 1983 ; Kiss et Williams, 1983), nous avons voulu savoir si les neurones à POMC exprimaient le récepteur μ aux peptides opioïdes, récepteur sur lequel la β -endorphine se fixe à haute affinité. A cet effet, nous avons entrepris un double marquage par hybridation *in situ* utilisant des ARNm antisens du récepteur μ marqués au ^{35}S et des ARNm antisens de la POMC marqués à la digoxigénine. Le pourcentage de neurones à POMC exprimant l'ARNm codant le récepteur μ a été régionalisé et quantifié à deux niveaux antéro-postérieurs du noyau arqué.

Short communication

μ -Opioid receptor mRNA expression in proopiomelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus

Sebastien Bouret ^{a,*}, Vincent Prevot ^a, Dominique Croix ^a, Sylvie Jégou ^b, Hubert Vaudry ^b, George B. Stefano ^{c,d}, Jean-Claude Beauvillain ^a, Valerie Mitchell ^a

^a INSERM U 422, IFR 22, Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, place de Verdun, Lille Cedex 59045, France

^b INSERM U 413, IFRMP 23, Mont-Saint-Aignan Cedex 76821, France

^c Mind / Body Medical Institute, Beth Israel Deaconess Medical Center, 1 Deaconess Road, Boston, MA 02215, USA

^d Neuroscience Research Institute, State University of New York at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568, USA

Accepted 30 March 1999

Abstract

It has been previously demonstrated that the activity of proopiomelanocortin (POMC)-containing neurons in the rat arcuate nucleus is regulated by opiates, but the expression of opioid receptors in POMC neurons has never been reported. In the present study, we have applied a double-labeling in situ hybridization technique to investigate the occurrence of μ -opioid receptor mRNA on POMC neurons. We have found that $20 \pm 3\%$ of arcuate POMC neurons express μ -opioid receptor mRNA and that the proportion of POMC neurons expressing μ -opioid receptor is higher in the caudal than in the rostral portion of the arcuate nucleus. Our data suggest that POMC neurons might be both auto-regulated by β -endorphin, and regulated by enkephalins. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Proopiomelanocortin; Enkephalin; β -Endorphin; μ -Opioid receptor; Arcuate nucleus; Reproduction

Proopiomelanocortin (POMC) is the precursor of the opioid peptide β -endorphin as well as a number of other bioactive peptides, including adrenocorticotropin (ACTH) and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). In the arcuate nucleus, the POMC gene is expressed by a subpopulation of neurons whose activity is controlled by various signaling molecules, such as GABA, galanin, neuropeptide Y and leptin [1,4,5,10]. Morphological observations suggest that POMC neurons may be directly regulated by opioid peptides, especially by POMC- and proenkephalin-derived peptides [9,17,26]. In support of this hypothesis, electrophysiological studies performed on hypothalamic slices have shown that opioid peptides decrease the spontaneous activity of POMC arcuate neurons [16]. These observations suggest that POMC neurons may be either auto-regulated by β -endorphin, or regulated by enkephalins.

Although the activity of POMC neurons can be regulated by opioid peptides, the occurrence of opioid receptors in POMC neurons of the arcuate nucleus has never been documented. In fact, the overall density of μ -opioid recep-

tors in the arcuate nucleus is relatively low [19] and only a few neurons of the arcuate nucleus express the μ -receptor gene [18,19]. In the present study, we have applied a double-labeling in situ hybridization technique to investigate the possible occurrence of μ -receptor mRNA in POMC-expressing neurons of the rat arcuate nucleus.

Four adult female Wistar rats weighing 250–275 g (CERJ, France) were maintained on a 14-h light, 10-h dark schedule, with food and water available ad libitum. After anaesthesia with ketamine (20 mg/kg)/xylazine (0.2 ml/kg), animals were perfused intracardially with 5–10 ml saline followed by 500 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The brains were removed and immersed in the same fixative for 2 h. Brains were then washed overnight in 0.05 M Coons veronal buffer, (pH 7.4), containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, IC), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14 μ m coronal sections were collected onto gelatine-coated slides from the level of -1.8 to -4.8 mm relative to bregma of the atlas of Paxinos and Watson [21]. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), regarding mammalian research.

* Corresponding author. Fax: +33-3-20-62-20-61; E-mail: bouret@biserte.lille.inserm.fr

A TMVI vector containing a 540-bp *EcoRI*/*HindIII* fragment of μ -opioid peptide receptor cDNA (kindly provided by H. Akil, USA) was linearized by cutting at a single site with *EcoRI* for the antisense probe or *HindIII* for the sense probe. In vitro transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense μ -opioid peptide receptor probes and [35 S]CTP (Amersham, France).

A 409-bp DNA fragment (position 221–269 bp of the POMC gene exon III) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the rat POMC gene subcloned in pBR322 (provided by Dr. Drouin, Montreal, Canada). The PCR fragment was subcloned into the pCRTMII vector. *HindIII* and T7 made the antisense probe, and *XhoI* with Sp6 polymerase produced the sense probe for POMC. In vitro transcription was performed using a digoxigenin RNA labeling mixture (Boehringer Mannheim, France).

Double-labeling in situ hybridization was performed as previously described [20]. Briefly, processed tissues were hybridized with the riboprobe-hybridization buffer mix, containing 35 S-labeled μ -receptor cRNA probe (30,000 c.p.m./ μ l) plus the digoxigenin-labeled POMC cRNA probe (1:200). Overnight hybridization at 55°C was followed by RNase treatment, a series of stringent washes, including a high-stringency wash at 60°C. Tissue slices were incubated with antidigoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase and stained with NBT and BCIP (Boehringer Mannheim, France). The slices were then dehydrated in 70% and 100% ethanol in ammonium acetate, and dipped in K5 emulsion (Integra Biosciences, France). Following a 20-day exposure, slides were developed.

Using the rat brain atlas of Paxinos and Watson [21] as an anatomical guide, the arcuate nucleus was divided into two areas of approximately equal length in the rostral-caudal plane. Four tissue sections per rostro-caudal area

were analyzed for each animal. POMC mRNA-expressing cells, represented by cell bodies with blue reaction product, were counted under a $\times 20$ objective at bright-field illumination with a Zeiss Axioskop (Zeiss, Germany). Each digoxigenin-labeled POMC neuron was examined for the presence of silver grains using alternative observations in bright-field and dark-field illuminations. The total number of single or double-labeled cells per hemisection was counted for each animal. From these data, the proportion of POMC neurons expressing μ -receptor mRNA in each area was calculated and averaged to determine its regional distribution.

The POMC mRNA-containing neurons were widely distributed throughout the arcuate nucleus. These neurons were similar in location, number and morphology to previously described POMC [11,25] and β -endorphin neurons [12]. Scattered μ -opioid receptor mRNA-labeled cells were detected throughout the rostro-caudal regions as previously described [19]. Some POMC neurons exhibited silver grain clusters lying directly over the cells, reflecting the presence of μ -opioid receptor mRNA (Fig. 1). The density of grains over each cell was moderate, in agreement with a previous study demonstrating that expression of μ -receptor mRNA is low in arcuate cells [19].

Quantitative analysis showed that, in the whole arcuate nucleus, $20 \pm 3\%$ of the POMC mRNA-containing neurons expressed μ -opioid receptor mRNA. The proportion of POMC neurons expressing the μ -opioid receptor mRNA was higher in the caudal than in the rostral part of the arcuate nucleus (Fig. 2).

The presence of μ -opioid receptor mRNA in POMC cell bodies provides clear-cut evidence for a direct action of opioid peptides on arcuate POMC neurons in the rat and are consistent with the hypothesis that arcuate POMC neurons are interconnected as well [9]. These data are consistent with previous studies showing that opiates mod-

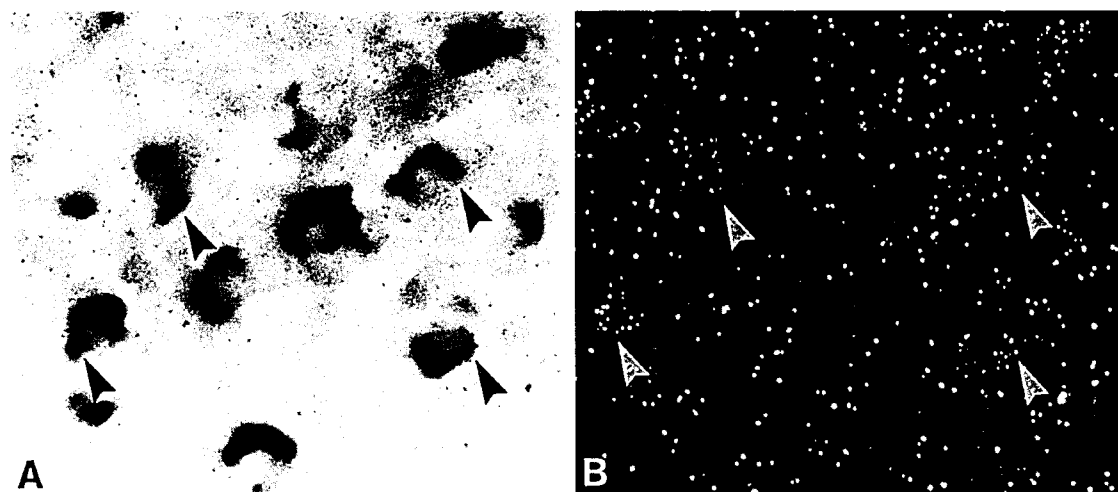


Fig. 1. Bright-field (A) and dark-field (B) microphotographs showing POMC mRNA-expressing neurons (dark precipitate) and μ -opioid peptide receptor mRNA-expressing cells (silver grains). Black and white arrows point to POMC neurons expressing μ -opioid receptor mRNA.

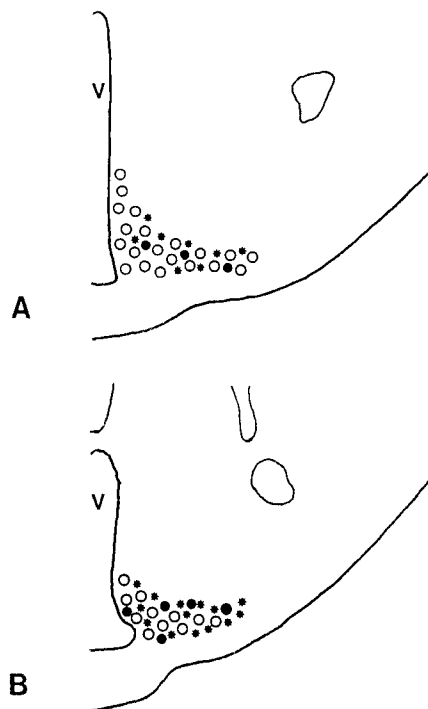


Fig. 2. Schematic drawings showing the distribution of cells expressing POMC mRNA (open circles), μ -mRNA (stars) or POMC and μ -mRNAs (solid circles) in two representative sections of the arcuate nucleus (A: rostral level; B: caudal level). V = third ventricle.

ulate the expression of both POMC mRNA and POMC-derived peptides [6,13,24]. Our results are in agreement with electrophysiological studies showing that opioid peptides hyperpolarize β -endorphin-containing neurons of the rat hypothalamus through activation of μ -receptors [16]. The fact that POMC makes synaptic contacts with POMC neurons [9] provides additional support for a physiological role of μ -receptors in the regulation of POMC neuron activity in the arcuate nucleus.

Otherwise, enkephalin may also modulate POMC neuronal activity via the μ -opioid receptor since enkephalin-containing terminals make synaptic contacts with POMC neurons while no expression of δ -opioid receptor has been reported in the arcuate nucleus [18,26].

The functional significance of the POMC interconnections as well as the interrelation between enkephalinergic and POMC neurons remain to be determined. As demonstrated by the results of the present study, their physiological roles can be associated with a greater number of functions since POMC neurons project to many brain areas. Among these functions, it is likely that POMC neurons are involved in prehypophyseotropic systems as the hypothalamic–pituitary–gonadal axis (HPG) and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA). For HPG regulation, β -endorphin is thought to be an important inhibitor of GnRH neuronal activity by their projection into the preoptic area [11]. For HPA regulation, POMC neurons are

known to modulate CRH secretion [7]. Otherwise, some CRH neurons co-express enkephalin in the rat [8,14,15], and thus, a CRH/enkephalin pathway could be involved in a short loop feedback regulation of POMC neurons.

However, if these results argue in favor of linkage between opioid systems, recent results have also revealed the presence of an endogenous morphine material in perikarya, fibers, and terminals [2,3]. Arguments for existence of regulations implicating morphine have also been given by several laboratories [22,23]. Therefore, we cannot discard that an opiate could also regulate the activity of POMC neurons by acting on the μ -receptor.

In summary, this study demonstrates that, in the arcuate nucleus, opioids might directly modulate the activity of POMC neurons via an action on the μ -opioid receptor. These results definitely shows that β -endorphin can exert a direct regulatory feedback on these neurons.

Acknowledgements

This work was supported by the LARC opioid peptides program and the University of Lille II.

References

- [1] C. Blasquez, S. Jegou, M. Feuilloley, A. Rosier, F. Vandesande, H. Vaudry, Visualization of gamma-aminobutyric acid A receptors on proopiomelanocortin-producing neurons in the rat hypothalamus, *Endocrinology* 135 (1994) 2759–2764.
- [2] E. Bianchi, C. Alessandrini, M. Guarna, A. Tagliamonte, Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons, *Brain Res.* 627 (1993) 210–215.
- [3] E. Bianchi, M. Guarna, A. Tagliamonte, Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine, *Adv. Neuroimmunol.* 4 (1994) 83–92.
- [4] S. Bouret, V. Prevot, A.D. Howard, E. Habert-Ortoli, S. Jegou, H. Vaudry, P. Vemersch, J.C. Beauvillain, V. Mitchell, Differential coexpression of galanin receptor (GalR1, GalR2) and proopiomelanocortin (POMC) mRNAs in the rat arcuate nucleus, *Soc. Neurosci. Abstr.* 24 (1998) 1609.
- [5] C. Broberger, M. Landry, H. Wong, J.N. Walsh, T. Hökfelt, Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are, respectively, expressed in proopiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus, *Neuroendocrinology* 66 (1997) 393–408.
- [6] D.M. Bronstein, R. Przewlocki, H. Akil, Effects of morphine treatment on proopiomelanocortin systems in rat brain, *Brain Res.* 519 (1990) 102–111.
- [7] J.C. Buckingham, Stimulation and inhibition of corticotrophin releasing factor secretion by beta endorphin, *Neuroendocrinology* 42 (1986) 148–152.
- [8] S. Ceccatelli, M. Eriksson, T. Hökfelt, Distribution and coexistence of corticotrophin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus, *Neuroendocrinology* 49 (1989) 309–323.
- [9] Y.Y. Chen, G. Pelletier, Demonstration of contacts between proopiomelanocortin neurons in the rat hypothalamus, *Neurosci. Lett.* 43 (1983) 271–276.
- [10] C.C. Cheung, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Proopiomelanocortin neu-

- rons are direct targets for leptin in the hypothalamus, *Endocrinology* 138 (1997) 4489–4492.
- [11] S. Cheung, R.P. Hammer, Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat, *Neuroendocrinology* 62 (1995) 283–292.
 - [12] J.C. Finley, P. Lindstrom, P. Petrusz, Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain, *Neuroendocrinology* 33 (1981) 28–42.
 - [13] E. Garcia de Yebenes, G. Pelletier, Opioid regulation of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the rat brain as studied by in situ hybridization, *Neuropeptides* 25 (1993) 91–94.
 - [14] S. Hisano, S. Daikoku, N. Yanaihara, T. Shibasaki, Intracellular colocalization of CRF and Met-Enk-8 in nerve terminals in the rat median eminence, *Brain Res.* 370 (1986) 321–326.
 - [15] T. Hökfelt, J. Fahrenkrug, K. Tatemoto, V. Mutt, S. Werner, A.L. Hulting, L. Terenius, K.J. Chang, The PHI (PHI-27)/corticotropin-releasing factor/enkephalin immunoreactive hypothalamic neuron: possible morphological basis for integrated control of prolactin, corticotropin, and growth hormone secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 895–898.
 - [16] M.J. Kelly, M.D. Loose, O.K. Ronnekleiv, Opioids hyperpolarize beta-endorphin neurons via mu-receptor activation of a potassium conductance, *Neuroendocrinology* 52 (1990) 268–275.
 - [17] J.Z. Kiss, T.H. Williams, ACTH-immunoreactive boutons form synaptic contacts in the hypothalamic arcuate nucleus of rat: evidence for local opiocortin connections, *Brain Res.* 263 (1983) 142–146.
 - [18] A. Mansour, C.A. Fox, S. Burke, F. Meng, R.C. Thompson, H. Akil, S.J. Watson, Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study, *J. Comp. Neurol.* 350 (1994) 412–438.
 - [19] V. Mitchell, V. Prevot, J.C. Beauvillain, Distribution and diurnal variations of the mu opioid receptor expression in the arcuate nucleus of the male rat, *Neuroendocrinology* 67 (1998) 94–100.
 - [20] V. Mitchell, V. Prevot, L. Jennes, J.P. Aubert, D. Croix, J.C. Beauvillain, Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat, *NeuroReport* 8 (1997) 3167–3172.
 - [21] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn., Academic Press, Sidney, 1986.
 - [22] G.B. Stefano, B. Scharer, Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers, *Adv. Neuroimmunol.* 4 (1994) 57–67.
 - [23] G.B. Stefano, B. Scharer, E.M. Smith, T.K. Hughes Jr., H.I. Magazine, T.V. Bilfinger, A.R. Hartman, G.L. Fricchione, Y. Liu, M.H. Makman, Opioid and opiate immunoregulatory processes, *Crit. Rev. Immunol.* 16 (1996) 109–144.
 - [24] S.L. Wardlaw, J. Kim, S. Sobieszczek, Effect of morphine on proopiomelanocortin gene expression and peptide levels in the hypothalamus, *Mol. Brain Res.* 41 (1996) 140–147.
 - [25] J.N. Wilcox, J.L. Roberts, Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels, *Endocrinology* 117 (1985) 2392–2396.
 - [26] R. Zhang, S. Hisano, M. Chikamori-Aoyama, S. Daikoku, Synaptic association between enkephalin-containing axon terminals and proopiomelanocortin-containing neurons in the arcuate nucleus of rat hypothalamus, *Neurosci. Lett.* 82 (1987) 151–156.

Nos résultats d'hybridation *in situ* montrent qu'environ 20% des neurones à POMC expriment l'ARNm codant le récepteur aux opioïdes μ . Ceci suggère que les opioïdes, et plus particulièrement la β -endorphine, pourraient moduler directement l'activité des neurones à POMC. Ces résultats suggèrent ainsi une possible autorégulation des neurones à POMC.

La régionalisation nous permet d'établir qu'une plus forte proportion de neurones à POMC exprimant l'ARNm codant le récepteur μ est localisée dans le noyau arqué postérieur. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'étude de Fang *et al.* (1998) montrant que la diminution des niveaux d'ARNm POMC induite par la morphine est plus prononcée dans la partie postérieure du noyau arqué que dans sa partie antérieure suggérant que, de façon endogène, les neurones à POMC seraient plus sensibles à l'action de la β -endorphine dans la partie caudale du noyau arqué.

Article 4

" Evidence that transforming growth factor- β may directly modulate proopiomelanocortin neuronal activity in the female rat arcuate nucleus "

S. Bouret, M. Tran Van Choi-Mariot, V. Prevot, D. Croix, T. Takumi,
S. Jégou, H. Vaudry, J.C. Beauvillain, V. Mitchell

- *soumis* -

III. Implication des cellules gliales, via le TGF β , dans la régulation de l'activité des neurones à POMC

Il est désormais admis que les cellules gliales participent activement à la régulation de l'activité de nombreuses populations neuronales. Au niveau hypothalamique, une étude réalisée chez la caille a montré que l'augmentation de la sécrétion de LH était précédée par une augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-fos* par les astrocytes hypothalamiques (Meddle et Follett, 1997). Cette observation suggère que les cellules gliales peuvent être impliquées dans la régulation des processus physiologiques conduisant à la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH. De plus, il a été montré que les cellules gliales expriment le récepteur aux œstrogènes (Langub *et al.*, 1992 ; Buschanan *et al.*, 2000 ; Cardona-Gomez *et al.*, 2000), L'équipe d'Ojeda (pour revue, voir Ojeda *et al.*, 2000) a été la première à montrer que les cellules gliales synthétisaient des facteurs de croissance, en particulier le TGF- α et les neurégulines -deux membres de la famille de l'epidermal growth factor (EGF)- et à impliquer ces facteurs gliaux dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. Plus récemment, Melcangi et ses collaborateurs ont mis en évidence *in vitro* qu'un autre facteur astrocytaire, le TGF β , pouvait moduler la sécrétion de GnRH (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996 ; Messi *et al.*, 1999). Récemment, nous avons montré que l'ARNm codant l'un des récepteurs au TGF β (le récepteur sérine-thréonine kinase B1 de type I au TGF β et à l'activine) était exprimé dans les régions hypothalamiques associées à la régulation du système à GnRH (Prevot *et al.*, 2000b). L'expression de ce récepteur dans le noyau arqué, nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une régulation de l'activité des neurones à POMC par le TGF β et ainsi de l'existence d'une communication entre les astrocytes du noyau arqué et les neurones à POMC.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier l'effet du $TGF\beta_1$ sur les niveaux d'expression d'ARNm POMC. A cet effet, nous avons incubé des fragments d'hypothalamus médiobasaux avec du $TGF\beta_1$ et quantifié par hybridation *in situ* suivie d'une analyse d'images les taux relatifs d'ARNm POMC à deux niveaux antéro-postérieurs du noyau arqué.

Dans un deuxième temps nous avons voulu savoir si une possible action directe du $TGF\beta$ au niveau des neurones à POMC était envisageable. Dans cette optique, l'expression de récepteurs spécifiques au $TGF\beta$ par les neurones à POMC s'avère indispensable. Etant donné que le $TGF\beta$ agit sur sa cellule cible via un récepteur sérine-thréonine kinase dit de type II qui s'hétérodimérise alors avec un récepteur de type I (Bassing *et al.*, 1994), nous avons entrepris d'étudier l'expression des récepteurs au $TGF\beta$ de type I et II par les neurones à POMC à différents niveaux antéro-postérieurs du noyau arqué. Nous avons également examiné si une coexpression entre les récepteurs de type I et de type II était possible dans des mêmes cellules du noyau arqué. L'étude de l'expression 1) du récepteur de type I dans les neurones à POMC a été réalisée par un double marquage d'hybridation *in situ* (utilisant une ribosonde transcrite à partir d'un plasmide contenant l'ADNc du récepteur B1 de type I au $TGF\beta$ ou de la POMC), 2) du récepteur de type II dans les neurones à POMC a été réalisée par un marquage immunohistochimique (pour la détection du récepteur de type II) suivi d'un marquage d'hybridation *in situ* (pour la détection de l'ARNm codant la POMC), et 3) du récepteur de type I et de type II dans les mêmes cellules du noyau arqué a été entreprise par immunohistochimie (pour la détection du récepteur de type II) suivie d'une hybridation *in situ* (pour la détection du récepteur de type I).

Dans un troisième temps, étant donné que les neurones à POMC sont soumis à l'action des stéroïdes gonadiques (Wise *et al.*, 1990) nous avons quantifié et régionalisé le nombre de neurones à POMC exprimant l'ARNm du récepteur B1 sur des coupes de rates

ovariectomisées (OVX), OVX et supplémentées en œstradiol (OVX+E2), et OVX+E2 et supplémentées en progestérone (OVX+E2P).

Evidence that Transforming Growth Factor- β May Directly Modulate Proopiomelanocortin Neuronal Activity in the Female Rat Arcuate Nucleus

SEBASTIEN BOURET, MYRIAM TRAN VAN CHUOI-MARIOT, VINCENT PREVOT, DOMINIQUE CROIX, TORU TAKUMI, SYLVIE JÉGOU, HUBERT VAUDRY, JEAN-CLAUDE BEAUVILLAIN AND VALERIE MITCHELL

INSERM U422 (S.B., M.TVC-M., V.P., D.C., J.-C.B., V.M.), IFR 22, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, Place de Verdun, 59045 Lille, France; Department of Anatomy and Brain Science (T.T.), Kobe University School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan; INSERM U413 (S.J., H.V.), IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Key words: transforming growth factor β receptor; transforming growth factor β ; hypothalamus; estrogen; arcuate nucleus; POMC neurons

Running title: TGF β and arcuate POMC neurons

Address all correspondence and requests for reprints to: Sebastien Bouret, INSERM U-422, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. Phone number: 33 3 2062 2062; Fax number: 33 3 2062 2061; E-mail: bouret@biserte.lille.inserm.fr

ABSTRACT

The purpose of the present study was to determine whether transforming growth factor- β (TGF β) was able to regulate proopiomelanocortin (POMC) neuronal activity in the arcuate nucleus. In a first set of experiments, mediobasal hypothalamic fragments were exposed to TGF β_1 and the relative POMC mRNA expression was assessed by *in situ* hybridization using a radiolabeled POMC riboprobe. The results showed that 4×10^{-10} M TGF β_1 was efficient in decreasing significantly the amounts of POMC mRNA ($P < 0.01$). Interestingly, the decrease of relative POMC mRNA levels was higher in the rostral than in the caudal part of the arcuate nucleus (% of decrease: 49.9 ± 3.5 in the rostral part *versus* 32.7 ± 3.6 in the caudal part; $P < 0.01$). In a second set of experiments, we examined the occurrence of TGF β receptor expression in arcuate POMC neurons. Dual labeling *in situ* hybridization and *in situ* hybridization coupled to immunohistochemical labeling were performed to examine, respectively, mRNA expression of the B1 type I serine-threonine kinase receptor for TGF β (TGF β -RI) in POMC neurons and the presence of type II receptor for TGF β (TGF β -RII) in POMC neurons. For this study, the arcuate nucleus was divided into four equal rostro-caudal parts. The results indicated that TGF β -RI (B1) mRNA and TGF β -RII were expressed in numerous POMC neurons. Regional analysis revealed that the highest proportion of POMC neurons expressing TGF β receptors were located in the rostral part of the arcuate nucleus. We also examined the coexpression of TGF β -RI (B1) mRNA and TGF β -RII immunoreactivity in the same arcuate cells and we observed that most TGF β -RI (B1) mRNA-expressing cells were immunopositive for TGF β -RII. We next examined whether the number of POMC neurons expressing TGF β -RI (B1) mRNA was affected by sex steroids. Quantification of the number of POMC neurons expressing B1 mRNA in ovariectomized (OVX), OVX estradiol-treated (OVX+E2) and OVX estradiol plus progesterone-treated (OVX+E2P) animals revealed that estrogen treatment decreased the expression of B1 mRNA in POMC neurons located in the rostral part of the arcuate nucleus. Taken together, these data reveal that TGF β_1 may directly modulate the activity of POMC neurons through activation of type I and type II receptors. Therefore, the present study provides additional evidence for the involvement of TGF β_1 in the regulation of neuroendocrine functions and supports the existence of a glial-to-neurons communication within the arcuate nucleus.

Introduction

Glial-to-neuron communication within the hypothalamus is currently a field of intense research interest (for review see ref 1). Transforming growth factor β (TGF β) is one of the factors expressed in hypothalamic astrocytes which appears to be involved in the control of neuroendocrine secretions (2-7). Growth factors belonging to the TGF β superfamily bind to and signal through a receptor complex comprising two membrane-type serine-threonine kinases, called type I and type II receptors (8). Takumi *et al.* (9) have cloned a type I receptor for TGF β and activin, named B1, and we have previously shown that TGF β -RI (B1) mRNA is expressed in GnRH neurons and in various cells of hypothalamic nuclei implicated in the regulation of the GnRH neuroendocrine axis, particularly in the arcuate nucleus (5). These observations suggest that TGF β may act both directly on GnRH neurons and indirectly via neuronal systems of the arcuate nucleus.

Proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides, especially the endogenous opioid peptide β -endorphin, are clearly implicated in the regulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis (for review see ref 10). Opioid peptides inhibit basal LH release in ovariectomized (OVX) rats, and are involved in events that trigger the LH surge on proestrus and steroid-treated OVX rats (11-13). The main group of POMC-expressing perikarya is found in the arcuate nucleus of the hypothalamus (14), and these neurons send projections towards various brain regions including the medial preoptic area where GnRH neurons are located (15). The activity of POMC neurons is regulated by gonadal steroid hormones as well as neuropeptides and neurotransmitters (for review see ref 16). The expression of TGF β -RI (B1) mRNA in the arcuate nucleus (5) suggests that TGF β might modulate POMC neuronal activity and consequently GnRH secretion.

The purpose of the present study was to examine whether TGF β is able to modulate directly arcuate POMC neurons. The primary objective was to determine the effect of TGF β_1 on POMC mRNA levels in the mediobasal hypothalamus. We next investigated whether POMC neurons expressed B1 type I and type II receptors for TGF β and whether these receptors are coexpressed in arcuate cells. Since POMC neuronal activity is regulated by gonadal steroids (17), we also investigated the possible effects of gonadal steroids on the coexpression between B1 and POMC mRNAs in OVX, OVX estradiol-treated (OVX+E2) and

OVX estradiol plus progesterone-treated (OVX+E2P) female rats. The present report shows for the first time that (1) $\text{TGF}\beta_1$ decreases the relative POMC mRNA level (2) type I and type II receptors for $\text{TGF}\beta$ are expressed in POMC neurons, and (3) estradiol affects the number of POMC neurons expressing B1 mRNA.

Materials and Methods

Animals

Adult female Wistar rats (200-250 g) were purchased from CERJ (Saint-Berthevin, France) and housed under constant 14-h light, 10-h dark conditions, with lights on at 0500 h. They were given free access to tap water and rat chow. Ovariectomies were performed under ketamine (20 mg/kg) and xylazine (0.2 ml/kg) anesthesia. Rats were handled two times weekly until killed. Before sacrifice, blood was collected and plasma was stored at -20°C for estradiol, progesterone and LH radioimmunoassays. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), regarding mammalian research.

Experimental design

Experiment 1. We examined the effect of $\text{TGF}\beta_1$ on relative POMC mRNA levels in the mediobasal hypothalamus. To this aim, mediobasal hypothalamic fragments from OVX animals ($n = 5$, per experimental condition) were incubated *ex vivo* and exposed to $\text{TGF}\beta_1$, or $\text{TGF}\beta_1$ with the soluble form of $\text{TGF}\beta$ receptor II (sRII) that presents the ability to inhibit the effect of $\text{TGF}\beta_1$. A single-label *in situ* hybridization was then performed from fragment sections in order to evaluate the relative cellular POMC mRNA content in the sections examined. For this analysis, taking into account the experimental approach, the arcuate nucleus was divided into two equal rostro-caudal subdivisions.

Experiment 2. We sought whether POMC neurons expressed $\text{TGF}\beta$ receptors. We performed on tissue sections from OVX animals ($n = 5$) double labeling *in situ* hybridization to determine whether POMC neurons expressed B1 mRNA and immunohistochemical labeling coupled to single *in situ* hybridization to determine whether POMC neurons contained $\text{TGF}\beta$ -RII immunoreactivity. For these experiments, the arcuate nucleus was divided into four equal rostro-caudal subdivisions. Additionally, we determined the occurrence of $\text{TGF}\beta$ -RI (B1) mRNA expression in $\text{TGF}\beta$ -RII-immunopositive cells of the arcuate nucleus by an immunohistochemical technique coupled to a single *in situ* hybridization.

Experiment 3. We investigated whether gonadal steroid could modulate the expression of TGF β -RI (B1) in POMC neurons by comparing the number of POMC neurons expressing B1 mRNA among groups in OVX, OVX+E2, and OVX+E2P animals. For this study, the arcuate nucleus was divided into four rostro-caudal areas. Rats were OVX and allowed to recover for two weeks. On day 0 at 1000 h the animals were injected with estradiol benzoate (E2; 30 μ g / rat, sc). On day 2 at 1000 h half of the E2-treated rats were injected with progesterone (P; 2 mg / rat, sc) to induce the LH surge in the afternoon. The group of OVX+E2-treated rats ($n = 5$) was killed on day 2 at 1000 h. The group of OVX+E2P-treated rats ($n = 5$) was killed on day 2 at 1600 h.

Ex vivo experiment

Dissection procedure. Animals were killed by decapitation. After rapid removal of the brain, a block of neural tissue encompassing the mediobasal hypothalamus was microdissected under a binocular magnifying glass by cutting the floor of the fornix at posterior border of the optic chiasm and the anterior border of the mamillary bodies. The total dissection time was less than 3 min after decapitation.

Incubation system. After dissection, mediobasal hypothalamic fragments were washed twice in Krebs-Ringer bicarbonate / glucose buffer (KRB, pH 7.4) containing bacitracine (23 μ M ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in an atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ and incubated in vitro at 35 C in KRB as previously described (18). Briefly, after a 60-min preincubation period, mediobasal hypothalamic fragments were incubated for 120 min with 4×10^{-10} M TGF β_1 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or 4×10^{-10} M TGF β_1 with 6×10^{-8} M sRII. The medium was changed every 30 min. Controls consisted in an incubation of the mediobasal hypothalamic fragments in KRB alone (without drugs) during the 120 min of the incubation period. At the end of each experiment, fragments were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde / 0.1 M phosphate buffer for 18 h at 4 C, washed for 6 h in 0.05 M Coons veronal buffer (pH 7.4) containing 20% sucrose, and then embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, CA), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14- μ m coronal sections were collected, mounted onto gelatin-coated slides and stored at -80 C until used. In order to evaluate the relative POMC mRNA level in the mediobasal hypothalamic fragments of each group, a single-label in situ hybridization was performed as described below.

Tissue preparation

To determine the expression of TGF β receptors in POMC neurons, animals were anesthetized with ketamine (20 mg / kg) and xylazine (0.2 ml / kg). They were perfused intracardially with 5-10 ml saline followed by 500 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were removed and immersed in the same fixative for 2 h. They were then washed overnight in 0.05 M Coon's veronal buffer (pH 7.4) containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, CA), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14- μ m coronal sections were collected from the level of -1.8 to -4.8 mm relative to the Bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (19). The sections were mounted onto gelatin-coated slides and stored at -80 C until used.

Riboprobe preparation

³⁵S-Labeled B1 receptor complementary RNA probes. The plasmid vector pcDNA I containing a *Xba*I / *Hind*III fragment of 2300-bp of the full length rat B1 receptor (generously provided by Dr Takumi, Kobe, Japan) was linearized by cutting at a single site with *Xba*I for the antisense probe or *Hind*III for the sense probe. In vitro transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense B1 probes and [³⁵S]CTP (Amersham, France).

³⁵S-Labeled POMC complementary RNA probes. The plasmid vector pCRTMII containing a *Hind*III / *Xho*I fragment of 409-bp of the rat POMC gene (position 221-629 bp of the POMC exon III) (generously provided by Dr Drouin, Montréal, Canada) was linearized by cutting at a single site with *Hind*III for the antisense probe or *Xho*I for the sense probe. In vitro transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense POMC probes and [³⁵S]CTP (Amersham, France).

Digoxigenin-labeled POMC complementary RNA probe. A digoxigenin-labeled cRNA probe for POMC mRNA was made from the same plasmid used for synthesis of the ³⁵S-labeled probe. The probe was synthesized *in vitro* from 1 μ g linearized DNA with 1X digoxigenin RNA labeling mixture (Boehringer-Roche Diagnostics, Meylan, France), RNA polymerase and 1X transcription buffer. This mixture was incubated at 37 C for 2 h. Residual DNA was digested with desoxyribonuclease.

Single-label in situ hybridization for POMC mRNA

Single label *in situ* hybridization was performed following a protocol described previously in detail (20). Briefly, processed sections were hybridized with riboprobe-hybridization buffer mix, which contains the ³⁵S-labeled POMC cRNA probe (25,000 cpm/μl). Overnight hybridization at 55 C was followed by RNase treatment, a serie of stringent washes, including a high-stringency wash at 60 C. Hybridized slides were dehydrated in 70% and 100% ethanols in ammonium acetate, and dipped in NTB2 emulsion (Kodak, France). After a 10-day exposure, slides were developed.

Dual label in situ hybridization for POMC mRNA and B1 mRNA

Dual labeling *in situ* hybridization was performed as previously described (21). Briefly, processed tissues were hybridized with the riboprobe-hybridization buffer mix, containing ³⁵S-labeled B1 cRNA probe (30,000 cpm/μl) plus the digoxigenin-labeled POMC cRNA probe (1:200). Overnight hybridization at 55 C was followed by RNase treatment, a series of stringent washes, including a high-stringency wash at 60 C. Tissue slices were incubated with anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase (Boehringer-Roche Diagnostics, Meylan, France), and incubated in chromogen solution (tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Boehringer-Roche Diagnostics). The reaction was stopped after 3 h by rinsing twice for 15 min in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM EDTA). The slides were dehydrated in 70% ethanol containing ammonium acetate (300 mM) and 100% ethanol, and dipped in Ilford K5 emulsion (Saint-Priest, France). All sections were developed after a 20-day exposure.

Immunohistochemical (TGFβ-RII) and in situ hybridization (B1 or POMC) labeling

Tissue sections were prepared as described above. Microwave oven (Samsung, Roissy, France) heating of tissue sections was then performed. Slides were rinsed in citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 10 min and pre-incubated for 5 min at 800 W and for 2×4 min at 400 W in an appropriate box containing citrate buffer (10 mM, pH 6.0). After cooling, sections were rinsed in 0.1 M Tris-buffered saline (TBS) and incubated for 48 h at 4 C with a rabbit polyclonal TGFβ-RII antibody (Santa-Cruz Biotechnology, CA) diluted at 1:250 with TBS containing 0.3 % Triton. Antigen-antibody binding sites were visualized using biotinylated-linked goat anti-rabbit (1:200, for 1h30) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) and the standard

peroxydase ABC amplification method (for 1h30) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). After the DAB reaction, sections were rinsed in TBS and then processed for a single *in situ* hybridization labeling, as described above, for the detection of POMC or B1 mRNA expression in TGF β -RII immunopositive cells.

Quantitative analysis

For the analysis of double-labeling staining, the arcuate nucleus was divided into four areas of approximately equal length in the rostral-caudal plane as previously described (21). This partitioning is commonly used since POMC neurons are heterogeneous in terms of projections, sensibility to hormonal treatment, ... (15, 21-25). For each animal, four tissue sections per rostro-caudal area were analyzed. *Firstly*, each POMC mRNA-expressing neuron was examined for the presence of B1 mRNA expression or TGF β -RII immunoreactivity. The number of POMC mRNA-expressing neurons and of POMC neurons expressing B1 mRNA or TGF β -RII immunoreactivity was then counted and averaged in the four rostro-caudal areas of the arcuate nucleus. *Secondly*, the number of POMC neurons expressing B1 mRNA was counted, and averaged in the four rostro-caudal areas of the arcuate nucleus from OVX, OVX+E2 and OVX+E2P.

For the determination of the relative POMC mRNA levels in mediobasal hypothalamic fragments incubated *ex vivo*, the arcuate nucleus was divided into two areas of approximately equal length. For each fragment, ten tissue sections per rostro-caudal area were analyzed. The grain density corresponding to relative POMC mRNA levels in mediobasal hypothalamic fragments was measured according to previously published protocols (20,21). Briefly, sections were viewed using a Zeiss axioskop microscope (Göttingen, Germany). The density of silver grains corresponding to relative POMC mRNA levels was quantified in the neurons from the two rostro-caudal subdivisions using the DensiRag program of Biocom (Les Ulis, France) under a $\times 40$ epiillumination darkfield objective.

The boundaries of the arcuate nucleus were determined by using the corresponding azure blue-stained sections. Neurons were identified as labeled with POMC probe if the number of silver grains over the perikaryon was at least three times higher than the background.

Statistical analysis

Differences between groups were assessed with a one-way ANOVA, followed by a *post hoc* Bonferroni's *t* test. Differences between groups and areas were regarded as significant when $P < 0.05$.

Control experiments

Specificity controls of *in situ* hybridization included incubation of the sections with ³⁵S- and digoxigenin-labeled sense probes, pretreatment with ribonuclease and coincubation with a 100-fold excess of unlabeled antisense probe. The specificity of the TGFβ-RII antibody has been previously checked (26). This antibody reacts with the C-terminal domain of the receptor. Control of the immunohistochemical staining was verified by using the preimmune serum instead of the TGFβ-RII receptor antibody, or the labeled secondary antiserum alone. No specific labeling was observed on the control sections.

Plasma LH, 17β-estradiol, and progesterone determination

Plasma LH levels were measured by RIA using materials supplied by the NIDDK rat pituitary hormone distribution program (Baltimore, MD), and values were expressed as nanograms per ml using the LH pituitary reference preparation RP-3. Assay sensitivity was 0.02 ng / tube, and the intra- and interassay coefficients of variation were 6% and 8.5%, respectively. Plasma estradiol was measured using a RIA kit optimized for the direct quantitative determination of very low concentrations of 17β-estradiol in human serum and plasma (*e.g.* in children), purchased from SORIN Biomedica (Antony, France). Assay sensitivity was 0.2 pg/tube, and the intra- and interassay coefficients of variation were 5.6% and 7.3%, respectively. Progesterone levels were measured in plasma samples without extraction, using a RIA kit purchased from SORIN Biomedica. Assay sensitivity was 5 pg/tube, and the intra- and interassay coefficients of variation were 5.5% and 8.1%, respectively.

Results

Experiment 1

We first determined the effect of TGF β_1 on POMC mRNA levels in the arcuate nucleus. As shown in figures 1 and 2, mediobasal hypothalamic fragments treated with TGF β_1 exhibited a decrease of the mean density of silver grains overlying labeled POMC neurons ($P < 0.01$). TGF β_1 produced a $49.9 \pm 3.5\%$ decrease of relative POMC mRNA levels compared to controls in the rostral part of the arcuate nucleus (Figs. 1A and 2A-D), and a $32.7 \pm 3.6\%$ decrease in the caudal part of the arcuate nucleus (Figs. 1B and 2E-H). The effects of TGF β_1 on POMC mRNA levels were reversed by sRII (Figs. 1A and B). Interestingly, the decrease of POMC mRNA levels induced by TGF β_1 were significantly higher in the rostral part of the arcuate nucleus than in the caudal part ($P < 0.01$) (Fig. 1).

Experiment 2

We next investigated the occurrence of TGF β receptor mRNA or protein in POMC neurons. We used *in situ* hybridization technique to examine the expression of B1 type I receptor of TGF β and immunohistochemical technique to examine the expression of type II receptor for TGF β . B1 mRNA-expressing cells (Fig. 3B and E) and TGF β -RII immunoreactive cells (Fig. 3C and F) were widely expressed throughout the rostro-caudal aspect of the arcuate nucleus, the distribution overlapping with that of POMC mRNA-expressing neurons (Fig. 3A and D).

Analysis of double labeling revealed that TGF β -RI (B1) and TGF β -RII receptor types were found in POMC neurons (Fig. 4). B1 mRNA expression (Fig. 4 A and B) as well as TGF β -RII immunoreactivity (Fig. 4 C and D) were detected in numerous POMC neurons without preferential distribution according to the ventro-lateral aspect of the arcuate nucleus. The regional analysis revealed that the highest proportion of POMC neurons expressing TGF β -RI (B1) mRNA was located in the rostral part of the arcuate nucleus (*i.e.* area A) whatever the experimental condition (Fig. 5A; $P < 0.01$). Similarly, POMC neurons containing TGF β -RII immunoreactivity were preferentially expressed in the rostral part of the arcuate nucleus (Fig. 5B; $P < 0.01$).

Colocalisations between TGF β -RI (B1) mRNA and TGF β -RII protein were observed in numerous cells of the arcuate nucleus (Fig. 6). However, some B1 mRNA-expressing cells did not contain TGF β -RII immunoreactivity and reciprocally, some TGF β -RII immunoreactive cells did not contain TGF β -RI (B1) mRNA (Fig. 6).

Experiment 3

We also examined the effect of ovariectomy and hormonal replacement on the number of POMC neurons that expressed TGF β -RI (B1) mRNA. Before comparing the number of POMC neurons expressing B1 mRNA, it was necessary to determine whether the number of POMC mRNA-expressing neurons varied according to the hormonal status of the animal. As shown in Table 1, no significant differences in the mean number of POMC mRNA-expressing neurons were observed between OVX, OVX+E2, and OVX+E2P animals whatever the rostro-caudal subdivision of the arcuate nucleus considered. B1 mRNA was observed in numerous POMC neurons whatever the hormonal status of the animal; however, the number of POMC neurons that expressed B1 mRNA was affected by estradiol. In the rostral subdivisions of the nucleus, *i.e.* areas A and B, the number of POMC neurons that expressed B1 mRNA was significantly lower in OVX+E2 animals compared to OVX animals ($P < 0.01$) (Fig. 7). In area A, administration of progesterone to OVX+E2 animals reversed the inhibitory effect of estrogens on the number of POMC neurons that expressed B1 mRNA ($P < 0.01$) (Fig. 7). Conversely, in areas C and D, no significant variations of the number of POMC neurons expressing B1 were observed between the experimental groups ($P > 0.05$) (Fig. 7).

Hormonal levels

Average plasma LH, estradiol, and progesterone levels are shown in Table 2. In OVX+E2P female rats, the mean plasma LH level on day 2 at the time of sacrifice exhibited the characteristic pattern of a typical LH surge. The levels of plasma estradiol and progesterone in OVX+E2P rats were significantly higher compared to OVX animals. The OVX+E2 animals showed significantly increased levels of estradiol.

Discussion

The present study demonstrates that TGF β may directly regulate the activity of POMC neurons located in the arcuate nucleus since (1) exposure of mediobasal hypothalamic fragments to TGF β_1 provoked a significant decrease in POMC mRNA expression, and (2) type I and type II serine-threonine kinase receptors for TGF β were expressed in POMC neurons. Our data also show that POMC neurons located in the rostral part of the arcuate nucleus are the preferential target for TGF β action. In addition, we demonstrate that the number of POMC neurons expressing B1 type I TGF β receptor mRNA is affected by estrogen treatment only in the rostral arcuate nucleus neurons.

Previous studies have indicated that TGF β_1 is produced in the hypothalamus by astrocytes (2,3,6,27). Growth factors secreted by glial cells, have been implicated in the regulation of neuroendocrine functions within the hypothalamus (see ref 1). The present study shows that, in the arcuate nucleus, TGF β_1 modulates POMC neuronal activity by decreasing POMC mRNA levels. To our knowledge, the present study is the first report suggesting the existence of a cell-to-cell communication within the arcuate nucleus involving TGF β . TGF β_1 exerts its effects on target cells through binding to the heterodimeric complex of type I and type II receptors (8). The present study shows that type I and type II receptors for TGF β are expressed throughout the arcuate nucleus. The expression of B1 type I receptor has been previously described (5) but this is the first time that the expression of TGF β -RII is reported in the arcuate nucleus. Surprisingly, a previous study failed to detect the expression of mRNA encoding for a type II of TGF β receptor within the hypothalamus (28). This discrepancy may be due to the existence of various type II receptors for TGF β or that the mRNA level for this receptor might be below to the level of cellular detection by *in situ* hybridization. Because TGF β -RI and TGF β -RII have been shown to mediate the action of TGF β_1 (29-32) and that we observe that most of the arcuate cells colocalize both of these receptors, we conclude that TGF β signaling occurs in the arcuate nucleus. The occurrence of this signaling is further demonstrated by the fact that TGF β_1 affected the activity of one cell population of the arcuate

nucleus, *i.e.*, POMC neurons, suggesting that TGF β -RI and TGF β -RII are functional in this brain area.

Using double *in situ* hybridization and *in situ* hybridization combined to immunocytochemistry, we show that TGF β -RI (B1) and TGF β -RII receptors are expressed in a representative population of POMC neurons. These observations suggest that the TGF β_1 -induced down regulation of POMC gene expression may result from the direct action of TGF β_1 on POMC neurons. Noticeably, we observed that TGF β_1 has a more potent effect on POMC mRNA levels in the rostral arcuate nucleus. This result might be related to our findings showing that the proportion of POMC neurons expressing TGF β receptors is much higher in the rostral part of the arcuate nucleus than in its caudal part. POMC neurons located in the rostral arcuate nucleus thus appear to be the preferential target for the action of TGF β . The physiological significance of this TGF β -POMC interrelation remains unknown. However, POMC neurons have been implicated in the regulation of physiological functions such as food intake and reproduction. Interestingly, POMC neurons form a heterogeneous population with respect to their projection toward the preoptic area (15), where GnRH perikarya are located. Using retrograde tracers, Cheung and Hammer (15) have shown that POMC neurons that project to the preoptic area originate mainly from the rostral arcuate nucleus. Taking as a whole, these findings suggest that TGF β , via its action on POMC neurons, may modulate GnRH neuron activity in a transsynaptic way and thus that the TGF β -POMC communication pathway is relevant for the reproductive function.

Consistent with this latter hypothesis is the fact that gonadal steroids appear to be important components that regulate TGF β signaling. On the one hand, gonadal steroids modulate the pattern of expression of TGF β receptors in POMC neurons: estradiol induces a decrease of the number of POMC neurons expressing TGF β -RI (B1) mRNA and this effect is restricted to POMC neurons located in the rostral parts of the arcuate nucleus. These data can be brought in parallel with a previous study showing that estrogen reduces ^{125}I -TGF β_1 binding in anterior pituitary cells (33). On the other hand, in addition to an effect on TGF β receptor expression, estrogens could have a modulatory effect on the TGF β system by modulating TGF β_1 expression in the hypothalamus. In this regard, recent studies have shown that TGF β_1 release from hypothalamic astrocytes, known to express estrogen receptors (6, 34-36), increased in response to an estrogenic treatment (6, 37) and mRNA levels of TGF β_1 fluctuate

in the hypothalamus during the various phases of the estrous cycle with the highest level of expression during the day of proestrus (37). Thus the TGF β -POMC communication process may be one of the components involved in the mediation of the estrogen feedback occurring within the arcuate nucleus.

In conclusion, the present study provides compelling evidence for the involvement of TGF β in the regulation of the activity of arcuate cells. More precisely we show that TGF β_1 modulates the activity of POMC neurons and that this effect is mediated by the activation of type I and type II serine-threonine kinase receptors for TGF β . Additionally, estrogen appears to be an important component of the TGF β -POMC communication especially in rostral POMC neurons. These results suggest that TGF β potentially plays an important role in the regulation of neuronal activity within the arcuate nucleus and provide additional evidence for the existence of a glial-to-neuron communication within the hypothalamus that may play a key role in neuroendocrine regulations, especially reproductive functions.

Acknowledgments

This work was support by the Lille-Amiens-Rouen-Caen (LARC) opioid peptide program and the University of Lille II. The authors thank Mrs. G. Mortreux for her excellent technical assistance, the NIDDK for the rat LH RIA material, and the "Service Commun d'Imagerie Cellulaire" (University of Lille II) for the image analysis system.

References

1. **Ojeda SR, Ma YJ, Lee BJ, Prevot V** 2000 Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res* 55:197-223
2. **Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB** 1991 Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 44:613-625
3. **Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A** 1992 Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol* 148:1404-1410
4. **Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M** 1995 Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136:679-686
5. **Prevot V, Bouret S, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain JC** 2000 Evidence that members of the TGF β superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF β and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat. *J Neuroendocrinol* 12:665-670
6. **Buchanan CD, Malesh VB, Brann DW** 2000 Estrogen-astrocyte-luteinizing hormone-releasing hormone signaling: a role for transforming growth factor- β_1 . *Biol Reprod* 62:1710-1721
7. **Bouret S, Prevot V, Croix D, Mitchell V, Beauvillain JC**, Transforming growth factor β affects GnRH mRNA expression in the male rat preoptic area. Program of the 30th annual meeting the Society For Neuroscience, New Orleans LA, p 1444 (Abstract)
8. **Bassing CH, Yingling JM, Howe DJ, Wang T, He WW, Gustafson ML, Shah P, Donahoe PK, Wang XF** 1994 A transforming growth factor beta type I receptor that signals to activate gene expression. *Science* 263:87-89
9. **Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF** 1995 Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216:208-214
10. **Kalra SP** 1993 Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507-538
11. **Allen LG, Kalra SP** 1986 Evidence that a decrease in opioid tone may evoke preovulatory luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 118:2375-2381

12. **Gabriel SM, Berglund LA, Simpkins JW** 1986 A decline in endogenous opioid influence during the steroid-induced hypersecretion of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 118:558-561
13. **Allen LG, Hahn E, Caton D, Kalra SP** 1988 Evidence that a decrease in opioid tone on proestrus changes the episodic pattern of luteinizing hormone (LH) secretion: implications in the preovulatory LH hypersecretion. *Endocrinology* 122:1004-1013
14. **Mezey E, Kiss JZ, Mueller GP, Eskay R, O'Donohue TL, Palkovits M** 1985 Distribution of the pro-opiomelanocortin derived peptides, adrenocorticotrope hormone, alpha-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin (ACTH, alpha-MSH, beta-END) in the rat hypothalamus. *Brain Res* 328:341-347
15. **Cheung S, Hammer RP Jr** 1995 Gonadal steroid hormone regulation of proopioidmelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat. *Neuroendocrinology* 62:283-292
16. **Kalra SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS** 1997 The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GnRH) system. *J Neuroendocrinol* 9:569-576
17. **Wise PM, Scarbrough K, Weiland NG, Larson GH** 1990 Diurnal pattern of proopioidmelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of proestrous, ovariectomized, and steroid-treated rats: a possible role in cyclic luteinizing hormone secretion. *Mol Endocrinol* 4:886-892
18. **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
19. **Paxinos G, Watson C** 1982 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York
20. **Faure-Virelizier C, Croix D, Bouret S, Prevot V, Reig S, Beauvillain JC, Mitchell V** 1998 Effects of estrous cyclicity on the expression of the galanin receptor Gal-R1 in the rat preoptic area: a comparison with the male. *Endocrinology* 139:4127-4139
21. **Bouret S, Prevot V, Croix D, Howard A, Habert-Ortoli E, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V** 2000 Expression of GalR1 and GalR2 galanin receptor messenger ribonucleic acid in proopioidmelanocortin neurons of the rat arcuate nucleus: effect of testosterone. *Endocrinology* 141:1780-1794
22. **Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA** 1989 Regional specificity of testosterone regulation of proopioidmelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the male rat brain. *Endocrinology* 124:2875-2881
23. **Tong Y, Zhao HF, Labrie F, Pelletier G** 1990 Regulation of proopioidmelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. *Neurosci Lett* 112:104-108

24. **Tong Y, Pelletier G** 1992 Prolactin regulation of pro-opiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 56:561-565
25. **Mann PE, Foltz G, Riger BA, Bridges RS** 1999 The development of POMC gene expression in the medial basal hypothalamus of prepubertal rats. *Dev Brain Res* 116:21-28
26. **Olaso R, Pairault C, Habert R** 1998 Expression of type I and II receptors for transforming growth factor beta in the adult rat testis. *Histochem Cell Biol* 110:613-618
27. **Ilyin SE, Gayle D, Flynn MC, Plata-Salaman CR** 1998 Interleukin-1beta system (ligand, receptor type I, receptor accessory protein and receptor antagonist), TNF-alpha, TGF-beta1 and neuropeptide Y mRNAs in specific brain regions during bacterial LPS-induced anorexia. *Brain Res Bull* 45:507-515
28. **Morita N, Takumi T, Kiyama H** 1996 Distinct localization of two serine-threonine kinase receptors for activin and TGF-beta in the rat brain and down-regulation of type I activin receptor during peripheral nerve regeneration. *Mol Brain Res* 42:263-271
29. **Massague J** 1992 Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 69:1067-1070
30. **Derynck R** 1994 TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 19:548-553
31. **Chen F, Weinberg RA** 1995 Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor beta receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1565-1569
32. **Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K** 1993 Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75:681-692
33. **De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N, Sarkar DK** 1996 Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor beta (TGF beta) type II receptor mRNA and protein and contains 125I-TGF beta 1 binding sites. *J Endocrinol* 149:19-27
34. **Langub MC Jr, Watson RE Jr** 1992 Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 130:364-372
35. **Ma YJ, Berg-von der Emde K, Moholt-Siebert M, Hill DF, Ojeda SR** 1994 Region-specific regulation of transforming growth factor alpha (TGF alpha) gene expression in astrocytes of the neuroendocrine brain. *J Neurosci* 14:5644-5651
36. **Cardona-Gomez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM** 2000 Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience* 99:751-760

37. **Melcangi RC, Galbiati M, Magnaghi V, Cavarretta I, Martini L**, LHRH-secreting neurons: role of growth factors and steroids. Program of the Forum of European Neuroscience (FENS), Brighton (UK), 2000, p. 187; published in European Journal of Neuroscience, volume 12, supplement 11

TABLE 1. Mean number of POMC mRNA-expressing neurons per hemisection in the four rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus from OVX, OVX+E2, and OVX+E2P animals. Area A is the most rostral, and D the most caudal area of the nucleus. The values are given as the mean \pm SEM.

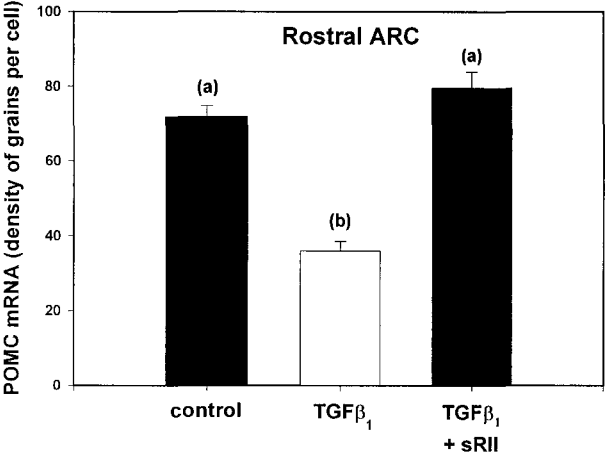
	Area A	Area B	Area C	Area D
OVX	48 \pm 4	52 \pm 4	47 \pm 3	47 \pm 2
OVX+E2	45 \pm 4	45 \pm 3	50 \pm 3	42 \pm 2
OVX+E2P	51 \pm 3	49 \pm 2	41 \pm 2	47 \pm 5

TABLE 2. Average \pm SEM concentrations of plasma LH, estradiol and progesterone in ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with estradiol (OVX+E2), and ovariectomized treated with estradiol plus progesterone (OVX+E2P) rats.

	LH (ng/ml)	Estradiol (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)
OVX	5.21 \pm 1.56	8.09 \pm 1.60	3.83 \pm 0.59
OVX + E2	1.75 \pm 0.52	45.6 \pm 11.3	22.5 \pm 2.5
OVX + E2P	42.0 \pm 16.9	37.0 \pm 4.2	38.2 \pm 2.9

Fig. 1. Relative amounts of POMC mRNA in the rostral (A) or caudal (B) subdivision of the arcuate nucleus, as determined by the density of grains per cell, from mediobasal hypothalamic fragments incubated with 4×10^{-10} M of TGF β_1 alone, or 4×10^{-10} M TGF β_1 in the presence of 6×10^{-8} M of soluble receptor II (sRII). Control consisted in incubating fragments with buffer alone. The values are mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.01$) among the average values for the groups considered are noted as a vs. b (statistical analysis with the Bonferroni's test).

A



B

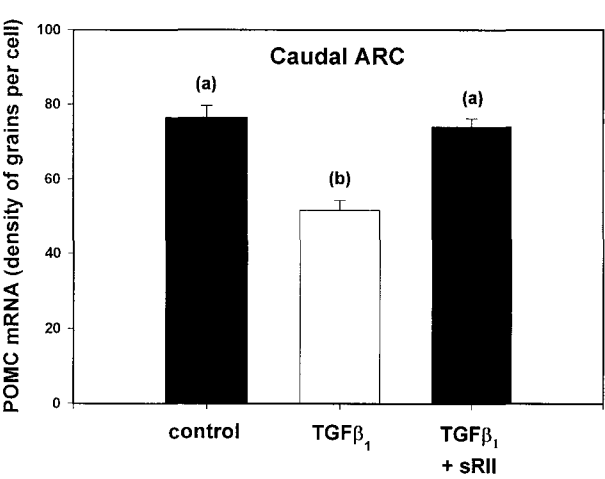


Fig. 2. Darkfield (A,C,E,G) and brightfield (B,D,F,H) microphotographs showing POMC mRNA-expressing neurons in control (A,B,E,F), and TGF β_1 -treated (C,D,G,H) mediobasal hypothalamic fragments. (A-D) show POMC mRNA-expressing cells from the rostral part of the arcuate nucleus and (E-H) show POMC mRNA-expressing cells from the caudal part of the arcuate nucleus. Note that POMC mRNA expression is decreased concomitantly to the treatment with TGF β_1 . V, third ventricle. Scale bars, (A,C,E,G) 75 μ m, (B,D,F,H) 7.5 μ m.

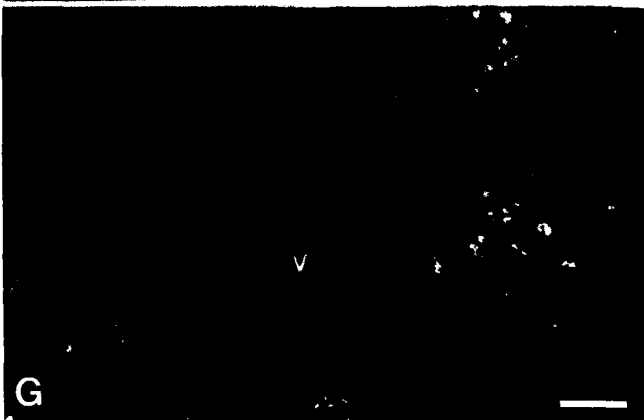
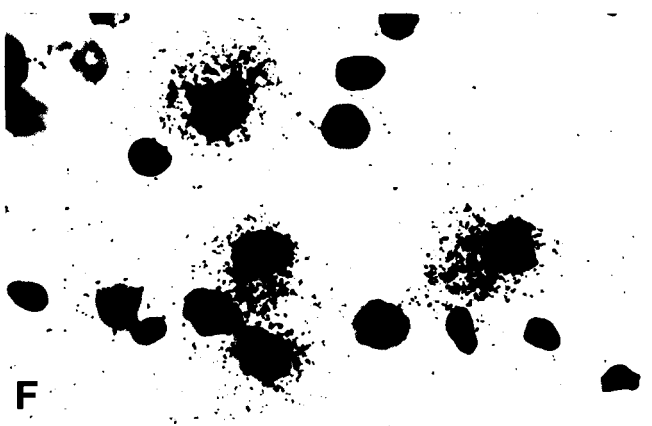
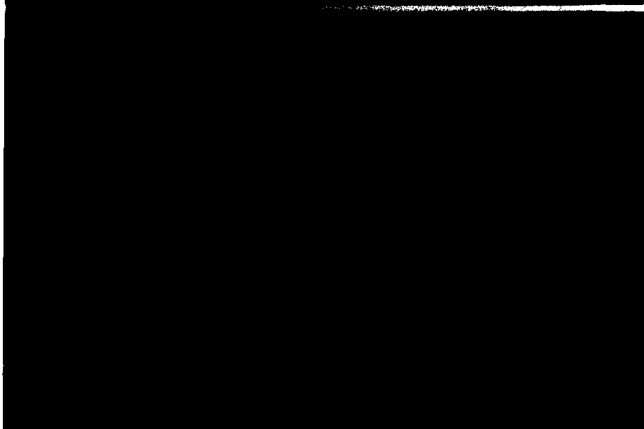
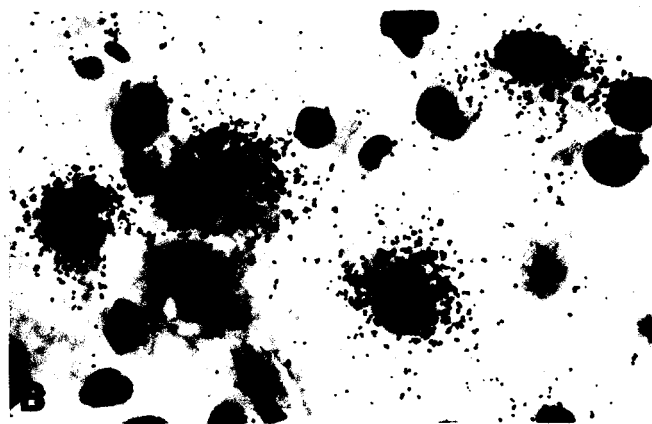
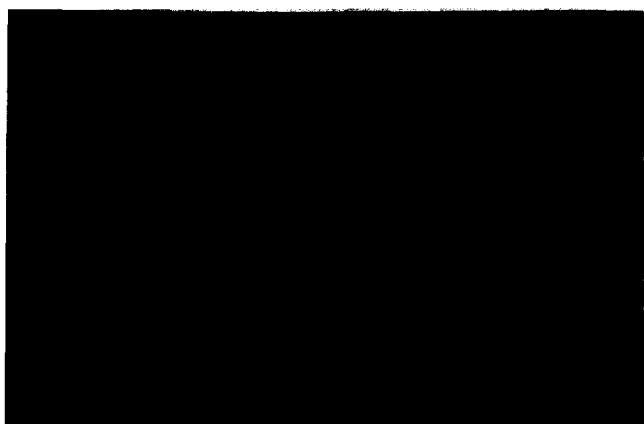


Fig. 3. Brightfield (A, C, D, F) and darkfield (B, E) microphotographs showing the expression of POMC mRNA-containing neurons (A, D), B1 type I serine-threonine kinase receptor for TGF β mRNA-expressing cells (B, E), and type II serine-threonine kinase receptor for TGF β immunopositive cells (C, F) in the rostral (A-C) and caudal (D-F) subdivisions of the arcuate nucleus. Note that these labeling exhibit an overlapping distribution across the arcuate nucleus. V, third ventricle. Scale bar, 120 μ m.

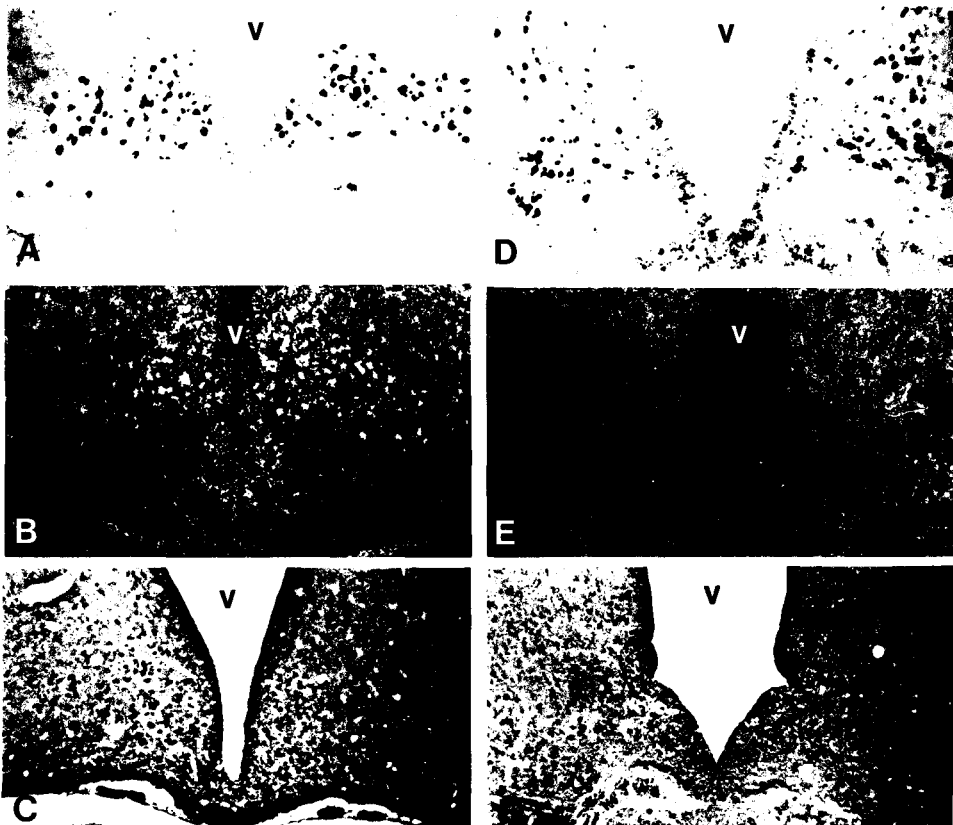


Fig. 4. Brightfield photomicrographs of the arcuate nucleus showing cells (A,B) labeled with a digoxigenin-conjugated cRNA probe for POMC mRNA (*dark staining*) and ³⁵S-labeled cRNA probe for B1 type I receptor mRNA (*black silver grains*), or (C,D) labeled with a ³⁵S-labeled cRNA probe for POMC mRNA (*black silver grains*) and immunoreactive for TGFβ-RII (*dark precipitate*). *Arrows* point to double-labeled neurons; *arrowheads* point to POMC neurons that do not express TGFβ receptor; *open arrows* point to TGFβ receptor-containing cells that do not express POMC mRNA. Scale bar, 8 μm.

POMC/TGF β -RI

POMC/TGF β -RII

A

C

D

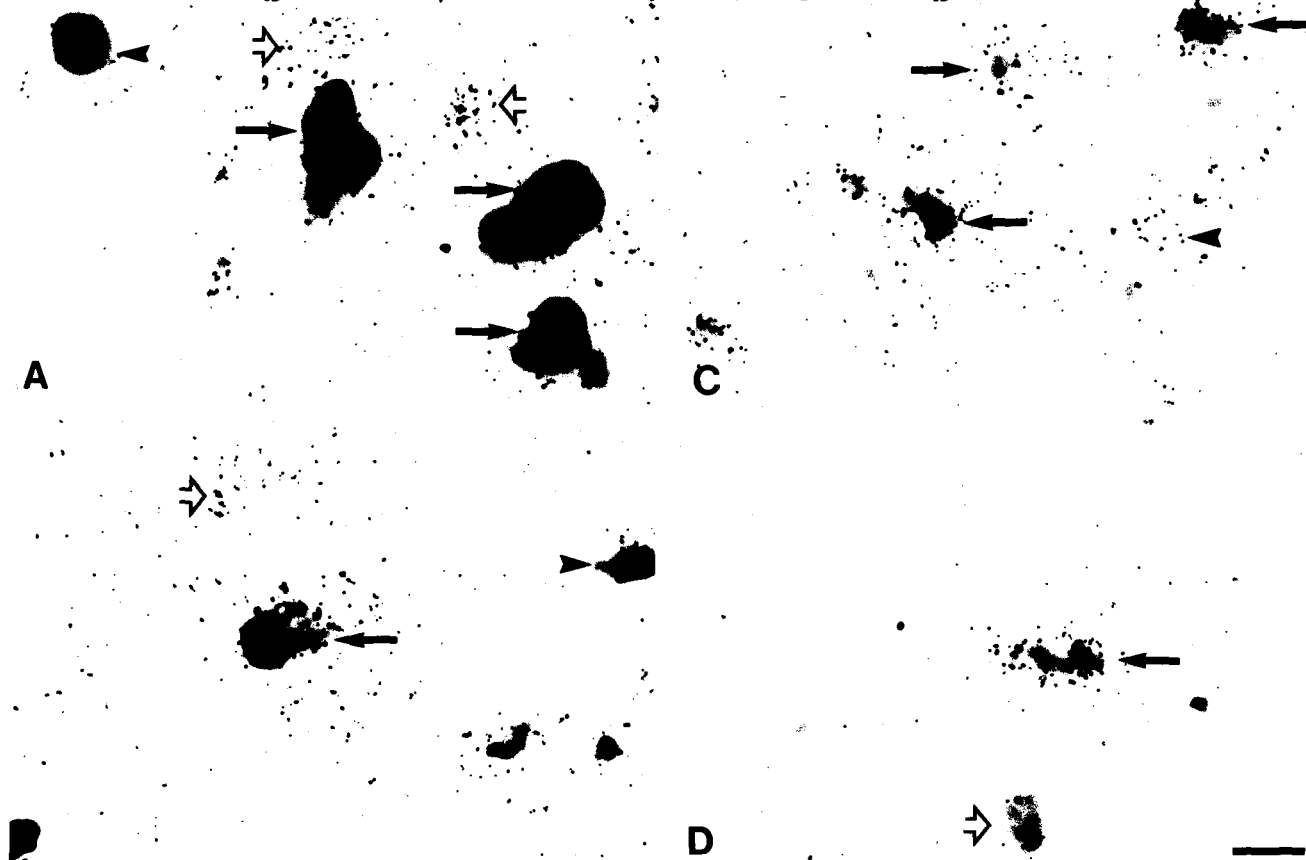
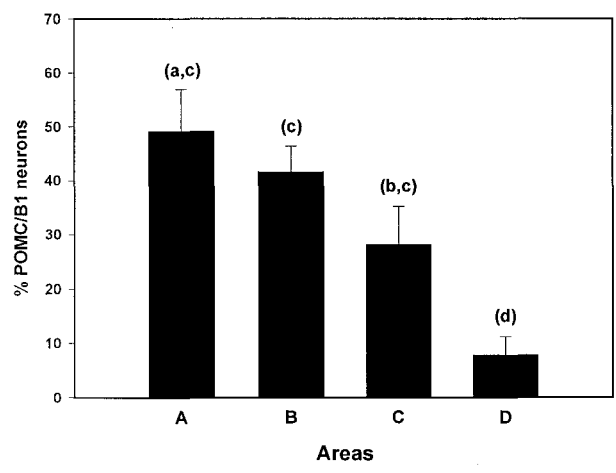


Fig. 5. Proportion of POMC neurons containing TGF β -RI (B1) mRNA (A), or TGF β -RII immunoreactivity (B) in the four rostro-caudal subdivisions of the arcuate nucleus. Area A is the most rostral, and D is the most caudal area of the nucleus. The values are the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.01$) among the areas are indicated by different superscripts (statistical analysis with the Bonferroni's test).

A



B

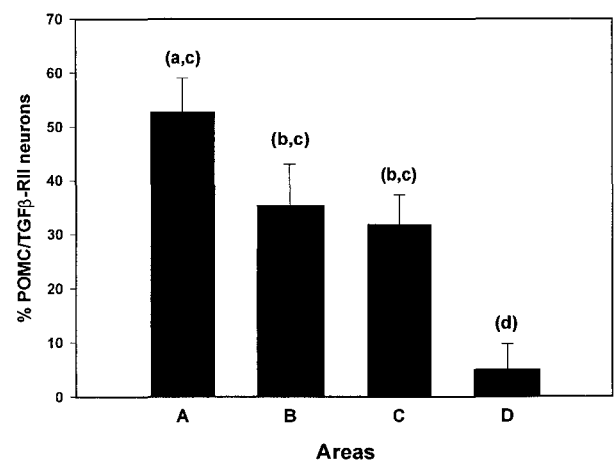


Fig. 6. (A) Representative photomicrograph of the arcuate nucleus showing coexpression of TGF β -RI (B1) mRNA (*black* silver grains) and TGF β -RII immunoreactivity (*dark* staining) under brightfield illumination. A higher magnification of the microphotograph is shown in B. Arrows point to dual-labeled cells; the open arrow points to TGF β -RI cell that does not express TGF β -RII; arrowheads point to TGF β -RII cells that do not express TGF β -RI. Scale bars, (A) 50 μ m; (B) 5 μ m.

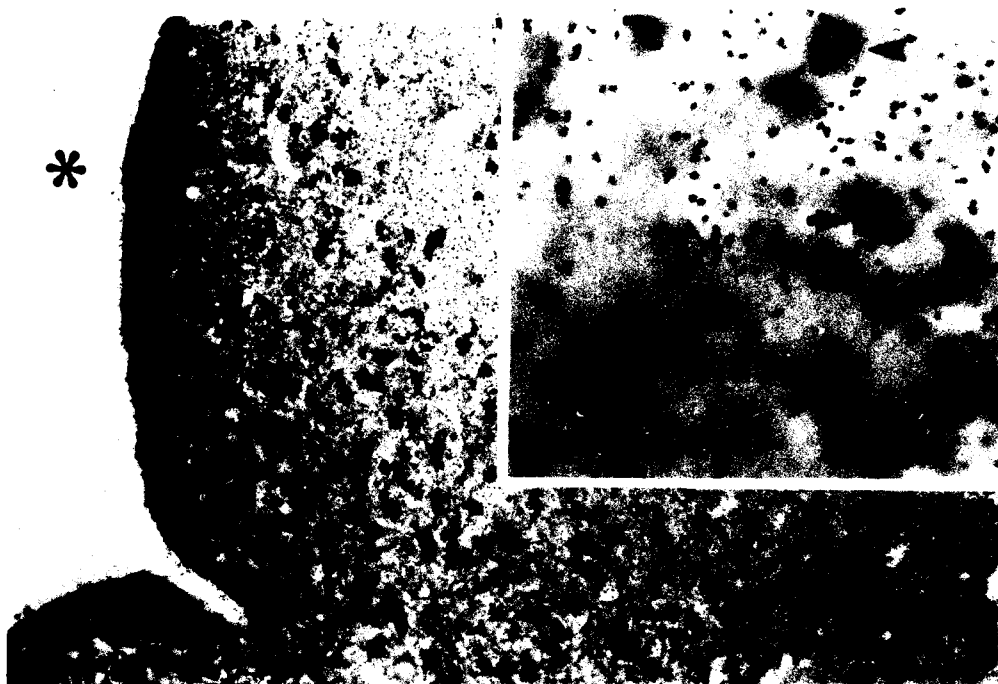
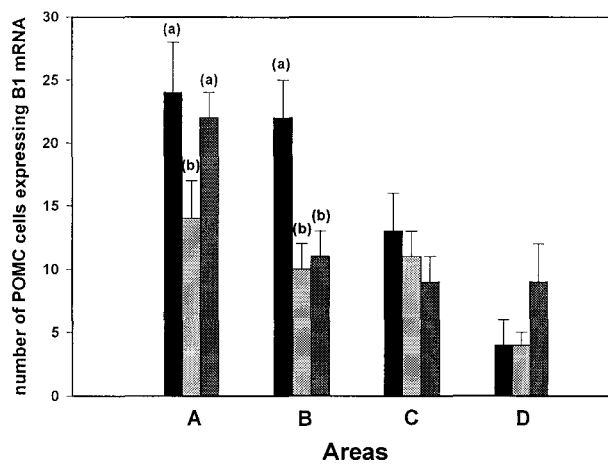


Fig. 7. Mean number of POMC neurons expressing TGF β -RI (B1) mRNA per hemisection in OVX (black column), OVX+E2 (gray column), and OVX+E2P (dark column) female rats across the four rostro-caudal subdivisions (A-D) of the arcuate nucleus. The values are the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.01$) among the average values for the groups considered are noted as a vs. b (statistical analysis with the Bonferroni's test).



Les résultats de cette étude montrent que le $TGF\beta_1$ est capable de moduler l'activité des neurones à POMC en induisant une diminution des niveaux d'ARNm POMC dans le noyau arqué. Cet effet est particulièrement prononcé dans le noyau arqué antérieur (49.9 ± 3.5 % de décroissance dans le noyau arqué antérieur *versus* 32.7 ± 3.6 % dans le noyau arqué postérieur, $P < 0.01$). De plus, nous montrons que le récepteur de type I et le récepteur de type II au $TGF\beta$ sont exprimés par les neurones à POMC avec une expression préférentielle dans le noyau arqué antérieur. Nous observons par ailleurs que, dans le noyau arqué, la majorité des cellules qui expriment le récepteur de type I expriment également le récepteur de type II au $TGF\beta$. Aussi, cette interrelation $TGF\beta$ /POMC apparaît stéroïdo-dépendante car les stéroïdes gonadiques, et plus particulièrement l'œstradiol, induisent une diminution du nombre de neurones à POMC exprimant l'ARNm codant le récepteur B1 en particulier dans le noyau arqué antérieur.

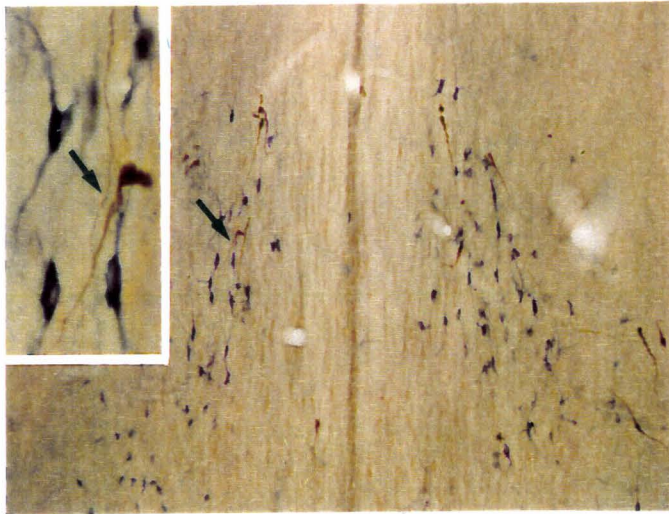
En résumé, nos résultats montrent que le $TGF\beta_1$ est capable de réguler, via ses récepteurs de type I et de type II, l'activité des neurones à POMC et que cette interrelation est œstrogéno-dépendante. Nos résultats permettent ainsi d'établir qu'une relation glie (astrocytes)/neurones à POMC peut se dérouler dans le noyau arqué et d'impliquer une telle interrelation dans la régulation du système à GnRH.

Article 5

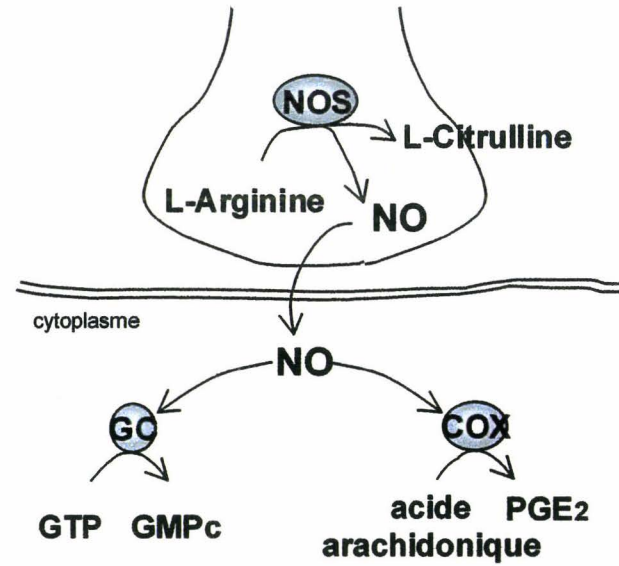
" μ opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase-immunopositive preoptic area neurons "

S. Bouret, V. Prevot, D. Croix, O. Viltart, G.B. Stefano, V. Mitchell,
J.C. Beauvillain

Molecular Brain Research 2000 Vol. 80, N°1, pp. 46-52



A



B

Figure 8. (A) relations morphologiques entre les neurones synthétisant la NOS (révélation NADPH-diaphorase, coloration bleue) et les neurones immunoréactifs pour la GnRH (coloration brune) dans l'aire préoptique. (B) mode d'action et cibles enzymatiques du NO. (COX, cyclooxygénase ; GC, guanylate cyclase)

IV. Le NO : médiateur de choix dans la transmission des effets de la β -endorphine sur les neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique

L'objectif de cette dernière partie a été de déterminer la nature de l'un des intermédiaires par lequel la β -endorphine pouvait moduler l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique. En effet, il semble que l'action de la β -endorphine sur le système à GnRH soit indirecte car des travaux ont rapporté l'absence d'expression de l'ARNm codant les récepteurs aux opioïdes (μ , δ ou κ) dans les neurones à GnRH quel que soit l'état stéroïdien de l'animal (Mitchell *et al.*, 1997a ; Sannella et Petersen, 1997). Ainsi, la β -endorphine pourrait exercer son effet de frein sur l'activité des neurones à GnRH de façon indirecte en stimulant des systèmes inhibiteurs et/ou en restreignant des systèmes stimulateurs sur la sécrétion de GnRH. Parmi les médiateurs possibles, les neurones synthétisant le NO apparaissent des candidats de choix car ce neurotransmetteur 1) est l'un des principaux systèmes stimulateurs sur la sécrétion de GnRH (pour revue, voir Prevot *et al.*, 2000a), 2) est exprimé dans des cellules en étroite association morphologique avec les neurones à GnRH (Figure 8A, observation personnelle) (Herbison *et al.*, 1996), et 3) n'agit pas sur sa cellule cible via un récepteur 'classique' mais diffuse sur ses cellules voisines au niveau desquelles il module la fonction guanylate cyclase et cyclooxygénase (Figure 8B) (Dawson et Snyder, 1994 ; Schuman et Madison, 1994). De plus, des études pharmacologiques ont suggéré que les opioïdes auraient la capacité de diminuer l'activité nNOS de l'aire préoptique (Pu *et al.*, 1997 ; Bhat *et al.*, 1998 ; Cuéllar *et al.*, 2000).

Lors de cette cinquième étude, nous avons utilisé une technique d'immunohistochimie couplée à l'hybridation *in situ* afin de déterminer si les neurones nNOS de l'aire préoptique exprimaient l'ARNm codant le récepteur aux opioïdes μ . Le pourcentage de cellules nNOS exprimant l'ARNm codant le récepteur μ a été quantifié dans différentes régions composant

l'aire préoptique : bandelettes diagonales de Broca (DBB), Organum vasculosum de la laminae terminalis (OVLT), noyau préoptique médian (MePO), aire préoptique médiale (MPO), et noyau préoptique médial (MPN).

Research report

μ Opioid receptor mRNA expression in neuronal nitric oxide synthase-immunopositive preoptic area neurons

Sebastien Bouret^{a,*}, Vincent Prevot^a, Dominique Croix^a, Odile Viltart^b, George B. Stefano^c, Valerie Mitchell^a, Jean-Claude Beauvillain^a

^aINSERM Unite 422, IFR 22, Laboratoire de Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

^bLaboratoire des Neurosciences du Comportement, Universite de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France

^cNeuroscience Research Institute, State University of New York at Old Westbury, Old Westbury, NY 11568, USA

Accepted 23 May 2000

Abstract

Nitric oxide (NO) as well as β -endorphin are involved in the neuroendocrine control of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion. Recently, morphological and microdialysis experiments have suggested that β -endorphin may exert an inhibitory influence on NO release in the preoptic area of rat hypothalamus. The present study determines if the μ opioid receptor mRNA is expressed in neuronal NO synthase (nNOS)-immunopositive neurons and if this expression varies among the regions of the basal forebrain being examined. We found, through the use of immunohistochemical and in situ hybridization techniques, that the μ opioid receptor mRNA is expressed in a representative subpopulation of nNOS-immunoreactive neurons in the rat preoptic area. Interestingly, the μ opioid receptor mRNA/nNOS-immunoreactive coexpression is predominant in the rostral and median preoptic area, containing most of GnRH cell bodies. These results strongly suggest that β -endorphin, via an action through μ opioid receptors, may directly participate in the regulation of NO production in the preoptic area. Our results strengthen the hypothesis that β -endorphin may participate in GnRH neuronal modulation at the cell body level by regulating NO release from the interneurons of the preoptic area that express nNOS.

© 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Theme: Endocrine and autonomic regulation

Topic: Hypothalamic-pituitary-gonadal regulation

Keywords: Nitric oxide synthase; μ Opioid receptor; β -Endorphin; Preoptic area; Rat

1. Introduction

Nitric oxide (NO), a gaseous messenger molecule, is involved in a variety of physiological processes [25]. In the brain, NO is synthesized from L-arginine by neuronal nitric oxide synthase (nNOS), a constitutively expressed NOS isoform found in discrete neuronal cell populations [32]. One such area, expressing nNOS cell populations, in the rat brain is within the hypothalamus [8,32,36]. Pharmacological evidence suggests that NO is involved in the neuroendocrine control of reproduction, and it plays a key role in the regulation of GnRH secretion [3–

5,21,24,26,27]. In this regard, the preoptic area that contains GnRH cell bodies also has many nNOS cell bodies [36].

Opioid peptides, especially β -endorphin, appear to exert a tonic inhibitory control on GnRH secretion in the rat [17,18,20]. Although some authors have observed physical contacts between β -endorphin-containing nerve endings and GnRH cell bodies [9,10,19], it has never been possible to detect the μ opioid receptor mRNA in GnRH neurons [23,31]. This suggests that the modulatory role of β -endorphin on the GnRH neuronal activity is indirect. Synaptic connections have been observed between β -endorphin-containing axon terminals and nNOS-expressing perikarya in the diagonal band of Broca (DBB) and preoptic area of the rat [28]. Recent studies also have shown that NO release itself is under influence of β -

*Corresponding author. Tel.: +33-3-2062-2062; fax: +33-3-2062-2061.

E-mail address: bouret@biserte.lille.inserm.fr (S. Bouret).

endorphin [12,28], suggesting that the opioidergic neurons may constitute a significant component engaged in restraining NO efflux in the hypothalamus. Since a close anatomical relationship exists between nNOS cell bodies and GnRH perikarya at the preoptic area [16], NO appears to be a good candidate for the mediation of the β -endorphinergic modulatory activity on GnRH secretion. As the existence of a direct morphofunctional interaction between β -endorphin and nNOS neurons depends on the possibility that nNOS neurons express the μ opioid receptor, we determined whether the μ opioid receptor mRNA is expressed in nNOS neurons in hypothalamic areas where GnRH neurons are located.

2. Materials and methods

2.1. Animals and tissue preparation

Adult male Wistar rats ($n=6$) weighing 300 g (CERJ, Saint-Berthevin, France) were maintained on a 14 h light, 10 h dark schedule, with food and water available *ad libitum*. Animals were anaesthetised with ketamine (20 mg/kg)/xylazine (0.2 ml/kg), then perfused intracardially with 5–10 ml saline followed by 500 ml 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Brains were removed and immersed in the same fixative solution for 2 h. They were then washed overnight in 0.05 M Coons veronal buffer, (pH 7.4), containing 20% sucrose, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Naperville, CA), and frozen in liquid nitrogen. Frozen 14 μ m coronal sections from the DBB to the end of the preoptic area were collected onto gelatine-coated slides, from plate 16 to 21 (+0.45 to -0.51 mm from Bregma) according to the atlas of Swanson [34] and stored at -80°C until used. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), regarding mammalian research.

2.2. μ riboprobe synthesis

The pGEM-4Z vector containing a 450 bp EcoRI/HindIII fragment of rat μ opioid peptide receptor cDNA spanning TM III to VI (kindly provided by H. Akil and S.J. Watson, The University of Michigan, USA) was linearized by cutting at a single site with EcoRI for the antisense probe or HindIII for the sense probe. *In vitro* transcription was performed using the T7 RNA polymerase for the antisense and SP6 RNA polymerase for the sense μ receptor probes [α - ^{35}S]CTP (Amersham, France).

2.3. Immunohistochemical technique

Sections were rinsed in 0.1 M Tris-buffered saline (TBS) and incubated overnight at room temperature with a sheep polyclonal nNOS antiserum (provided by Dr. P.C.

Emson, UK) in a final dilution of 1/3000 in TBS containing 1% normal donkey serum. Antigen-antibody binding sites were visualized using biotinylated-linked donkey anti-sheep (1/200, for 2 h) (Jackson, West Grove, PA) and the standard ABC amplification method (Vector laboratories, Burlingame, CA). After the DAB reaction, sections were rinsed in TBS and then processed for *in situ* hybridization.

2.4. *In situ* hybridization technique

In situ hybridization was performed following a protocol described previously in detail [13]. Briefly, processed sections were hybridized with riboprobe-hybridization buffer mix, which contained the ^{35}S -labelled μ cRNA probe (30,000 cpm/ μ l). Overnight hybridization at 55°C was followed by RNase treatment, a series of stringent washes, including a high-stringency wash at 60°C . Hybridized slides were dehydrated in 70% and 100% ethanols in ammonium acetate, and dipped in K5 emulsion (Integra Biosciences, France). Following a 20-day exposure, slides were developed.

2.5. Controls

The specificity of the nNOS antibody has been previously examined in detail [16]. The control of the immunohistochemical staining was checked by using: (1) the preimmune serum instead of nNOS antiserum, (2) the adsorbed antiserum (200 μ g of nNOS per ml undiluted serum), and (3) the secondary labeled antiserum alone. The controls for specificity included incubation of the sections with [^{35}S]-labeled sense probes, pretreatment with ribonuclease and incubation with a 100-fold excess of unlabeled antisense probe. No specific labeling was observed on the control sections.

2.6. Quantitative analysis

Using the rat brain atlas of Swanson [34] as an anatomical guide, four rostro-caudal subdivisions were processed: the first one contained the DBB (DBB: +0.45 to +0.10 mm from Bregma), the second one concerned the rostral preoptic area (rPOA/OVLT: +0.10 to -0.11 mm from Bregma), the third one contained the median preoptic area (mPOA: -0.11 to -0.26 mm from Bregma), and the last one concerned the caudal part of the preoptic region (SCH/MPN: -0.26 to -0.51 mm from Bregma). Within each subdivision, we examined the expression of the μ mRNA in nNOS-immunoreactive cells in the nuclei: organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT), median preoptic nucleus (MePO), medial preoptic area (MPO) and medial preoptic nucleus (MPN). Four tissue sections per area or nucleus were analyzed for each animal. The nNOS-immunoreactive cells were counted under a $\times 20$ objective at bright-field illumination with an axioskop

microscope (Zeiss, Germany). Each darkly stained nNOS neuron was examined for the presence of silver grains using alternative observations in bright-field and epiillumination. The total number of nNOS-immunoreactive cells and nNOS-immunoreactive cells coexpressing the μ opioid receptor mRNA were counted for each animal. From these data, the number of nNOS-immunoreactive cells on one hand, and the number of nNOS-immunoreactive/ μ mRNA-expressing cells on the other hand per hemisection were averaged for each subdivision. The proportion of nNOS-immunoreactive neurons that contained μ opioid receptor mRNA was then calculated in each region of the four rostro-caudal subdivisions of the DBB and preoptic area.

3. Results

3.1. Distribution of the nNOS-immunoreactive neurons

Cells immunoreactive for nNOS had a widespread distribution across the DBB and preoptic area (Fig. 1). The distribution of nNOS-immunoreactive neurons was in agreement with previous immunohistochemical [8,16], in situ hybridization [14], and NADPH-diaphorase staining studies [35]. A large population of nNOS-immunoreactive cells was detected in the rostral and medial preoptic areas and in the different nuclei examined that contained (see Figs. 1 and 2): A. DBB 39.8 ± 2.7 neurons/hemisection (Fig. 1A); B. OVLT 22.0 ± 2.4 neurons/hemisection (Fig.

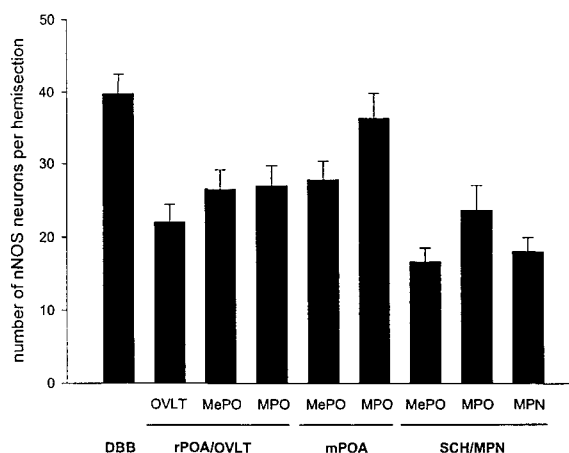


Fig. 2. Number of nNOS-IR cells per hemisection across the rostral forebrain. A large number of nNOS-IR cells are observed in the DBB, rPOA/OVLT and mPOA. The values are the mean \pm S.E.M. SCH, suprachiasmatic nucleus.

1B); C. MePO subdivision rPOA/OVLT: 26.5 ± 2.7 ; subdivision mPOA: 27.8 ± 2.6 neurons/hemisection (Fig. 1B, 1C); D. MPO subdivision rPOA/OVLT: 27.0 ± 2.8 neurons/hemisection; subdivision mPOA: 36.4 ± 3.5 neurons/hemisection; subdivision SCH/MPN: 23.7 ± 3.4 neurons/hemisection (Fig. 1B–D). In the DBB, rPOA/OVLT and mPOA, these cells formed an « inverted Y » distribution above the third ventricle (Fig. 3A). In contrast, the AVPV only had a few positive nNOS-immunoreactive cells (Figs.

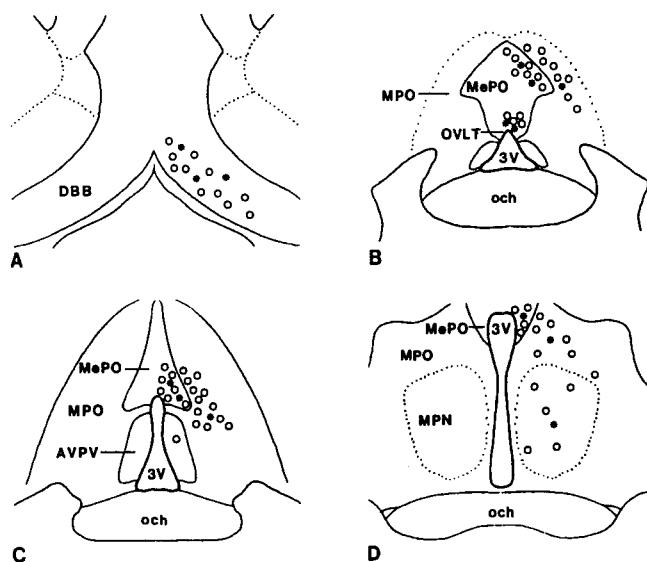


Fig. 1. Schematic drawings depicting the distribution of nNOS-immunoreactive cells (open circles) and nNOS-immunoreactive and μ mRNA-expressing cells (solid stars) in four rostro-caudal subdivisions of the preoptic area. (A) DBB level, (B) rPOA/OVLT level, (C) mPOA level, and (D) rPOA/SCH level. Each symbol represents three nNOS cells or three nNOS/ μ cells, except for the AVPV nucleus where one nNOS cell is noted with one open circle. AVPV, anteroventral periventricular nucleus; DBB, diagonal bands of Broca; mPOA, medial preoptic area; rPOA, rostral preoptic area; MePO, median preoptic nucleus; MPN, medial preoptic nucleus; MPO, medial preoptic area; OVLT, organ vasculosum of the lamina terminalis; 3 V, third ventricle; och, optic chiasma.

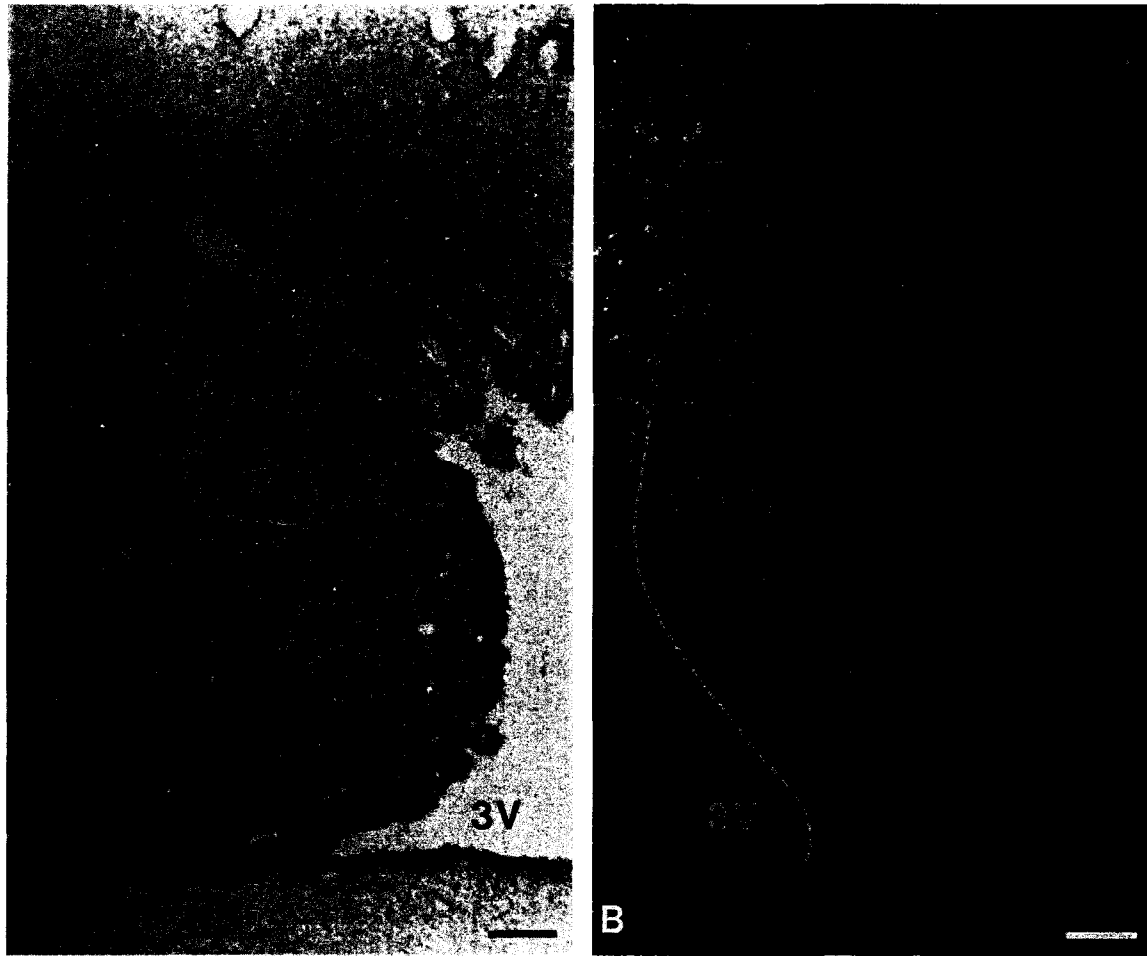


Fig. 3. Brightfield (A) and darkfield (B) photomicrographs expressing nNOS-IR neurons (A) and μ mRNA cells (B) in a representative section of the preoptic area (AVPV). A large number of nNOS-IR cells are found in the MePO and MPO whereas few nNOS-IR cells are detected in the AVPV. μ mRNA-expressing cells are widely distributed among the preoptic area. 3 V, third ventricle. Scale bar = 200 μ m.

IC and 3A). More caudally (subdivision SCH/MPN shown in Figs. 1D and 2), the number of nNOS-immunoreactive cells was low in the MePO (16.7 ± 1.9 neurons/hemisection) and in the MPN (18.1 ± 1.9 neurons/hemisection).

3.2. Distribution of the μ mRNA-expressing cells

The distribution of the μ mRNA-expressing cells (Fig. 3B) was identical to that reported previously [11,22,23]. In accordance with these studies, no preferential distribution of the μ mRNA-expressing cells was noticed among the different areas analyzed.

3.3. μ opioid receptor mRNA expression in nNOS-immunoreactive cells

A representative subpopulation of nNOS-immuno-

reactive neurons in the DBB and preoptic area expressed the μ opioid receptor mRNA (Fig. 4). The results of the quantitative analysis are detailed in Fig. 5. Noticeably, the double-labeled cells were identified in all regions examined (Figs. 1 and 5). The μ mRNA-expressing nNOS cells were predominantly detected within the rostral and median preoptic regions (subdivisions rPOA/OVLT and mPOA) (Figs. 1 and 5). Strikingly the highest coexpression of the μ mRNA and nNOS-immunoreactivity was detected in the OVLT ($28.6 \pm 4.6\%$), the rostral and median subdivisions of the MePO (subdivision rPOA/OVLT: $24.3 \pm 2.7\%$; and in the subdivision mPOA: $22.0 \pm 3.2\%$) (Figs. 1 and 5). In contrast, in the other regions, the coexpression of nNOS-immunoreactive and μ -mRNA was significantly lower [$P < 0.01$ (DBB, $11.9 \pm 2.7\%$; MPO, subdivision rPOA/OVLT: $13.3 \pm 2.7\%$, subdivision mPOA: $11.4 \pm 2.2\%$, subdivision SCH/MPN: $4.2 \pm 1.4\%$; MePO, subdivision SCH/MPN: $10.1 \pm 1.6\%$; MPN: $4.6 \pm 1.1\%$)].

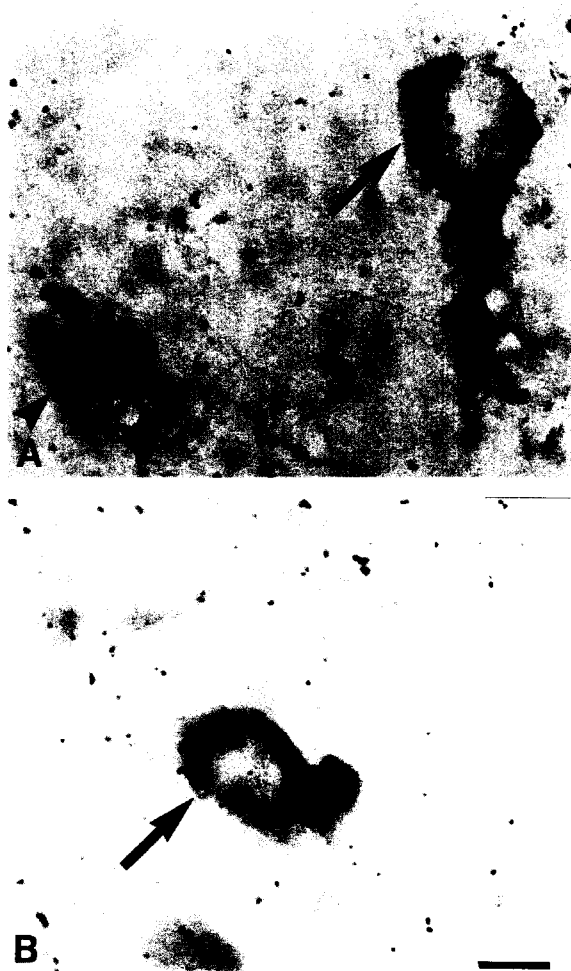


Fig. 4. (A, B) Photomicrographs demonstrating nNOS-immunoreactive cells (darkly stained) expressing the μ opioid receptor mRNA (silver grains) in the preoptic area. Arrows point to dual-labeled cells; the arrowhead points to a single-labeled nNOS cell. Scale bar=20 μ m.

4. Discussion

The present study demonstrates the existence of a potentially important signaling pathway between opioids and the NO-producing neurons in the DBB and the preoptic area of the rat that contain GnRH neurons [33]. Numerous nNOS-immunopositive neurons are found to express the μ opioid receptor mRNA. In this regard, Pu et al. [28] reported that β -endorphin nerve terminals established synaptic contacts with nNOS-immunoreactive neurons in the DBB and preoptic area. The present study extends this finding by demonstrating that these synaptic contacts might be functional. Consequently, it appears likely that the β -endorphin may have a direct influence on the NO secretory activity from the nNOS neurons of the preoptic area.

Intriguingly, GnRH cell bodies also receive direct inputs

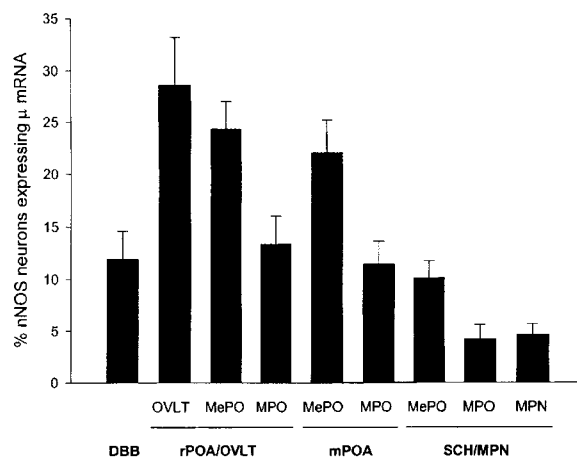


Fig. 5. Proportion of nNOS expressing μ opioid receptor mRNA cells throughout four rostro-caudal subdivisions, including the DBB and preoptic area. Most of the dual-labeled neurons are found in the rPOA/OVLT and mPOA subdivisions. Values are given as the mean \pm S.E.M.

from the β -endorphinergic neurons in the preoptic area in both males and females [9,10,19], but opioid receptor mRNAs are not detectable in GnRH neurons [23,31]. These latter *in situ* hybridization results question whether the tonic inhibitory influence of β -endorphin on GnRH secretion is direct and suggest the existence of intermediate systems to mediate this communication. NO, that stimulates GnRH/LH secretion [4,29], has been proposed to participate in this mediation [1,6,7,17,24,30]. This hypothesis is supported by morphological observations showing that nNOS neurons are in close proximity to GnRH perikarya in the preoptic area and more particularly in its rostral part [16]. Interestingly, in the present work, the most important population of the nNOS neurons expressing the μ opioid receptor mRNA is also detected in the rostral preoptic area, especially in the OVLT and MePO, known to contain the most of GnRH neurons [33]. Based on these data, we speculate that the β -endorphin could exert part of its tonic inhibitory effect on the GnRH neuroendocrine axis [15] via a modulation of NO release at the preoptic area.

The implication of NO in the mediation of the tonic inhibitory influence of opioids on the GnRH neuroendocrine axis is also strengthened by the experiments of Pu et al. [28] showing in the male rat that a subcutaneous injection of naloxone, an opioid receptor antagonist, stimulates both cGMP/NO release at the medial preoptic area and the pituitary LH (luteinizing hormone) release. Pretreatment with morphine, the μ opioid receptor agonist, abolished both the naloxone-induced cGMP/NO and LH release [28]. Bhat et al. [2] also showed that NOS activity was increased in the preoptic area after naloxone treatment and succeeded in abolishing this stimulatory effect of naloxone on NOS activity by the administration of MK-801, a glutamate NMDA receptor antagonist, suggesting

the existence of an opioid-glutamate-NO signaling pathway. Altogether, these studies suggest that the nNOS neurons located in the vicinity of GnRH neurons cell bodies might play a key role in the modulation of GnRH secretion via the integration of both stimulatory and inhibitory influences reaching the preoptic area to control GnRH neuronal activity.

In conclusion, the present study provides the morphological evidence that in the preoptic area, endogenous opioid peptides can directly modulate NO release from nNOS-expressing neurons through μ opioid receptors. Because NO has been shown to play a key role in the regulation of GnRH secretion, our study suggests an additional element facilitating the understanding of one of the mechanisms by which endogenous opioids may restrain GnRH neuronal activity.

Acknowledgements

This work was supported by Lille-Amiens-Rouen-Caen (LARC)-neuroscience network and the University of Lille II. The authors are grateful to Dr. P.C. Emson for his generous gift of antibody.

References

- [1] G.K. Bhat, V.B. Mahesh, C.A. Lamar, L. Ping, K. Aguan, D.W. Brann, 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 (1995) 187–197.
- [2] G.K. Bhat, V.B. Mahesh, L. Ping, L. Chorch, V.T. Wiedmeier, D.W. Brann, Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat, *Endocrinology* 139 (1998) 955–960.
- [3] J.J. Bonavera, P.S. Kalra, S.P. Kalra, L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y, *Endocrinology* 137 (1996) 1956–1962.
- [4] J.J. Bonavera, A. Sahu, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids, *Endocrinology* 133 (1993) 2481–2487.
- [5] J.J. Bonavera, A. Sahu, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges, *Brain Res.* 660 (1994) 175–179.
- [6] D.W. Brann, G.K. Bhat, C.A. Lamar, V.B. Mahesh, Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation, *Neuroendocrinology* 65 (1997) 385–395.
- [7] D.W. Brann, V.B. Mahesh, Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 678–700.
- [8] D.S. Bredt, C.E. Glatt, P.M. Hwang, M. Fotuhi, T.M. Dawson, S.H. Snyder, Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase, *Neuron* 7 (1991) 615–624.
- [9] W.P. Chen, J.W. Witkin, A.J. Silverman, beta-Endorphin and gonadotropin-releasing hormone synaptic input to gonadotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the male rat, *J. Comp. Neurol.* 286 (1989) 85–95.
- [10] W.P. Chen, J.W. Witkin, A.J. Silverman, Sexual dimorphism in the synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurons, *Endocrinology* 126 (1990) 695–702.
- [11] J.M. Delfs, H. Kong, A. Mestek, Y. Chen, L. Yu, T. Reisine, M.F. Chesselet, Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level, *J. Comp. Neurol.* 345 (1994) 46–68.
- [12] A.G. Faletti, C.A. Mastronardi, A. Lomniczi, A. Scilicovich, M. Gimeno, S.M. McCann, V. Rettori, beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitric oxide pathway controlling its release, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 1722–1726.
- [13] C. Faure-Virelizier, D. Croix, S. Bouret, V. Prevot, S. Reig, J.C. Beauvillain, V. Mitchell, Effects of estrous cyclicity on the expression of the galanin receptor Gal-R1 in the rat preoptic area: a comparison with the male, *Endocrinology* 139 (1998) 4127–4139.
- [14] A.B. Grossman, W.G. Rossmanith, E.B. Kabigting, G. Cadd, D. Clifton, R.A. Steiner, The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons, *J. Endocrinol.* 140 (1994) R5–R8.
- [15] A.E. Herbison, Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons, *Endocr. Rev.* 19 (1998) 302–330.
- [16] A.E. Herbison, S.X. Simonian, P.J. Norris, P.C. Emson, Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat, *J. Neuroendocrinol.* 8 (1996) 73–82.
- [17] S.P. Kalra, Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge, *Endocr. Rev.* 14 (1993) 507–538.
- [18] S.P. Kalra, P.S. Kalra, Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat, *Endocr. Rev.* 4 (1983) 311–351.
- [19] C. Leranth, N.J. MacLusky, M. Shanabrough, F. Naftolin, Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat, *Brain Res.* 449 (1988) 167–176.
- [20] R.H. Lustig, J. Fishman, D.W. Pfaff, Ovarian steroids and endogenous opioid peptide action in the control of the rat LH surge, in: R. Dyer, R. Bicknell (Eds.), *Brain Opioid Systems in Reproduction*, Oxford University Press, Oxford, 1989, pp. 3–26.
- [21] S.M. McCann, C. Mastronardi, A. Walczewska, S. Karanth, V. Rettori, W.H. Yu, The role of nitric oxide in reproduction, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (1999) 1367–1379.
- [22] A. Mansour, C.A. Fox, S. Burke, F. Meng, R.C. Thompson, H. Akil, S.J. Watson, Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study, *J. Comp. Neurol.* 350 (1994) 412–438.
- [23] V. Mitchell, V. Prevot, L. Jennes, J.P. Aubert, D. Croix, J.C. Beauvillain, Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat, *Neuroreport* 8 (1997) 3167–3172.
- [24] M. Moretto, F.J. Lopez, A. Negro-Vilar, Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion, *Endocrinology* 133 (1993) 2399–2402.
- [25] R.J. Nelson, L.J. Kriegsfeld, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior, *Front Neuroendocrinol.* 18 (1997) 463–491.
- [26] V. Prevot, D. Croix, C.M. Rialas, P. Poulain, G.L. Fricchione, G.B. Stefano, J.C. Beauvillain, Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor, *Endocrinology* 140 (1999) 652–659.
- [27] V. Prevot, C.M. Rialas, D. Croix, M. Salzet, J.P. Dupouy, P. Poulain, J.C. Beauvillain, G.B. Stefano, Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation, *Brain Res.* 790 (1998) 236–244.

- [28] S. Pu, T.L. Horvath, S. Diano, F. Naftolin, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide, *Endocrinology* 138 (1997) 1537–1543.
- [29] V. Rettori, N. Belova, W.L. Dees, C.L. Nyberg, M. Gimeno, S.M. McCann, Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 10130–10134.
- [30] V. Rettori, A. Kamat, S.M. McCann, Nitric oxide mediates the stimulation of luteinizing-hormone releasing hormone release induced by glutamic acid in vitro, *Brain Res. Bull.* 33 (1994) 501–503.
- [31] M.I. Sannella, S.L. Petersen, Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors, *Endocrinology* 138 (1997) 1667–1672.
- [32] E.M. Schuman, D.V. Madison, Nitric oxide and synaptic function, *Annu. Rev. Neurosci.* 17 (1994) 153–183.
- [33] A.J. Silverman, J. Jhamandas, L.P. Renaud, Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence, *J. Neurosci.* 7 (1987) 2312–2319.
- [34] L.W. Swanson, *Structure of the Rat Brain*, Elsevier Science Publisher B.V, The Netherlands, 1992.
- [35] S.R. Vincent, H. Kimura, Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, *Neuroscience* 46 (1992) 755–784.
- [36] K. Yamada, P. Emson, T. Hokfelt, Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides, *J. Chem. Neuroanat.* 10 (1996) 295–316.

Les résultats de cette étude montrent que 5 à 30% des neurones nNOS de l'aire préoptique expriment l'ARNm codant le récepteur μ . Ces neurones sont donc des cibles directes de la β -endorphine. La plus forte proportion de neurones doublement marqués est observée dans l'OVLT et le MePO, régions localisées dans l'aire préoptique rostrale et contenant la plupart des corps cellulaires des neurones à GnRH.

Ces résultats suggèrent que la β -endorphine peut directement moduler l'activité des neurones synthétisant la nNOS. Ces résultats sont à rapprocher des études pharmacologiques montrant que la naloxone stimule la production de NO dans l'aire préoptique (Pu *et al.*, 1997 ; Bhat *et al.*, 1998 ; Cuéllar *et al.*, 2000) et suggérant ainsi que la β -endorphine inhiberait l'activité NOergique de l'aire préoptique. Aussi, nos résultats de régionalisation sont à mettre en parallèle avec les travaux d'Herbison *et al.* (1996) montrant que la quasi-totalité des neurones à GnRH sont entourés de neurones exprimant la nNOS dans l'aire préoptique rostrale et beaucoup moins dans les autres régions de l'aire préoptique. L'ensemble de ces observations suggère fortement que la β -endorphine induirait son effet inhibiteur sur l'activité des neurones à GnRH en restreignant l'activité des neurones nNOS de l'aire préoptique et qu'il existerait ainsi un "axe" β -endorphine-NO-GnRH.

DISCUSSION

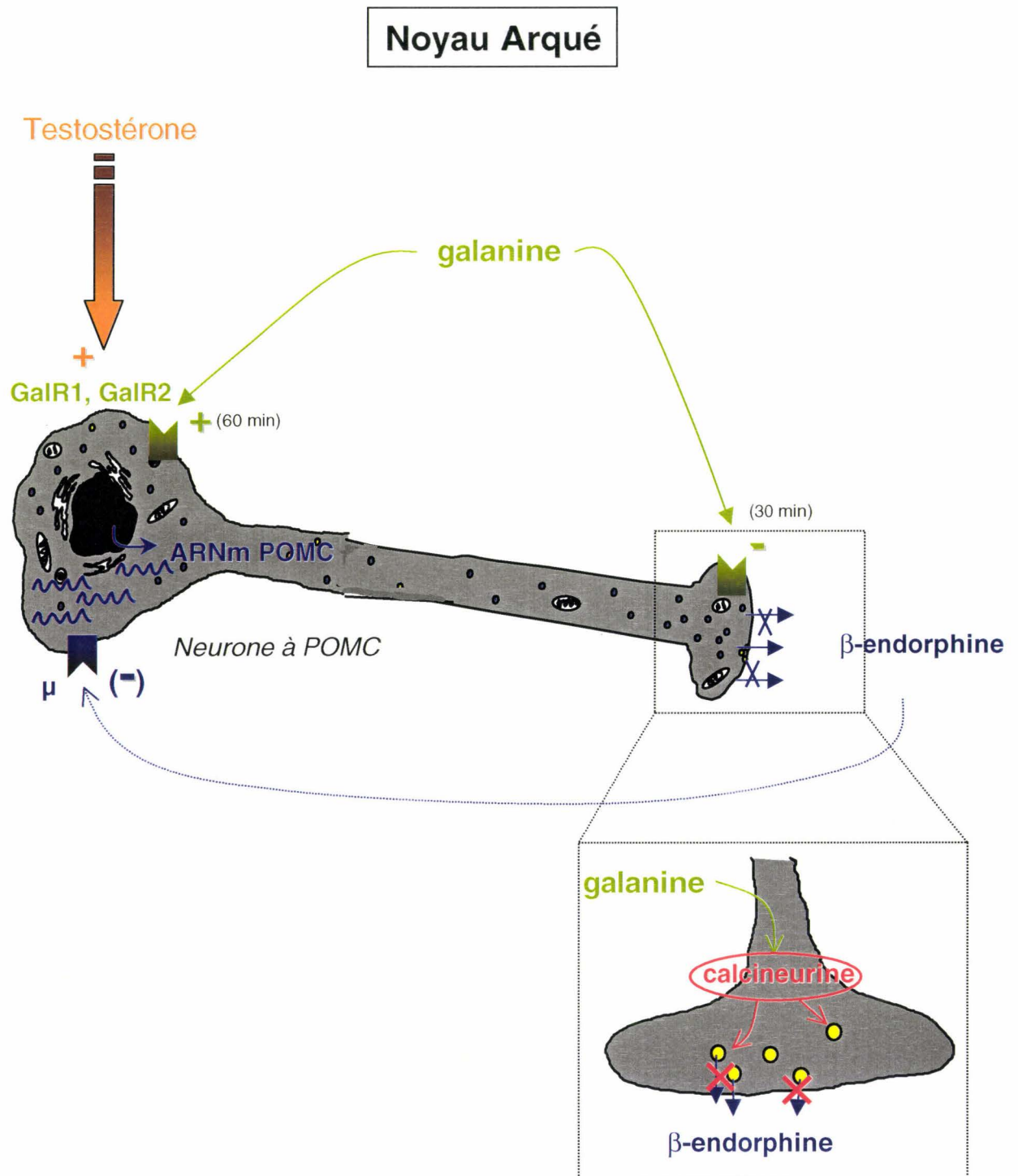


Figure 9. Action de la galanine sur les neurones à POMC.

La galanine induit une diminution de la libération de β -endorphine (-, vert) suivie d'une augmentation de l'expression de l'ARNm codant la POMC (+, vert) et d'une accumulation du peptide dans le tissu. La calcineurine (protéine phosphatase 2B) semble être mise en jeu pour induire les effets inhibiteurs de la galanine sur la libération de β -endorphine. Ces effets semblent en partie directs puisque les neurones à POMC expriment l'ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2. A noter l'effet stimulateur de la testostérone (+, orange) sur l'expression de l'ARNm codant ces récepteurs. Par ailleurs, un effet inhibiteur de la β -endorphine (-, bleu) sur sa propre libération peut être envisagé au sein du noyau arqué.

Discussion

I. Interrelations galanine/POMC

a) Arguments en faveur d'une action directe de la galanine sur le système à POMC

Les résultats de notre première étude montrent, chez le rat mâle, que les neurones à POMC peuvent exprimer les ARNm codant les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2 et permettent ainsi d'envisager l'existence d'une modulation directe de l'activité des neurones à POMC par la galanine (Figure 9). Ces résultats impliquent aussi que les contacts synaptiques observés entre les fibres galaninergiques et les neurones à β -endorphine (Horvath *et al.*, 1995a) sont fonctionnels. Cependant, alors qu'Horvath *et al.* (1995a) rapportent que près de 90% des neurones à β -endorphine présentent des éléments galaninergiques à leurs proches voisinages, notre étude de quantification révèle que 14% et 21% des neurones à POMC expriment, respectivement, l'ARNm codant le GalR1 ou le GalR2. Ces observations suggèrent que les neurones à POMC expriment d'autres sous-types de récepteurs de la galanine.

Actuellement, l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre les différents sous-types des récepteurs de la galanine ne nous permet pas à déterminer avec précision la localisation de ces récepteurs. Néanmoins, la présence de contacts synaptiques entre les fibres à galanine et les péricaryons à β -endorphine (Horvath *et al.*, 1995a), ainsi que d'une forte densité de sites de liaisons pour la galanine dans le noyau arqué (Lagny-Pourmir et Epelbaum, 1992 ; Planas *et al.*, 1994), nous permettent d'envisager que des récepteurs sont présents au niveau du corps cellulaire à β -endorphine. Il est également vraisemblable que les récepteurs soient exportés dans les terminaisons nerveuses puisque de nombreuses régions contenant des terminaisons nerveuses à β -endorphine présentent des sites de liaison à la galanine (Lagny-Pourmir et

Epelbaum, 1992 ; Planas *et al.*, 1994). Lors de notre première étude, seuls deux récepteurs de la galanine, le GalR1 et le GalR2, avaient été clonés. Entre temps, un troisième sous-type de récepteur de la galanine, nommé GalR3, a été identifié. Cependant, l'expression de ce récepteur de la galanine dans l'hypothalamus est controversée. En effet, alors que Wang *et al.* (1997) signalent par RT-PCR une absence d'expression de l'ARNm codant ce récepteur dans l'hypothalamus, Kolakowsky *et al.* (1998) et Waters *et al.* (2000) détectent la présence de l'ARNm GalR3 dans l'hypothalamus. Pour notre part, nos résultats de RT-PCR révèlent que l'ARNm codant le GalR3 est exprimé dans l'hypothalamus médiobasal et confirment ainsi les données de ces derniers auteurs. Ainsi, une action de la galanine sur l'activité des neurones à POMC via le récepteur GalR3 ne peut être exclue. Des travaux d'hybridation *in situ* sont d'ailleurs en cours afin d'essayer de déterminer l'expression de ce récepteur à l'échelle cellulaire. Il est cependant difficile, du fait de l'absence d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques pour chacun des sous-types des récepteurs de la galanine, de déterminer avec précision l'implication et le rôle respectif des différents sous-types des récepteurs de la galanine dans la régulation de l'activité des neurones à POMC. Le fait que le GalR2 soit le récepteur exprimé de façon prédominante dans les neurones à POMC –notamment ceux localisés dans le noyau arqué antérieur- nous suggère cependant que ce récepteur participe pour une part importante dans cette interrelation galanine/POMC. L'utilisation du nouveau peptide membre de la famille de la galanine, nommé 'GALP' (galanin-like peptide) qui a la particularité de se fixer avec une plus forte affinité sur le récepteur GalR2 par rapport au récepteur GalR1 (Ohtaki *et al.*, 1999), pourrait nous permettre d'évaluer l'importance du récepteur GalR2 dans la physiologie de régulation de l'activité des neurones à POMC par la galanine. Cette participation du GALP est d'autant plus probable que l'ARNm codant ce nouveau membre de la famille de la galanine est exprimé dans l'hypothalamus, et exclusivement dans le noyau arqué (Juréus *et al.*, 2000 ; Larm *et al.*, 2000 ; Kerr *et al.*, 2000).

Le GALP pourrait donc participer, au même titre que la galanine, à la régulation de l'activité des neurones à POMC.

b) Action de la galanine sur le système à POMC

A ce stade de notre étude, il est important de préciser la nature de l'action exercée par la galanine sur l'activité des neurones à POMC. Lors de notre deuxième étude, nous montrons que la galanine inhibe, dès les 30 à 60 premières minutes d'application, la libération de β -endorphine (Figure 9). Suite à cette observation et à l'étude de Renstrom *et al.* (1996) montrant que la galanine induit son effet inhibiteur sur la libération d'insuline via l'activation de calcineurine, nous avons voulu savoir si la galanine provoquait son effet inhibiteur sur la libération de β -endorphine via l'activation de cette protéine phosphatase. Cette hypothèse était d'autant plus concevable que de forts taux l'ARNm codant la calcineurine sont présents dans le noyau arqué (Morishita *et al.*, 1998). Nos résultats, obtenus en incubant la galanine en association avec la FK-506, montrent que l'effet inhibiteur de la galanine sur la libération de β -endorphine est antagonisé par cet inhibiteur de calcineurine. Ces résultats suggèrent ainsi que la galanine inhibe la libération de β -endorphine via l'activation de calcineurine (Figure 9). A noter que la calcineurine a la capacité de modifier l'état de phosphorylation des canaux calciques et ainsi de supprimer les mouvements calciques présents au sein des terminaisons nerveuses entraînant une inhibition de l'exocytose (Sihra *et al.*, 1995).

Dans un deuxième temps, c'est à dire après 60 minutes d'application, la galanine provoque une augmentation des taux d'ARNm POMC dans le noyau arqué (Figure 9). Etant donné que nous ne quantifions pas les transcrits primaires, il est difficile de savoir si cette augmentation des taux d'ARNm POMC est effectivement due à une augmentation de l'activité de transcription ou plutôt à une augmentation de stabilité des messagers. Cependant, puisque nous observons de fortes concentrations de β -endorphine dans les tissus à la fin de la période d'incubation, nous pouvons envisager qu'il se produit une accumulation du peptide

qui peut être due (1) à une augmentation de l'activité de transcription/traduction et/ou, (2) à une diminution de libération de peptide par les terminaisons nerveuses. Il est également envisageable que l'augmentation des taux d'ARNm codant la POMC dans le noyau arqué suite à l'ajout de galanine soit consécutive à la diminution des taux de β -endorphine sécrétée dans le milieu de survie. En effet, de précédents travaux ont révélé que la β -endorphine induisait une diminution des taux d'ARNm codant la POMC dans le noyau arqué (Wardlaw *et al.*, 1996 ; Bronstein *et al.*, 1990 ; Garcia de Yebenes et Pelletier, 1993 ; Fang *et al.*, 1998). Ainsi, la diminution de la β -endorphine sécrétée dans le milieu de survie pourrait avoir l'effet inverse et induire une augmentation des niveaux d'ARNm codant la POMC observée après incubation avec la galanine. Nos résultats montrant l'expression de l'ARNm codant le récepteur μ par les neurones à POMC sont d'ailleurs en faveur d'une action inhibitrice directe de la β -endorphine sur le système à POMC (Figure 9).

Une autre hypothèse est également concevable afin de mieux comprendre les effets opposés de la galanine sur la synthèse d'ARNm codant la POMC et sur la libération de β -endorphine. En effet, la galanine pourrait avoir un effet inhibiteur sur la libération de β -endorphine, mais effet stimulateur sur la libération d'un autre peptide dérivé de la POMC telle que l' α -MSH. Ceci a été observé pour un autre neuropeptide, le NPY, qui induit une réponse différentielle selon le peptide dérivé de la POMC considéré. Ainsi, le NPY induit une diminution des taux d'ARNm codant la POMC (Garcia de Yebenes *et al.*, 1995) et une augmentation de la libération de β -endorphine (Kalra *et al.*, 1995) alors qu'il inhibe la libération d' α -MSH (Blasquez *et al.*, 1992, 1995). Ces observations montrent qu'un neuropeptide peut avoir des effets opposés sur la libération de différents peptides issus du clivage de la POMC. Il serait donc intéressant, dans nos futurs travaux, de mesurer la libération d' α -MSH dans le milieu de survie suite à l'action de la galanine. Notamment, étant donné que (i) la galanine est un neuropeptide stimulateur de la reproduction et de la prise

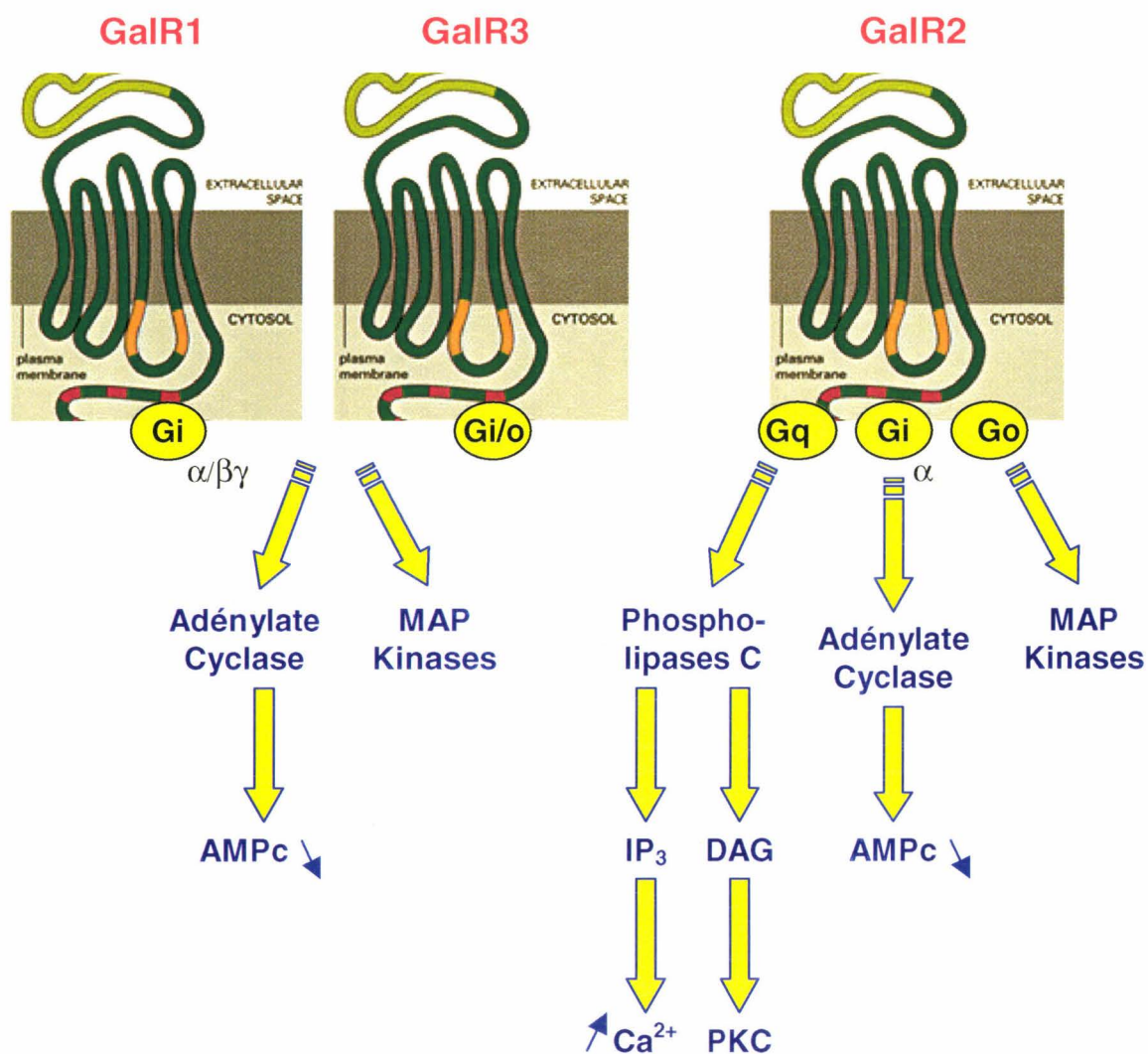


Figure 10. Couplage aux protéines G et signalisation intracellulaire induite par l'activation des récepteurs de la galanine actuellement clonés (GalR1, GalR2, et GalR3).

alimentaire, (ii) l' α -MSH est considéré comme un peptide anorexique majeur et (iii) la β -endorphine est l'un des principaux peptides inhibiteurs du système à GnRH, les interrelations entre la galanine et les différents produits de clivage de la POMC pourraient nous permettre de mieux comprendre l'étroite association qui existe entre la prise alimentaire et la reproduction.

L'action de la galanine sur l'activité des neurones à POMC peut principalement s'expliquer par les différents modes de transduction du signal induits suite à l'activation des récepteurs de la galanine. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (Figure 10) mais alors que les récepteurs GalR1 et GalR3 sont couplés à une protéine Gi/Go, le récepteur GalR2 est couplé à des protéines Gq, Gi et Go (Figure 10). Ces différentes protéines G vont induire des signalisations intracellulaires variées. Ainsi les protéines Gi/Go vont moduler l'activité adénylate cyclase et des MAP kinases et la protéine Gq va activer la voie des phospholipases C (voir Branchek *et al.*, 2000). De même, l'activation des récepteurs de la galanine peut moduler l'activité électrique des cellules cibles via la modification des courants potassiques (voir Branchek *et al.*, 2000). Ainsi, suivant la voie de signalisation intracellulaire empruntée, la galanine pourrait avoir des effets stimulateurs ou inhibiteurs sur sa cellule cible.

c) Implication de l'interrelation galanine/POMC dans la régulation du système à GnRH

Parmi les nombreuses répercussions physiologiques de cette interrelation galanine/POMC, un certain nombre d'arguments nous permettent de l'impliquer dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. En effet, les récepteurs GalR1 et GalR2 sont exprimés de façon hétérogène dans les neurones à POMC avec une expression préférentielle par les neurones à POMC du noyau arqué antérieur. Or, de nombreuses études ont révélé que

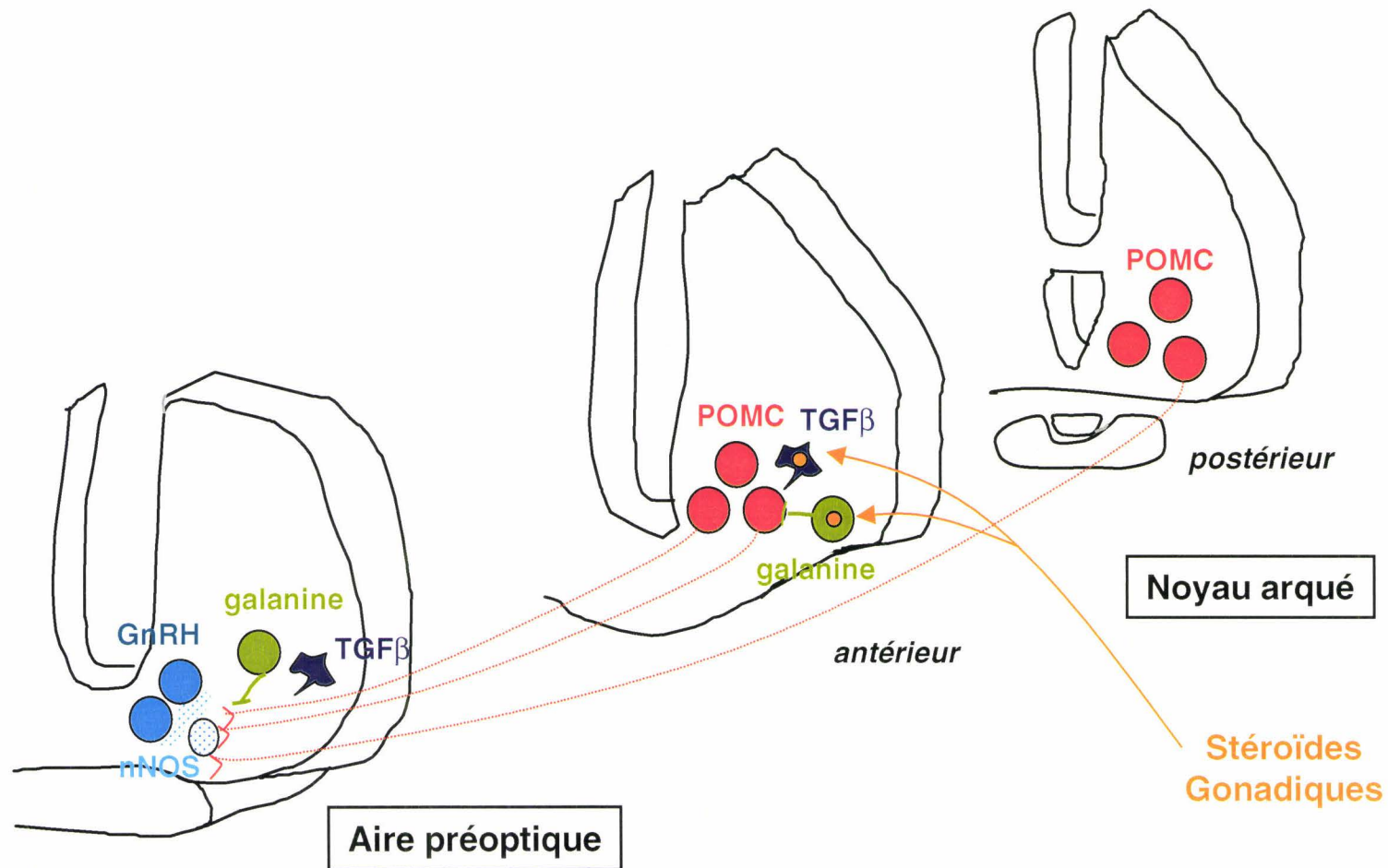


Figure 11. Implication des neurones à POMC cibles de la galanine et du TGFβ dans la régulation du système à GnRH et dans le rétrocontrôle stéroïdien.

les neurones à POMC antérieurs sont particulièrement impliqués dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH. La majorité des terminaisons nerveuses des neurones à POMC qui se projettent vers l'aire préoptique provient notamment du noyau arqué antérieur (Cheung et Hammer, 1995a). Par ailleurs, un déclin de l'activité des neurones à POMC est observé dans le noyau arqué antérieur peu avant la survenue du pic préovulatoire de GnRH/LH (Bohler *et al.*, 1991). Ces observations nous permettent donc d'envisager que beaucoup de neurones à POMC régulés par la galanine se projettent vers l'aire préoptique et participent ainsi à la régulation de l'activité des neurones à GnRH (Figure 11). Ainsi, nos travaux montrant que la galanine induit rapidement une inhibition de la libération de β -endorphine, sont à mettre en parallèle avec des travaux réalisés par Lopez et Negro-Vilar (1990) rapportant que la galanine provoque une stimulation rapide de la libération de GnRH. En effet, étant donné que la β -endorphine est un puissant inhibiteur de la sécrétion de GnRH (Falleti *et al.*, 1999), nous pouvons envisager que la galanine provoquerait, en partie, ses effets stimulateurs sur la libération de GnRH via une levée de l'inhibition exercée par la β -endorphine sur le système à GnRH.

L'existence d'une stéroïdo-dépendance au sein de cette interrelation galanine/POMC renforce également son implication dans la régulation du système à GnRH. En effet, nous observons que l'expression des récepteurs de la galanine dans le noyau arqué et plus précisément dans les neurones à POMC est régulée par les stéroïdes gonadiques : le nombre de neurones à POMC exprimant l'ARNm des récepteurs de la galanine et la quantité de messagers présents au sein de chaque neurone chutent après orchidectomie. Il y a par ailleurs une très forte probabilité pour que chez le mâle la testostérone soit l'hormone gonadique impliquée dans une telle régulation puisque ces effets ne sont pas observés lorsque les animaux sont supplémentés en testostérone (Figure 9). De plus, une étude approfondie selon quatre régions antéro-postérieures du noyau arqué, nous révèle que l'expression des ARNm

codant les récepteurs de la galanine est préférentiellement modulée par la testostérone dans les neurones à POMC du noyau arqué antérieur. Or, c'est exclusivement dans cette subdivision du noyau arqué que l'équipe de Steiner a rapporté que la testostérone augmentait les niveaux d'expression de l'ARNm codant la POMC (Chowen-Breed *et al.*, 1989b ; Chowen *et al.*, 1990). Par ailleurs, en plus d'une action directe de la testostérone via ses récepteurs aux androgènes (Simerly *et al.*, 1989), nous ne pouvons exclure, comme le suggère l'étude de Chowen *et al.* (1990), que la testostérone agisse sur l'expression des récepteurs de la galanine après son aromatisation en œstradiol dans le noyau arqué. Cette hypothèse est renforcée par l'existence d'une importante activité aromatase (enzyme responsable de la transformation de la testostérone en œstrogènes) dans le noyau arqué (Roselli *et al.*, 1985, 1987) et par le fait que des récepteurs aux œstrogènes sont exprimés par quelques neurones à POMC.

Cette interrelation galanine/POMC pourrait être un maillon essentiel du rétrocontrôle qu'exercent les stéroïdes ovariens sur le rôle des dérivés de la POMC sur le système à GnRH. En effet, alors qu'il est admis que les neurones à POMC du noyau arqué sont particulièrement impliqués dans le rétrocontrôle stéroïdien s'exerçant sur le système à GnRH (voir Herbison, 1998), peu d'arguments concluent à une action directe des œstrogènes sur les neurones à POMC. Un travail récent de Simonian *et al.* (1999) démontre notamment qu'aucun neurone à POMC exprimant le récepteur aux œstrogènes α ne se projette vers l'aire préoptique à proximité des neurones à GnRH. L'action des œstrogènes sur les neurones à POMC impliqués dans la régulation du système à GnRH passerait donc par l'intermédiaire d'autres cellules. Les neurones à galanine du noyau arqué semblent précisément d'excellents candidats étant donné que près de 50% d'entre eux expriment le récepteur aux œstrogènes et qu'un site de liaison aux œstrogènes est présent sur le gène codant la galanine (Howard *et al.*, 1997). Ainsi, les neurones à galanine du noyau arqué, via leur action directe sur le système à POMC,

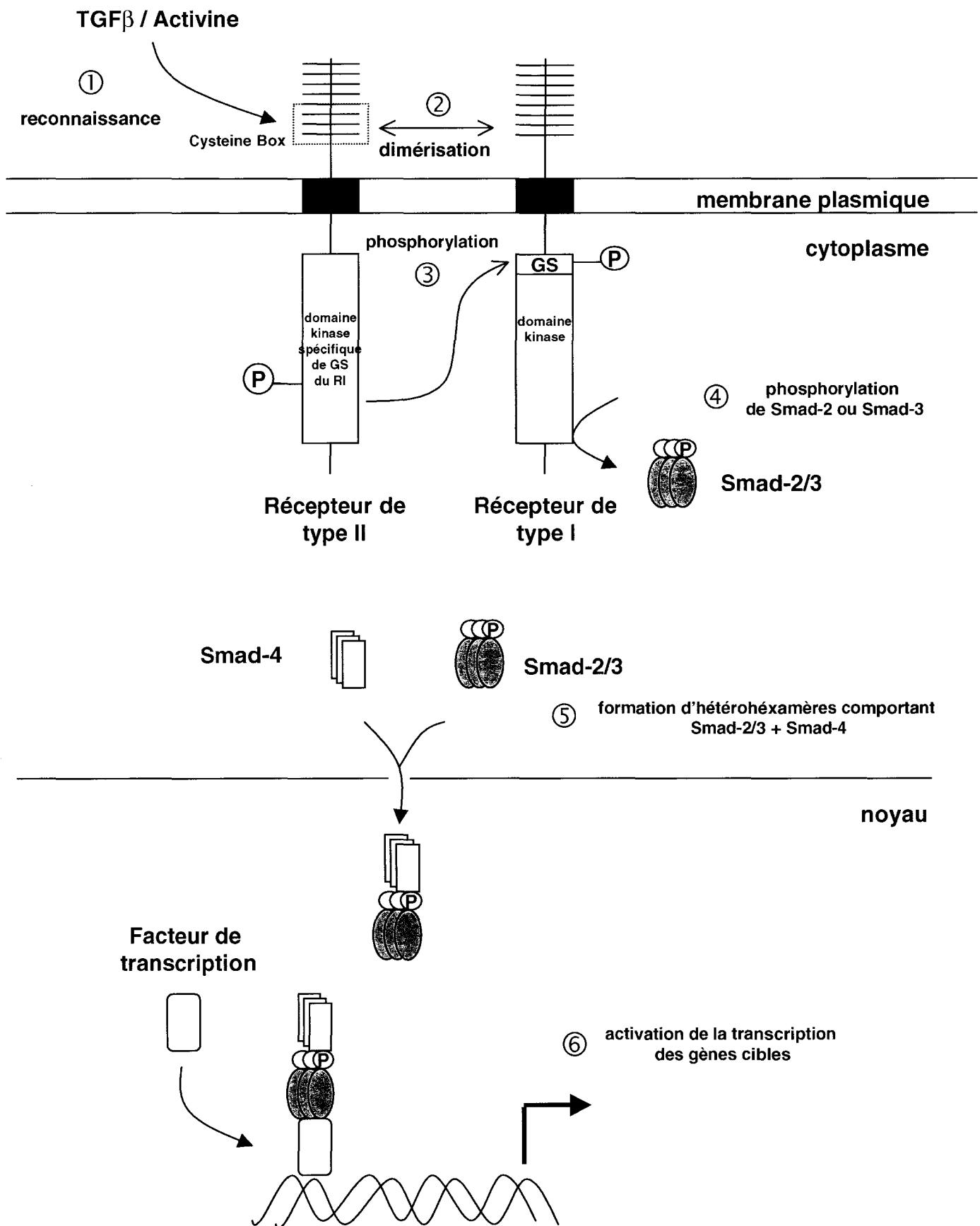


Figure 12. Transduction du signal induite par l'activation des récepteurs au TGFβ

pourraient être l'un des médiateurs du rétrocontrôle exercé par les stéroïdes gonadiques sur les neurones à POMC (Figure 11).

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette première partie de notre travail de thèse nous permet donc d'envisager que les cellules à galanine module directement, au moins via les récepteurs GalR1 et GalR2, l'activité des neurones à POMC. La galanine provoque alors une inhibition rapide de la sécrétion de β -endorphine. Un certain nombre d'arguments nous permettent également d'envisager que la galanine pourrait, par voie polysynaptique, réguler l'activité des neurones à GnRH via les neurones à POMC et véhiculer l'influence des stéroïdes gonadiques sur les neurones à POMC. La découverte récente du GALP ouvre des perspectives de travaux afin de mieux comprendre le rôle respectif des différents sous-types des récepteurs de la galanine dans la régulation du système à POMC.

II. Interrelations TGF β /POMC

a) Arguments en faveur d'une action directe du TGF β_1 sur le système à POMC

Dans notre travail de thèse, nous nous sommes également intéressés aux communications qui pouvaient exister entre les cellules gliales et les neurones à POMC. En effet, certaines équipes ont montré l'existence d'une communication entre les cellules gliales et les neurones dans l'hypothalamus (pour revue, voir Ojeda *et al.*, 2000). Alors qu'au départ le TGF α semblait le facteur de croissance le plus impliqué dans cette interrelation, depuis peu de temps l'équipe de Melcangi a suggéré qu'un autre facteur de nature astrocytaire, caractérisé comme étant le TGF β , pouvait également moduler l'activité des neurones à GnRH (Melcangi *et al.*, 1995 ; Galbiati *et al.*, 1996).

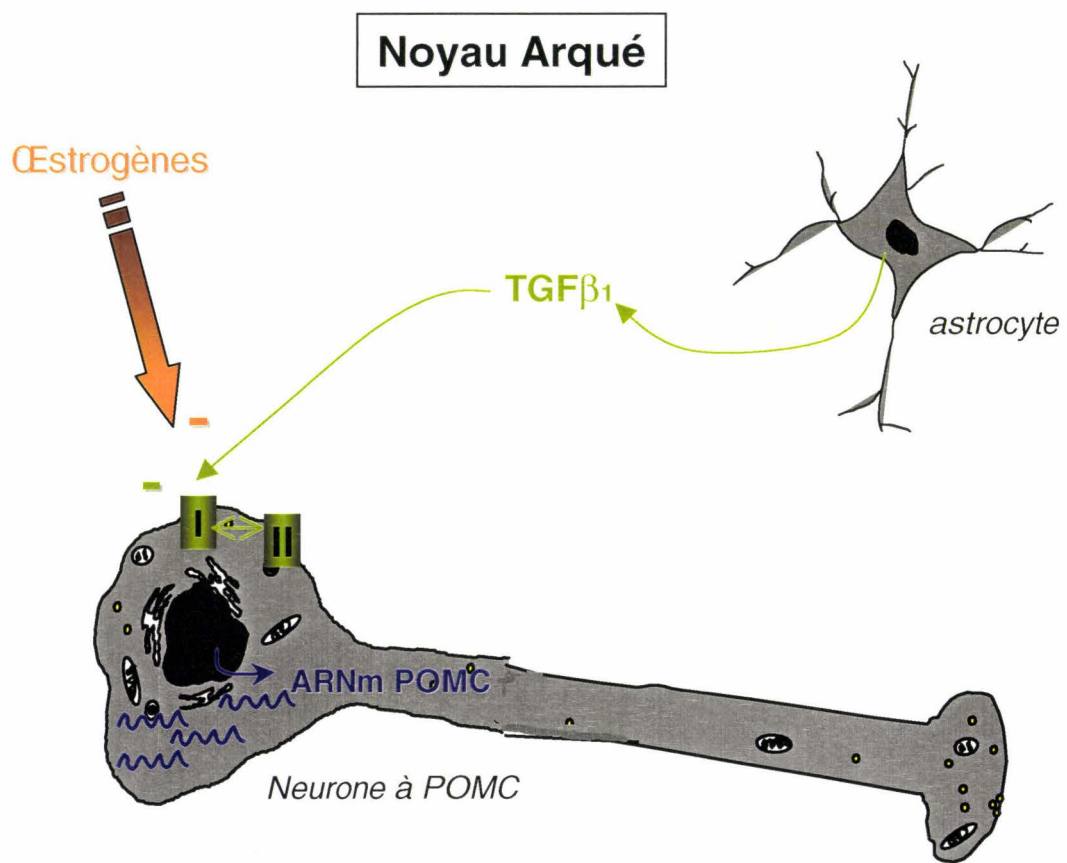


Figure 13. Action du TGFβ₁ sur les neurones à POMC.

Le TGFβ₁ induit une diminution de l'expression de l'ARNm codant la POMC (-, vert). Ces effets semblent en partie directs puisque les neurones à POMC expriment les l'ARNm codant les récepteurs au TGFβ de type I et de type II. A noter l'effet inhibiteur des œstrogènes (-, orange) sur l'expression de l'ARNm codant ces récepteurs.

Récemment, notre étude montrant que l'ARNm codant le récepteur de type I au TGF β est exprimé par les aires hypothalamiques associées à la reproduction, dont le noyau arqué (Prevot *et al.*, 2000b), confirme l'implication possible du TGF β comme neuromodulateur au niveau de l'hypothalamus.

En fait, pour que le TGF β puisse agir sur sa cellule-cible, il est nécessaire qu'il se lie d'abord sur un récepteur de type II qui active alors un récepteur de type I. Les récepteurs forment ainsi un complexe hétérodimérique responsable de la transduction du signal constituée en grande partie par l'activation de la voie des Smad (Figure 12). Notre travail de thèse nous a permis d'observer que de nombreuses cellules du noyau arqué coexprimaient les récepteurs de type I et de type II au TGF β et ceci à tous les niveaux antéro-postérieurs du noyau arqué. Ces données suggèrent qu'effectivement le TGF β peut moduler directement l'activité de nombreux types cellulaires localisés dans le noyau arqué. Nous avons ainsi déterminé que les neurones à POMC étaient l'une des cibles du TGF β puisqu'ils expriment le récepteur de type I et de type II au TGF β (Figure 13).

Il est important de mentionner que la ribosonde utilisée afin de caractériser l'expression du récepteur de type I au TGF β code pour le récepteur B1. Ce récepteur a la capacité de former des complexes hétérodimériques avec un récepteur de type II au TGF β mais également avec un récepteur de type II à l'activine (Takumi *et al.*, 1995). Ces observations nous permettent donc d'envisager qu'en plus du TGF β , l'activine pourrait également moduler l'activité des neurones à POMC via le récepteur B1. Cette hypothèse est d'autant plus concevable que le récepteur de type II à l'activine est exprimé dans l'hypothalamus médiobasal (Trudeau *et al.*, 1996 ; Funaba *et al.*, 1997). Des travaux complémentaires seront donc nécessaires afin de déterminer l'implication de l'activine dans la régulation du système à POMC.

b) Action du TGFβ₁ sur le système à POMC

Suite à nos travaux rapportant l'expression des récepteurs au TGFβ par les neurones à POMC et ainsi une possible action directe du TGFβ sur ce système, nous avons déterminé la nature de l'action exercée par le TGFβ₁ sur l'activité des neurones à POMC. Le TGFβ₁ induit une diminution des taux d'ARNm codant la POMC (Figure 13) et cet effet est plus prononcé dans la subdivision antérieure du noyau arqué. Ces résultats sont à rapprocher de nos observations montrant également une expression prédominante des récepteurs au TGFβ par les neurones à POMC du noyau arqué antérieur. Les neurones à POMC localisés dans le noyau arqué antérieur semblent donc une cible privilégiée du TGFβ₁.

Si notre étude s'est intéressée au rôle du TGFβ₁, d'autres isoformes du TGFβ peuvent être impliquées. Actuellement, cinq isoformes du TGFβ ont été isolées et seuls les TGFβ₁ et TGFβ₂ sont les plus répandus chez les mammifères (Derynck et Feng, 1997 ; Massagué, 1990). Ainsi, le TGFβ₂ pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'activité des neurones à POMC. Cependant, le TGFβ₂ peut être sécrété par des astrocytes, mais aussi par des neurones (Vivien *et al.*, 1998) et ne reflète donc pas, contrairement au TGFβ₁, exclusivement une interrelation entre les cellules gliales et les neurones.

Comme nous l'avons précédemment suggéré, nous ne pouvons exclure un effet de l'activine sur le système à POMC du noyau arqué. Cette probabilité est d'autant plus concevable que des études, réalisées à partir de cultures hypophysaires, ont rapporté un effet inhibiteur de l'activine sur l'expression de l'ARNm POMC (Bilezikjian *et al.*, 1991).

c) Implication de l'interrelation TGFβ/POMC dans la régulation du système à GnRH

Notre étude de régionalisation nous révèle que les neurones à POMC localisés dans la partie antérieure du noyau arqué sont les cibles privilégiées du $TGF\beta_1$. En effet, à la fois l'inhibition induite par le $TGF\beta_1$ et l'expression des récepteurs au $TGF\beta$ concernent préférentiellement les neurones à POMC antérieurs. Or, comme nous l'avons vu précédemment, ce sont ces neurones à POMC qui se projettent de façon préférentielle vers l'aire préoptique, aire de localisation des neurones à GnRH. Ces données suggèrent que le $TGF\beta_1$ pourrait moduler, via les neurones à POMC, l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'aire préoptique (Figure 11). De ce fait, nos résultats rapportant un effet inhibiteur du $TGF\beta_1$ sur l'activité neuronale à POMC sont à rapprocher de nos travaux préliminaires montrant que le $TGF\beta_1$ stimule la libération de GnRH à partir de d'explants hypothalamiques incluant l'aire préoptique et le noyau arqué (Bouret *et al.*, 2000). Ainsi, le $TGF\beta_1$ pourrait provoquer en partie son effet stimulateur sur la sécrétion de GnRH via une levée de l'inhibition exercée par la β -endorphine sur le système à GnRH.

D'autres arguments nous permettent d'impliquer cette interrelation $TGF\beta$ /POMC dans la régulation du système à GnRH : l'expression du récepteur B1 dans les neurones à POMC est stéroïdo-dépendante. En effet, le nombre des neurones à POMC exprimant le récepteur B1 varie en fonction de l'état stéroïdien chez la femelle avec un effet inhibiteur des œstrogènes (Figure 13). Cet effet est également principalement observé dans les neurones à POMC localisés dans la partie antérieure du noyau arqué.

L'implication des astrocytes synthétisant le $TGF\beta$ dans la médiation du rétrocontrôle stéroïdien s'exerçant sur les neurones à POMC semble également concevable (Figure 11). En effet, les astrocytes hypothalamiques expriment les récepteurs aux œstrogènes (Langub *et al.*, 1992 ; Cardona-Gomez *et al.*, 2000 ; Buchanan *et al.*, 2000) et principalement l'ER- β . De plus, de récents travaux de Buchanan et al (2000) montrent que le 17- β œstradiol provoque une augmentation de la libération de $TGF\beta_1$ à partir d'astrocytes hypothalamiques en culture.

De même, une étude préliminaire réalisée par Melcangi *et al.* (2000) rapporte que les niveaux d'expression de l'ARNm codant le TGF β varient dans l'hypothalamus en fonction du cycle œstrien et de l'état stéroïdien de l'animal avec un pic d'expression observé le jour le proestrus en corrélation avec la montée des taux plasmatiques d'œstradiol. Ainsi, l'hypothèse d'une implication des cellules synthétisant le TGF β_1 dans le rétrocontrôle stéroïdien s'exerçant sur les neurones à POMC est très probable (Figure 11).

L'ensemble de nos résultats, associés aux études rapportant l'expression du TGF β_1 par les astrocytes (Melcangi et al., 1995 ; Galbiati et al., 1996 ; Buchanan et al., 2000), nous permet donc d'envisager un mode de régulation des neurones à POMC par les cellules gliales. Ainsi, en plus d'un rôle dans la plasticité synaptique via des recouvrements astrocytaires (Garcia-Segura et al., 1986), les cellules gliales du noyau arqué semblent jouer un rôle-clef dans les régulations neuronales via la sécrétion de facteurs tels que le TGF β_1 . De plus, de nombreux arguments nous permettent d'impliquer cette interrelation TGF β /POMC dans la régulation du système à GnRH.

III. Les neurones produisant le NO intermédiaires de l'action de la β -endorphine sur les neurones à GnRH ?

Nos travaux permettent d'impliquer les neurones à POMC cibles de la galanine et du TGF β dans la régulation du système à GnRH, notamment de part leur projection probable vers l'aire préoptique. A ce niveau, de nombreux travaux ont mis en évidence une action inhibitrice majeure de la β -endorphine sur l'activité des neurones à GnRH (pour revue, voir

Kalra, 1993). Cependant, les modes d'action de la β -endorphine sur le neurone à GnRH ne sont pas encore clairement définis. En effet, alors que de nombreuses cellules environnant les corps cellulaires des neurones à GnRH expriment le récepteur aux opioïdes μ et sont donc potentiellement cible directe de la β -endorphine, la présence des messagers codant ce récepteur dans les neurones à GnRH n'a pas été détectée (Mitchell *et al.*, 1997a ; Sannella et Petersen, 1997). Ces dernières observations semblent ainsi exclure l'hypothèse d'une action directe de la β -endorphine sur la sécrétion de GnRH. Ainsi, un certain nombre de travaux ont été entrepris afin de déterminer le phénotype possible des cellules-relais. Bhat *et al.* (1998) évoquent que les acides aminés excitateurs, dont le glutamate, pourraient relayer l'action de la β -endorphine sur le système à GnRH au niveau de l'aire préoptique. En effet, la naloxone induit une libération de glutamate au niveau de l'aire préoptique et le MK-801 (antagoniste du récepteur NMDA) abolit l'augmentation de la libération de LH consécutive à l'injection intracérébroventriculaire de naloxone (Bhat *et al.*, 1998). Par ailleurs, des études réalisées au laboratoire ont suggéré que les neurones à galanine de l'aire préoptique sont également l'un des intermédiaires possibles puisque certains d'entre eux expriment l'ARNm codant le récepteur μ (Mitchell *et al.*, 1997a).

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés au NO en tant que médiateur potentiel de l'effet de la β -endorphine sur les neurones à GnRH. L'une des raisons pour laquelle nous avons travaillé sur ce facteur est que ce messenger gazeux peut influencer une cellule cible située à près de 200 μ m de son lieu de diffusion sans nécessité de récepteurs (Wood et Garthwaite, 1994). De plus, une forte étroite association morphologique a été observée entre les neurones synthétisant la nNOS et les péricaryons à GnRH (Herbison *et al.*, 1996) et ce gaz est considéré comme un puissant activateur de l'activité GnRH (voir Prevot *et al.*, 2000a). Par conséquent, le NO pourrait synchroniser les neurones à GnRH dispersés dans l'aire préoptique. Nos résultats montrent qu'une sous-population de neurones synthétisant la

nNOS expriment l'ARNm codant le récepteur μ . Plus précisément, ce récepteur est principalement exprimé par les neurones nNOS localisés dans les aires préoptiques rostrale et médiane, aires au niveau desquelles les interactions morphologiques entre la nNOS et la GnRH ont été rapportées comme étant les plus importantes (Herbison *et al.*, 1996). A noter que c'est également dans ces régions de l'aire préoptique que l'expression de *c-fos* est activée dans les neurones à GnRH au moment du pic de LH (Lee *et al.*, 1990). Ainsi nos résultats permettent d'envisager que les neurones synthétisant le monoxyde d'azote de l'aire préoptique sont des médiateurs de l'action de la β -endorphine sur le système à GnRH (Figure 12). L'idée d'une action de la β -endorphine sur la sécrétion de monoxyde d'azote dans l'aire préoptique est renforcée par les études montrant que l'administration de naloxone stimule la production de monoxyde d'azote dans l'aire préoptique (Pu *et al.*, 1997 ; Bhat *et al.*, 1998 ; Falletti *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données suggère que la β -endorphine freine la sécrétion de monoxyde d'azote et provoque de cette façon indirecte son effet inhibiteur sur la sécrétion GnRH (Figure 14).

Les neurones produisant le NO au niveau de l'aire préoptique semblent ainsi l'un des intermédiaires privilégiés de l'effet de la β -endorphine sur le système à GnRH.

CONCLUSION
et
PERSPECTIVES

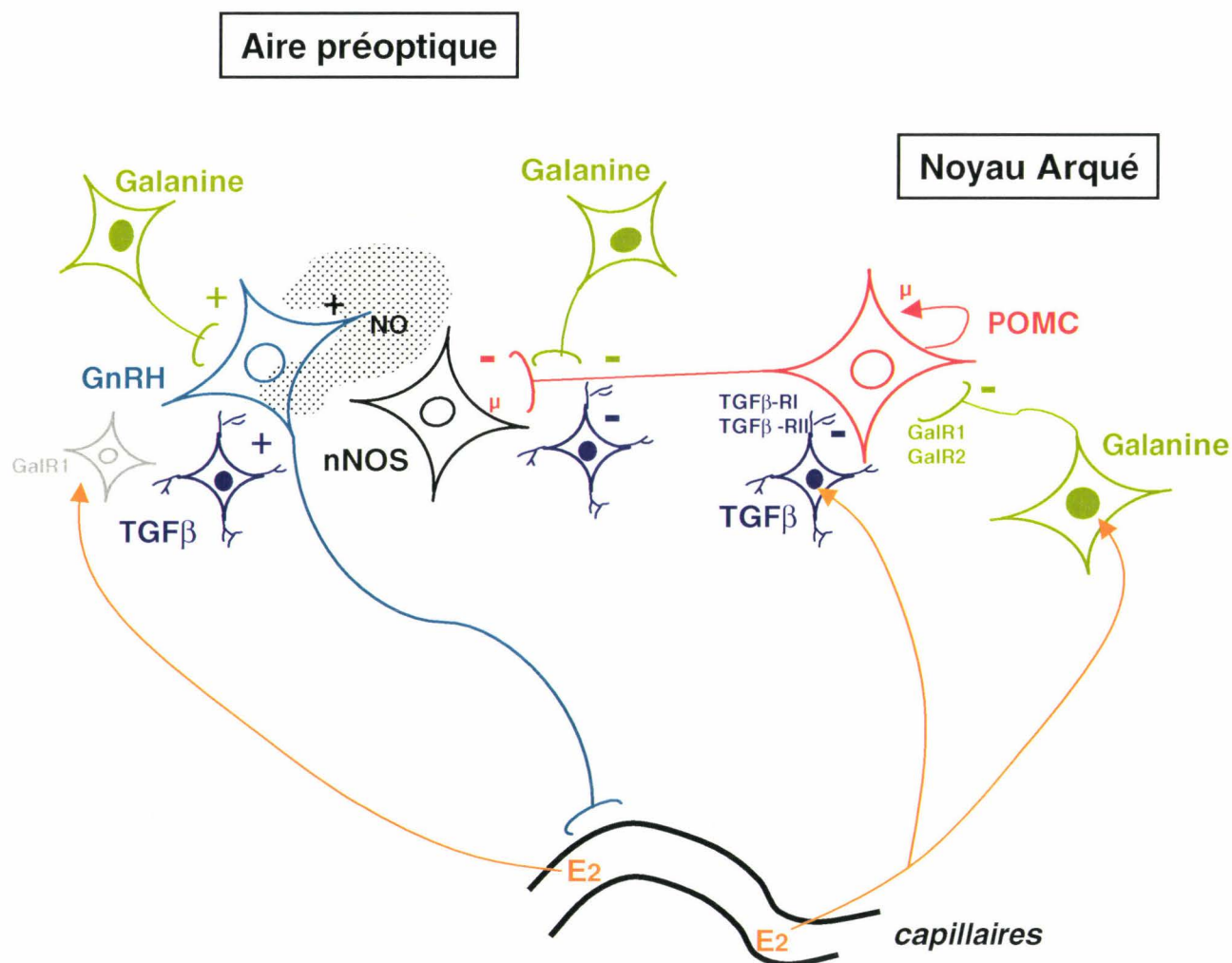


Figure 14. Représentation schématique des relations morpho-fonctionnelles entre le noyau arqué et l'aire préoptique impliquant la POMC, la galanine, le TGFβ et le NO dans la régulation du système à GnRH.

Les sigles ' + ' et ' - ' se rapportent, respectivement, à des effets stimulateurs ou inhibiteurs.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'établir que les neurones à POMC du noyau arqué étaient régulés par la galanine et le TGF β . Concernant l'action de la galanine, celle-ci a été bien établie au niveau de l'aire préoptique. En particulier, l'étude de son expression dans les neurones à GnRH est bien documentée ainsi que la variation de cette coexpression sous l'effet des stéroïdes gonadiques (pour revue, voir Hohmann *et al.*, 1998). De même, des travaux au sein du laboratoire ont récemment établi que l'expression d'un des sous-types des récepteurs de la galanine, le GalR1, variait en fonction du cycle œstrien dans l'aire préoptique (Faure-Virelizier *et al.*, 1998). De plus, ce récepteur est exprimé par certains neurones à GnRH (Mitchell *et al.*, 1999b). Au niveau du noyau arqué, alors que beaucoup de travaux s'étaient intéressés à la galanine par rapport à la GHRH, aucun ne s'était consacré à la relation galanine-POMC notamment en relation avec la régulation du système à GnRH. Nos travaux de thèse ont permis d'impliquer la galanine dans la régulation des neurones à POMC du noyau arqué. En effet, nous avons observé que les neurones à POMC présentaient la potentialité d'exprimer les récepteurs de la galanine GalR1 et GalR2 et que la galanine exerçait un effet inhibiteur sur l'activité des neurones à POMC (Figure 14). Nous avons également établi que cette interrelation galanine/POMC était stéroïdo-dépendante et concernait principalement les neurones à POMC localisés dans la partie antérieure du noyau arqué ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse que les neurones à POMC cibles de la galanine sont impliqués dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH (Figure 14). Ainsi, la galanine pourrait exercer ses effets stimulateurs sur la sécrétion de GnRH en levant l'inhibition exercée par le système à POMC sur les neurones à GnRH (Figure 14). De plus, il est vraisemblable que les neurones galaninergiques du noyau arqué participent au rétrocontrôle exercé par les œstrogènes sur les neurones à POMC (Figure 14).

Nous avons également déterminé l'implication du $\text{TGF}\beta_1$ dans la régulation des neurones à POMC. Là encore, jusqu'alors, peu d'études avaient impliqué ce facteur vraisemblablement astrocytaire au niveau du noyau arqué. Seule une étude récente avait rapporté l'expression d'un des récepteurs au $\text{TGF}\beta$ (le récepteur B1) dans l'hypothalamus médiobasal (Prevot *et al.*, 2000b). Nos travaux ont montré que le $\text{TGF}\beta_1$ inhibait directement l'activité des neurones à POMC via les récepteurs de type I et de type II (Figure 14). Dès lors, l'implication de cette communication entre les cellules gliales et les neurones dans la régulation du système à GnRH est envisageable puisque cette interrelation $\text{TGF}\beta$ /POMC est œstrogéno-dépendante et concerne préférentiellement les neurones à POMC localisés dans le noyau arqué antérieur. A noter que l'action des œstrogènes sur l'expression des récepteurs au $\text{TGF}\beta$ dans les neurones à POMC semble indirecte, comme le suggèrent des travaux préliminaires dans lesquels il n'a pas été possible d'observer des neurones à POMC exprimant à la fois les récepteurs au $\text{TGF}\beta$ et les récepteurs aux œstrogènes α (Bouret *et al.*, communication personnelle). Des cellules relais seraient donc nécessaires pour transmettre l'effet des œstrogènes sur l'expression des récepteurs au $\text{TGF}\beta$ dans les neurones à POMC. Étant donné que les neurones galaninergiques sont des cibles privilégiées des œstrogènes dans le noyau arqué, ces neurones pourraient être d'excellents candidats afin de transmettre l'effet des œstrogènes sur cette interrelation $\text{TGF}\beta$ /POMC.

Au vu de nos résultats, il semble que la galanine et le $\text{TGF}\beta_1$ pourraient moduler l'activité des neurones à GnRH via les neurones à POMC. L'action de la β -endorphine sur le système à GnRH apparaît cependant indirecte mais, l'expression préférentielle du récepteur aux opioïdes μ dans les neurones synthétisant le monoxyde d'azote de l'aire préoptique rostrale confirme, comme il a été suggéré par de précédents auteurs, que les neurones

synthétisant le monoxyde d'azote seraient des médiateurs de l'action de la β -endorphine sur l'activité des neurones à GnRH (Figure 14).

Ces travaux permettent d'avancer dans la compréhension de la régulation du fonctionnement du système à GnRH par le noyau arqué et la POMC. De plus, nos études de caractérisations neuroanatomiques apportent de nouveaux éléments quant à l'existence de sous-populations de neurones à POMC qui pourront être impliquées dans diverses fonctions physiologiques. Les interrelations étudiées pourraient, en plus de la régulation de la fonction gonadotrope, concerner la régulation de la prise alimentaire, la croissance, et le stress.

Etant donné nos observations, les perspectives qu'ouvrent nos travaux sont multiples. Il apparaît notamment intéressant de déterminer avec précision le rôle respectif des différents sous-types des récepteurs de la galanine dans la physiologie de régulation des neurones à POMC. Cette problématique pourra être abordée soit par une approche "antisens", soit en utilisant des agonistes et antagonistes sélectifs pour les différents récepteurs de la galanine. Notamment, parmi les agonistes sélectifs connus, le nouveau peptide GALP (ayant la particularité de se fixer à haute affinité sur le récepteur GalR2) pourrait permettre de répondre en partie à nos interrogations. L'utilisation de modèles transgéniques peuvent être également envisagés.

Dans ce travail, nous sommes partis sur le principe, compte-tenu de la littérature, que les neurones à POMC antérieurs sensibles à la galanine et au TGF β se projetaient vers l'aire préoptique. Cependant, il serait intéressant de le prouver en couplant nos approches à des techniques neuroanatomiques de transport rétrograde.

Enfin, la mise en évidence de récepteurs à la galanine et au TGF β dans de nombreuses cellules non-POMC du noyau arqué, nous suggère un rôle de ces facteurs sur de nombreux autres types cellulaires du noyau arqué. Concernant la régulation du système à GnRH, il serait intéressant de voir si les neurones à NPY du noyau arqué, qui jouent un rôle majeur sur la

régulation de l'activité des neurones à GnRH, sont également cibles du TGF β ou de la galanine. Cette hypothèse semble concevable car des résultats préliminaires nous montrent que les neurones à NPY expriment les récepteurs de la galanine (Bouret *et al.*, communication personnelle).

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- A -

Abbud R, Smith MS (1991) Differences in the luteinizing hormone and prolactin responses to multiple injections of kainate, as compared to N-methyl-D,L-aspartate, in cycling rats. *Endocrinology* 129:3254-3258

Adan RA, Gispen WH (1997) Brain melanocortin receptors: from cloning to function. *Peptides* 18:1279-1287

Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS (1997) Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99:391-395

Akema T, Tadokoro Y, Kimura F (1984) Regional specificity in the effect of estrogen implantation within the forebrain on the frequency of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 39:517-523

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

Alexander MJ, Mahoney PD, Ferris CF, Carraway RE, Leeman SE (1989) Evidence that neurotensin participates in the central regulation of the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 124:783-788

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 (1999) Colocalization of neurotensin messenger ribonucleic acid (mRNA) and progesterone receptor mRNA in rat arcuate neurons under estrogen-stimulated conditions. *Endocrinology* 140:4995-5003

Allen LG, Kalra SP (1986) Evidence that a decrease in opioid tone may evoke preovulatory luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 118:2375-2381

Arbogast LA, Voogt JL (1993) Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 58:501-510

Arias P, Jarry H, Leonhardt S, Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A 1990 Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol-induced LH surge in ovariectomized rats. *Endocrinology* 126:1771-1773

Arita J, Kimura F (1987) Direct inhibitory effect of long term estradiol treatment on dopamine synthesis in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: in vitro studies using hypothalamic slices. *Endocrinology* 121:692-698

Arnold AP, Gorski RA (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7:413-442

Autelitano DJ, van den Buuse M (1997) Concomitant up-regulation of proopiomelanocortin and dopamine D2-receptor gene expression in the pituitary intermediate lobe of the spontaneously hypertensive rat. *J Neuroendocrinol* 9:255-262

- B -

Bach FW, Yaksh TL (1995) Release of beta-endorphin immunoreactivity from brain by activation of a hypothalamic N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuroscience* 65:775-783

Badger TM, Millard WJ, Martin JB, Roseblum PM, Levenson SE (1982) Hypothalamic-pituitary function in adult rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Endocrinology* 111 :2031-2038

Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19:RC26

Bakke JL, Lawrence N, Bennette J, Robinson S, Bowers CY (1978) Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology* :220-228

Barracrough CA, Sawyer CH (1955) Inhibition of the release of pituitary ovulatory hormone in the rat by morphine. *Endocrinology* 57 :329-337

Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW (1999) Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31:345-350

Bassing CH, Howe DJ, Segarini PR, Donahoe PK, Wang XF (1994) A single heteromeric receptor complex is sufficient to mediate biological effects of transforming growth factor-beta ligands. *J Biol Chem* 269:14861-14864

Bauer-Dantoin AC, Urban JH, Levine JE (1992) Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 131:2953-2958

Bennett PA, Lindell K, Karlsson C, Robinson IC, Carlsson LM, Carlsson B (1998) Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology* 67:29-36

Bergland RM, Page RB (1978) Can the pituitary secrete directly to the brain? (Affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 102:1325-1338

Berglund LA, Simpkins JW (1988) Alterations in brain opiate receptor mechanisms on proestrous afternoon. *Neuroendocrinology* 48:394-400

Besecke LM, Levine JE (1994) Acute increase in responsiveness of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone nerve terminals to neuropeptide-Y stimulation before the preovulatory LH surge. *Endocrinology* 135:63-66

Besedovsky HO, del Rey A (1992) Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines *Front Neuroendocrinol* 13 :61-94

Bethea CL, Hess DL, Widmann AA, Henningfeld JM (1995) Effects of progesterone on prolactin, hypothalamic beta-endorphin, hypothalamic substance P, and midbrain serotonin in guinea pigs. *Neuroendocrinology* 61:695-703

Bethea CL, Widmann AA (1996) Immunohistochemical detection of progestin receptors in hypothalamic beta-endorphin and substance P neurons of steroid-treated monkeys. *Neuroendocrinology* 63:132-141

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

Bhat GK, Mahesh VB, Ping L, Chorich L, Wiedmeier VT, Brann DW (1998) Opioid-glutamate-nitric oxide connection in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 139:955-960

Bicknell RJ (1985) Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *J Endocrinol* 107:437-446

Bilezikjian LM, Blount AL, Campen CA, Gonzalez-Manchon C, Vale W (1991) Activin-A inhibits proopiomelanocortin messenger RNA accumulation and adrenocorticotropin secretion of AtT20 cells. *Mol Endocrinol* 5:1389-1395

Blake CA, Scaramuzzi RJ, Norman RL, Hilliard J, Sawyer CH (1973a) Effects of hypothalamic deafferentation on circulating levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in the male rat. *Endocrinology* 92:1419-1425

Blake CA, Scaramuzzi RJ, Hilliard J, Sawyer CH (1973b) Circulating levels of pituitary gonadotrophins and ovarian steroids in rats after hypothalamic deafferentation. *Neuroendocrinology* 12:86-97

Blake CA (1977) A medial basal hypothalamic site of synergistic action of estrogen and progesterone on the inhibition of pituitary luteinizing hormone release. *Endocrinology* 101:1130-1134

Blasquez C, Jegou S, Tranchand Bunel D, Delbende C, Braquet P, Vaudry H (1991) Central-type benzodiazepines inhibit release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from the rat hypothalamus. *Neuroscience* 42:509-516

Blasquez C, Jegou S, Tranchand Bunel D, Fournier A, Vaudry H (1992) Neuropeptide Y inhibits alpha-MSH release from rat hypothalamic slices through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Brain Res* 596:163-168

Blasquez C, Jegou S, Feuilloley M, Rosier A, Vandesande F, Vaudry H (1994) Visualization of gamma-aminobutyric acid A receptors on proopiomelanocortin-producing neurons in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 135:2759-2764

Blasquez C, Jegou S, Friard O, Tonon MC, Fournier A, Vaudry H (1995) Effect of centrally administered neuropeptide Y on hypothalamic and hypophyseal proopiomelanocortin-derived peptides in the rat. *Neuroscience* 68:221-227

Bloch GJ, Kurth SM, Akesson TR, Micevych PE (1992) Estrogen-concentrating cells within cell groups of the medial preoptic area: sex differences and co-localization with galanin-immunoreactive cells. *Brain Res* 595:301-308

Bloom F, Battenberg E, Rossier J, Ling N, Guillemin R (1978) Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies. *PNAS* 75:1591-1595

Bloomquist BT, Beauchamp MR, Zhelnin L, Brown SE, Gore-Willse AR, Gregor P, Cornfield LJ (1998) Cloning and expression of the human galanin receptor GalR2. *Biochem Biophys Res Commun* 243:474-479

Bogdanove EM, Parlaw AE, Bogdanove JN, Bhargava I, Crabill EV (1964) Specific LH and FSH bioassays in rats with hypothalamic lesions and accessory sex gland hypertrophy. *Endocrinology* 74:114-122

Bohler HC Jr, Tracer H, Merriam GR, Petersen SL (1991) Changes in proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in the rostral periarculate region of the female rat during the estrous cycle. *Endocrinology* 128:1265-1269

Bonavera JJ, Kalra SP, Kalra PS (1993a) Evidence that luteinizing hormone suppression in response to inhibitory neuropeptides, beta-endorphin, interleukin-1 beta, and neuropeptide-K, may involve excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:178-182

Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1993b) Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology* 133:2481-2487

Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1994) Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges. *Brain Res* 660:175-179

Bonavera JJ, Kalra PS, Kalra SP (1996) L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the luteinizing hormone surge induced by estrogen: involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology* 137:1956-1962

Bouret S, Prevot V, Croix D, Beauvillain JC, Mitchell V (2000) Modulation de l'activité des neurones à GnRH par le TGF β 1 chez le rat mâle. 4^{ème} journée du réseau LARC-Neuroscience, Lille, Octobre 2000.

Bourguignon JP, Gerard A, Debougnoux G, Rose J, Franchimont P (1987) Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the rat hypothalamus in vitro: calcium and glucose dependency and inhibition by superactive GnRH analogs. *Endocrinology* 121:993-999

Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P (1989a) Direct activation of gonadotropin-releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 49:402-408

Bourguignon JP, Gerard A, Mathieu J, Simons J, Franchimont P (1989b) Pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone from hypothalamic explants is restrained by blockade of N-methyl-D,L-aspartate receptors. *Endocrinology* 125:1090-1096

Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR (1976a) Lipotropin : Precursor to two biologically active peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 69 :950-956

Bradbury AF, Smyth DG, Snell CR, Bridesall NJH, Hulme EX (1976b) C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 260 :793-795

Brady LS, Lynn AB, Herkenham M, Gottesfeld Z (1994) Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain. *J Neurosci* 14:4951-4964

Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21:109-117

Brann DW, Mahesh VB (1991) Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid-induced surge of gonadotropins in the female rat. *Endocrinology* 128:1541-1547

Brann DW (1995) Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61:213-225

Brann DW, Mahesh VB (1997) Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* 18:678-700

Brawer JR (1971) The role of the arcuate nucleus in the brain-pituitary-gonad axis. *J Comp Neurol* 143 :411-445

Bray GA (1997) Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 12:26-32

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770

Broberger C, Landry M, Wong H, Walsh JN, Hokfelt T (1997) Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 66:393-408

Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *PNAS* 95:15043-15048

Bronstein DM, Przewlocki R, Akil H (1990) Effects of morphine treatment on pro-opiomelanocortin systems in rat brain. *Brain Res* 519:102-111

Bronstein DM, Schafer MK, Watson SJ, Akil H (1992) Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res* 587:269-275

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

Buchanan CD, Malesh VB, Brann DW (2000) Estrogen-astrocyte-luteinizing hormone-releasing hormone signaling: a role for transforming growth factor- β_1 . *Biol Reprod* 62:1710-1721

Burgevin MC, Loquet I, Quarteronet D, Habert-Ortoli E (1995) Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *J Mol Neurosci* 6:33-41

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

Calogero AE, Burrello N, Ossino AM, Polosa P, D'Agata R (1998) Activin-A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgens. *J Endocrinol* 156:269-274

Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW (1994) Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 134:799-808

Canteros G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM (1996) Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *PNAS* 93:4246-4250

Caraty A, Locatelli A, Martin GB (1989) Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with α -estradiol. *J Endocrinol*, 123(3):375-382

Caraty A, Fabre-Nys C, Delaleu B, Locatelli A, Bruneau G, Karsch FJ, Herbison A (1998) Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139:1752-1760

Carbone S, Szwarcfarb B, Otero Losada ME, Moguilevsky JA (1992) Effects of ovarian steroids on the gonadotropin response to N-methyl-D-aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. *Endocrinology* 130:1365-1370

Card JP, Brecha N, Moore RY (1983) Immunohistochemical localization of avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 217:123-136

Cardona-Gomez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM (2000) Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience* 99:751-760

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

Carraway R, Leeman SE (1975) The amino acid sequence of a hypothalamic peptide, neurotensin. *J Biol Chem* 250:1907-1911

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

Chan-Palay V, Zaborszky L, Kohler C, Goldstein M, Palay SL (1984) Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J Comp Neurol* 227:467-496

Chen YY, Pelletier G (1983) Demonstration of contacts between proopiomelanocortin neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 43:271-276

Chen WP, Witkin JW, Silverman AJ (1990) Sexual dimorphism in the synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrinology* 126:695-702

Cheung S, Hammer RP Jr (1995a) Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in arcuate neurons that innervate the medial preoptic area of the rat. *Neuroendocrinology* 62:283-292

Cheung S, Salinas J, Hammer RP Jr (1995b) Gonadal steroid hormone-dependence of beta-endorphin-like immunoreactivity in the medial preoptic area of the rat. *Brain Res* 675:83-88

Cheung S, Hammer RP Jr (1997a) Gonadal steroid hormone regulation of proopiomelanocortin gene expression in neurons that innervate the median eminence of the rat. *Neurosci Lett* 224:181-184

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997b) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492

Chongthammakun S, Terasawa E (1993) Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology* 132:735-743

Chowen JA, Argente J, Vician L, Clifton DK, Steiner RA (1990) Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52:581-588

Chowen JA, Busiguina S, Garcia-Segura LM (1995) Sexual dimorphism and sex steroid modulation of glial fibrillary acidic protein messenger RNA and immunoreactivity levels in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 69:519-532

Chowen-Breed J, Fraser HM, Vician L, Damassa DA, Clifton DK, Steiner RA (1989a) Testosterone regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus of the male rat. *Endocrinology* 124:1697-1702

Chowen-Breed JA, Clifton DK, Steiner RA (1989b) Regional specificity of testosterone regulation of proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the male rat brain. *Endocrinology* 124:2875-2881

Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL (1985) The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15:1159-1181

Clemens JA, Roush ME, Fuller RW, Shaar CJ (1978) Changes in luteinizing hormone and prolactin control mechanisms produced by glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 103:1304-1312

Corp ES, Conze DB, Smith F, Campfield LA (1998) Regional localization of specific [125I]leptin binding sites in rat forebrain. *Brain Res* 789:40-47

Crowley WR, Kalra SP (1987) Neuropeptide Y stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamus in vitro: modulation by ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 46 :97-103

Cuellar B, Fernandez AP, Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, Bentura ML, Rodrigo J, Leza JC (2000) Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacology* 148:66-73

- D -

Daikoku S, Hisano S, Kawano H, Chikamori-Aoyama M, Kagotani Y, Zhang RJ, Chihara K (1988) Ultrastructural evidence for neuronal regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 47:405-415

Danguy A, Ectors F, Pasteels JL (1977) Effects of anterior hypothalamic implantation of gonadal steroids on serum and pituitary gonadotrophins (follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone) in the castrated male rat. *J Endocrinol* 73:105-114

Davis AM, Penschuck S, Fritschy JM, McCarthy MM (2000) Developmental switch in the expression of GABA(A) receptor subunits alpha(1) and alpha(2) in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Dev Brain Res* 119:127-138

Dawson TM, Snyder SH (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-5159

De Matteis R, Cinti S (1998) Ultrastructural immunolocalization of leptin receptor in mouse brain. *Neuroendocrinology* 68:412-419

Decavel C, Van den Pol AN (1990) GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302:1019-1037

Delbende C, Jegou S, Tranchand-Bunel D, Blasquez C, Vaudry H (1989) gamma-Aminobutyric acid inhibits the release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from rat hypothalamic slices. *Brain Res* 497:86-93

Deleamarre-van de Waal HA, Burton KA, Kabigting EB, Steiner RA, Clifton DK (1994) Expression and sexual dimorphism of galanin messenger ribonucleic acid in growth hormone-releasing hormone neurons of the rat during development. *Endocrinology* 134:665-671

Demarest KT, Riegle GD, Moore KE (1984) Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin. *Neuroendocrinology* 39:193-200

DePaolo LV, Negro-Vilar A (1982) Neonatal monosodium glutamate treatment alters the response of median eminence luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals to potassium and prostaglandin E2. *Endocrinology* 110:835-841

DePaolo LV, King RA, Carrillo AJ (1987) In vivo and in vitro examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 120:272-279

Derynck R, Feng XH (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 24:F105-150

Diano S, Naftolin F, Horvath TL (1997) Gonadal steroids target AMPA glutamate receptor-containing neurons in the rat hypothalamus, septum and amygdala: a morphological and biochemical study. *Endocrinology* 138:778-789

Diano S, Kalra SP, Sakamoto H, Horvath TL (1998) Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res* 812:256-259

Donoso AO, Lopez FJ, Negro-Vilar (1990) Glutamate receptors of the non-N-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone-releasing hormone release by excitatory amino acids in vitro. *Endocrinology* 126:414-420

Dubois A, Savasta M, Curet O, Scatton B (1986) Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 19:125-137

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* 1998 32:97-101

- E -

El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM (2000) Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *PNAS* 97:6179-6184

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-786

Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK (2000) Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423:261-281

Emoto N, Gonzalez AM, Walicke PA, Wada E, Simmons DM, Shimasaki S, Baird A (1989) Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. *Growth Factors* 2:21-29

Ericsson A, Liu C, Hart RP, Sawchenko PE (1995) Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* 361:681-698

Evans NP, Dahl GE, Padmanabhan V, Thrun LA, Karsch FJ (1997) Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138:5408-5414

Everitt BJ, Hokfelt T, Wu JY, Goldstein M (1984) Coexistence of tyrosine hydroxylase-like and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 39:189-191

- F -

Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, Seilicovich A, Gimeno M, McCann SM, Rettori V (1999) beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *PNAS* 96:1722-1726

Fallon JH, Leslie FM (1986) Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol* 249:293-336

Fang Y, Kelly MJ, Ronnekleiv OK (1998) Proopiomelanocortin (POMC) mRNA expression: distribution and region-specific down-regulation by chronic morphine in female guinea pig hypothalamus. *Mol Brain Res* 55:1-8

Fathi Z, Cunningham AM, Iben LG, Battaglino PB, Ward SA, Nichol KA, Pine KA, Wang J, Goldstein ME, Iismaa TP, Zimanyi IA (1997) Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Mol Brain Res* 51:49-59

Faure-Virelizier C, Croix D, Bouret S, Prevot V, Reig S, Beauvillain JC, Mitchell V (1998) Effects of estrous cyclicity on the expression of the galanin receptor Gal-R1 in the rat preoptic area: a comparison with the male. *Endocrinology* 139:4127-4139

Feleder C, Jarry H, Leonhardt S, Moguilevsky JA, Wuttke W (1996) Evidence to suggest that gonadotropin-releasing hormone inhibits its own secretion by affecting hypothalamic amino acid neurotransmitter release. *Neuroendocrinology* 64:298-304

Ferin M, Carmel PW, Zimmerman EA, Warren M, Perez R, Vande Wiele RL (1974) Location of intrahypothalamic estrogen-responsive sites influencing LH secretion in the female Rhesus monkey. *Endocrinology* 95:1059-1068

Ferrara P, Houghten R, Li CH (1979) beta-Endorphin: characteristics of binding sites in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 89:786-792

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

Fink G, Sarkar DK, Chiappa SA (1977) Gonadotrophin releasing hormone surge during pro-oestrus: role of steroid hormones *J Endocrinol*, 75:47P-48P

Finley JC, Lindstrom P, Petrusz P (1981a) Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 33:28-42

Finley JC, Maderdrut JL, Petrusz P (1981b) The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 198:541-565

Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW (1990) Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 51:276-283

Frankfurt M, Gould E, Woolley CS, McEwen BS (1990) Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology* 51:530-535

Funaba M, Murata T, Fujimura H, Murata E, Abe M, Torii K (1997) Immunolocalization of type I or type II activin receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol* 9:105-111

- G -

Gabriel SM, Berglund LA, Simpkins JW (1986) A decline in endogenous opioid influence during the steroid-induced hypersecretion of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 118:558-561

Galbiati M, Zanisi M, Messi E, Cavarretta I, Martini L, Melcangi RC (1996) Transforming growth factor-beta and astrocytic conditioned medium influence luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in the hypothalamic cell line GT1. *Endocrinology* 137:5605-5609

Ganong WF (1963) The central nervous system and the synthesis and release of adrenocorticotrophic hormone. Dans: A.V. Nalbandov (ed) : *Advances in Neuroendocrinology*. Urbana : Univ. Illinois Press, pp. 92-157

Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268:15174-15179

Garcia de Yebenes E, Pelletier G (1993) Opioid regulation of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the rat brain as studied by in situ hybridization. *Neuropeptides* 25:91-94

Garcia de Yebenes E, Pelletier G (1994) Negative regulation of proopiomelanocortin gene expression by GABAA receptor activation in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 15:615-618

Garcia de Yebenes E, Li S, Fournier A, St-Pierre S, Pelletier G (1995) Regulation of proopiomelanocortin gene expression by neuropeptide Y in the rat arcuate nucleus. *Brain Res* 674:112-116

Garcia-Segura LM, Baetens D, Naftolin F (1986) Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats. *Brain Res* 366:131-136

Garcia-Segura LM, Luquin S, Parducz A, Naftolin F (1994) Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* 10:59-69

Gayle D, Ilyin SE, Plata-Salaman CR (1999) Feeding status and bacterial LPS-induced cytokine and neuropeptide gene expression in hypothalamus. *Am J Physiol* 277:R1188-1195

Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ (1983) Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376

Ghosh PK, Baskaran N, van den Pol AN (1997) Developmentally regulated gene expression of all eight metabotropic glutamate receptors in hypothalamic suprachiasmatic and arcuate nuclei—a PCR analysis. *Dev Brain Res* 102:1-12

Gonzalez AM, Logan A, Ying W, Lappi DA, Berry M, Baird A (1994) Fibroblast growth factor in the hypothalamic-pituitary axis: differential expression of fibroblast growth factor-2 and a high affinity receptor. *Endocrinology* 134:2289-2297

Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A (1995) A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res* 701:201-226

Gonzalez-Manchon C, Bilezikjian LM, Corrigan AZ, Mellon PL, Vale W (1991) Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 54:373-377

- H -

Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, Laburthe M, Mayaux JF (1994) Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *PNAS* 91:9780-9783

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

Hagino N, Kosaras B, Flerko B (1977) Septal projection to the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Acta Biol Acad Sci Hung* 28:235-238

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1:271-272

Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18:559-572

Herbison AE, Chapman C, Dyer RG (1991) Role of medial preoptic GABA neurones in regulating luteinising hormone secretion in the ovariectomised rat. *Exp Brain Res* 87:345-352

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, 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

Herbison AE (1998) Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19:302-330

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

Hisano S, Okamura Y, Daikoku S (1984) Synaptic regulation of hypothalamic neurons containing ACTH by substance P. *Brain Res* 308:162-165

Hoffman GE, Fitzsimmons MD, Watson RE (1988) Relationship of endogenous opioid peptide axons to GnRH neurons in the rat. Dans : Dyer RG, Bicknell RL (eds) *Brain Opioid Systems in Reproduction*. Oxford University Press, Oxford, U.K., pp. 125-134

Hoffman GE, Lee WS, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons MD (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-fos antigen after steroid activation. *Endocrinology* 126:1736-1741

Hohmann JG, Clifton DK, Steiner RA (1998) Galanin: analysis of its coexpression in gonadotropin-releasing hormone and growth hormone-releasing hormone neurons. *Ann N Y Acad Sci* 863:221-235

Hokfelt T, Everitt BJ, Theodorsson-Norheim E, Goldstein M (1984) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol* 222:543-559

Hope J, Ratter SJ, Estivariz FE, McLoughlin L, Lowry PJ (1981) Development of a radioimmunoassay for an amino-terminal peptide of pro-opiocortin containing the gamma-

MSH region: measurement and characterization in human plasma. Clin Endocrinol 15:221-227

Horvath TL, Naftolin F, Leranath C (1992a) GABAergic and catecholaminergic innervation of mediobasal hypothalamic beta-endorphin cells projecting to the medial preoptic area. Neuroscience 51:391-399

Horvath TL, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1992b) Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. Endocrinology 131:2461-2467

Horvath TL, Kalra SP, Naftolin F, Leranath C (1995a) Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. J Neuroendocrinol 7:579-588

Horvath TL, Leranath C, Kalra SP, Naftolin F (1995b) Galanin neurons exhibit estrogen receptor immunoreactivity in the female rat mediobasal hypothalamus. Brain Res 675:321-324

Horvath TL, Naftolin F, Leranath C, Sahu A, Kalra SP (1996) Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interaction in the rat hypothalamus. Endocrinology 137:3069-3078

Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. Brain Res 756:283-286

Howard AD, Tan C, Shiao LL, Palyha OC, McKee KK, Weinberg DH, Feighner SD, Cascieri MA, Smith RG, Van Der Ploeg LH, Sullivan KA (1997) Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin. FEBS Lett 405:285-290

Howard G, Peng L, Hyde JF (1997) An estrogen receptor binding site within the human galanin gene. Endocrinology 138:4649-4656

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL (2000) Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. Endocrinology 141:3506-3509

Huang X, Harlan RE (1993) Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. Brain Res 624:309-311

- I -

Ibata Y, Kawakami F, Fukui K, Obata-Tsuto HL, Tanaka M, Kubo T, Okamura H, Morimoto N, Yanaihara C, Yanaihara N (1984a) Light and electron microscopic immunocytochemistry of neurotensin-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. Brain Res 302:221-230

Ibata Y, Kawakami F, Fukui K, Okamura H, Obata-Tsuto HL, Tsuto T, Terubayashi H (1984b) Morphological survey of neurotensin-like immunoreactive neurons in the hypothalamus. *Peptides* 1:109-120

Ibata Y, Kawakami F, Okamura H, Obata-Tsuto HL, Morimoto N, Zimmerman EA (1985) Light and electron microscopic immunocytochemistry of beta-endorphin/beta-LPH-like immunoreactive neurons in the arcuate nucleus and surrounding areas of the rat hypothalamus. *Brain Res* 341:233-242

Ieri T, Chen HT, Campbell GA, Meites J (1980) Effects of naloxone and morphine on the proestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat. *Endocrinology* 106:1568-1570

- J -

Jacobowitz DM, O'Donohue TL (1978) alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *PNAS* 75:6300-6304

Jacobson W, Kalra SP (1989) Decreases in mediobasal hypothalamic and preoptic area opioid ([³H]naloxone) binding are associated with the progesterone-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 124:199-206

Jamali AK, Tramu G (1997) Daily cycle of fos expression within hypothalamic POMC neurons of the male rat. *Brain Res* 771:45-54

Jamali KA, Tramu G (1999) Control of rat hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons by a circadian clock that is entrained by the daily light-off signal. *Neuroscience* 93:1051-1061

Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W (1991) Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 53:261-267

Jégou S, Boutelet I, Vaudry H (2000) Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 12:501-505

Jennes L, McShane T, Brame B, Centers A (1996) Dynamic changes in gonadotropin releasing hormone receptor mRNA content in the mediobasal hypothalamus during the rat estrous cycle. *J Neuroendocrinol* 8:275-281

Jirikowski GF, Merchenthaler I, Rieger GE, Stumpf WE (1986) Estradiol target sites immunoreactive for beta-endorphin in the arcuate nucleus of rat and mouse hypothalamus. *Neurosci Lett* 65:121-126

Johnston CA, Tesone M, Negro-Vilar A (1984) Steroid-monoamine feedback interactions in discrete brain regions using as a model the monosodium glutamate (MSG)-lesioned rat. *Life Sci* 34:1287-1297

Jones EE, Naftolin F (1990) Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res* 510:84-91

Jung H, Shannon EM, Fritschy JM, Ojeda SR (1998) Several GABAA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 780:218-229

Junier MP, Ma YJ, Costa ME, Hoffman G, Hill DF, Ojeda SR (1991) Transforming growth factor alpha contributes to the mechanism by which hypothalamic injury induces precocious puberty. *PNAS* 88:9743-9747

Jureus A, Cunningham MJ, McClain ME, Clifton DK, Steiner RA (2000) Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 141:2703-2706

- K -

Kahn D, Abrams GM, Zimmerman EA, Carraway R, Leeman SE (1980) Neurotensin neurons in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study. *Endocrinology* 107:47-54

Kalra PS, Kalra SP (1980) Modulation of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone levels by intracranial and subcutaneous implants of gonadal steroids in castrated rats: effects of androgen and estrogen antagonists. *Endocrinology* 106:390-3907

Kalra SP (1981) Neural loci involved in naloxone-induced luteinizing hormone release: effects of a norepinephrine synthesis inhibitor. *Endocrinology* 109:1805-1810

Kalra SP, Kalra PS (1989) Do testosterone and estradiol-17 beta enforce inhibition or stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion? *Biol Reprod* 41:559-570

Kalra PS, Sahu A, Kalra SP (1990a) Interleukin-1 inhibits the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge and release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 126:2145-2152

Kalra PS, Fuentes M, Sahu A, Kalra SP (1990b) Endogenous opioid peptides mediate the interleukin-1-induced inhibition of the release of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone and LH. *Endocrinology* 127:2381-2386

Kalra SP, Fuentes M, Fournier A, Parker SL, Crowley WR (1992) Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology* 130:3323-3330

Kalra SP (1993) Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 14:507-538

Kalra PS, Norlin M, Kalra SP (1995) Neuropeptide Y stimulates beta-endorphin release in the basal hypothalamus: role of gonadal steroids. *Brain Res* 705:353-356

Kalra SP, Horvath T, Naftolin F, Xu B, Pu S, Kalra PS (1997) The interactive language of the hypothalamus for the gonadotropin releasing hormone (GNRH) system. *J Neuroendocrinol* 9:569-576

Kawakami Si, Ichikawa M, Murahashi K, Hirunagi K, Tsukamura H, Maeda Ki (1998) Excitatory amino acids act on the median eminence nerve terminals to induce gonadotropin-releasing hormone release in female rats. *Gen Comp Endocrinol* 112:372-382

Kelly MJ, Loose MD, Ronnekleiv OK (1990) Opioids hyperpolarize beta-endorphin neurons via mu-receptor activation of a potassium conductance. *Neuroendocrinology* 52:268-275

Kerdelhue B, Valens M, Langlois Y (1978) [Stimulation of pituitary LH and FSH secretion after immunoneutralization of endogenous substance P in the cycling rat]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 286:977-979

Kerdelhue B, Karteszi M, Pasqualini C, Reinberg A, Mezey E, Palkovits M (1983) Circadian variations in beta-endorphin concentrations in pituitary and in some brain nuclei of the adult male rat. *Brain Res* 261:243-248

Kerr NC, Holmes FE, Wynick D (2000) Galanin-like peptide (GALP) is expressed in rat hypothalamus and pituitary, but not in DRG. *Neuroreport* 11:3909-3913

Khorram O, Bedran de Castro JC, McCann SM (1984a) Physiological role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in modulating the secretion of prolactin and luteinizing hormone in the female rat. *PNAS* 81:8004-8008

Khorram O, DePalatis LR, McCann SM (1984b) The effect and possible mode of action of alpha-melanocyte-stimulating hormone on gonadotropin release in the ovariectomized rat: an in vivo and in vitro analysis. *Endocrinology* 114:227-233

Khorram O, Pau KY, Spies HG (1988) Release of hypothalamic neuropeptide Y and effects of exogenous NPY on the release of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins in intact and ovariectomized does in vitro. *Peptides* 9:411-417

Kim K, Ramirez VD (1985) In vitro luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused rat hypothalami: site of action of progesterone and effect of estrogen priming. *Endocrinology* 116:252-258

Kiss JZ, Williams TH (1983) ACTH-immunoreactive boutons form synaptic contacts in the hypothalamic arcuate nucleus of rat: evidence for local opiocortin connections. *Brain Res* 263:142-146

Kiss J, Kocsis K, Csaki A, Gorcs TJ, Halasz B (1997) Metabotropic glutamate receptor in GHRH and beta-endorphin neurones of the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroreport* 8:3703-3707

Kolakowski LF Jr, O'Neill GP, Howard AD, Broussard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateauneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG, O'Dowd BF (1998) Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* 71:2239-2251

Krieg WJS (1932) The hypothalamus of the albino rat. *J Comp Neurol* 55 :19-89

Kubo K, Kiyota Y, Fukunaga S (1983) Effects of third ventricular injection of beta-endorphin on luteinizing hormone surges in female rat: sites and mechanisms of opioid actions in the brain. *Endocrinol Jpn* 30:419-433

- L -

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

Lagny-Pourmir I, Epelbaum J (1992) Regional stimulatory and inhibitory effects of guanine nucleotides on [125I]galanin binding in rat brain: relationship with the rate of occupancy of galanin receptors by endogenous galanin. *Neuroscience* 49:829-847

Lagrange AH, Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Kelly MJ (1996) Estrogen rapidly attenuates a GABAB response in hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 64:114-123

Lamar CA, Bhat GK, Mahesh VB, Brann DW (1999) Evidence that neuronal nitric oxide synthase but not heme oxygenase increases in the hypothalamus on proestrus afternoon. *Neuroendocrinology* 70:360-367

Langub MC Jr, Watson RE Jr (1992) Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 130:364-372

Lapchak PA, Araujo DM (1993) Interleukin-2 regulates monoamine and opioid peptide release from the hypothalamus. *Neuroreport* 4:303-306

Larm JA, Gundlach AL (2000) Galanin-Like Peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology* 72:67-71

Larsen PJ (1992) Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 316:287-313

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

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

Leadem CA, Yagenova SV (1987) Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 45:109-117

Leal S, Andrade JP, Paula-Barbosa MM, Madeira MD (1998) Arcuate nucleus of the hypothalamus: effects of age and sex. *J Comp Neurol* 401:65-88

Lee WS, Smith MS, Hoffman GE (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *PNAS* 87:5163-5167

Lee S, Rivier C (1997) Effect of repeated activin-A treatment on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the adult male rat. *Biol Reprod* 56:969-975

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

Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F (1988) Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro-opiomelanocortin-immunoreactive axons and LH-RH neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res* 449:167-76

Leranth C, Shanabrough M, Naftolin F (1991) Estrogen induces ultrastructural changes in progesterone receptor-containing GABA neurons of the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 54:571-579

Levine JE (1997) New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* 56:293-302

Li CH, Chung D, Doneen BA (1976) Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 72:1542-1547

Li S, Pelletier G (1993) Opioid regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain as studied by in situ hybridization. *Neuroreport* 4:331-333

Li X, Schwartz PE, Rissman EF (1997) Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 66:63-67

Li C, Chen P, Smith MS (1999) Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140:5382-5390

Liotta AS, Gildersleeve D, Brownstein MJ, Krieger DT (1979) Biosynthesis in vitro of immunoreactive 31,000-dalton corticotropin/beta-endorphin-like material by bovine hypothalamus. *PNAS* 76:1448-1452

Lissitzky JC, Giraud P, Conte-Devolx B, Gillioz P, Boudouresque F, Eskay RL, Oliver C (1980) beta-Endorphin is present in high concentration in the hypophyseal portal vessels of rats. *Neurosci Lett* 19:191-195

Lopez FJ, Negro-Vilar A (1990) Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* 127:2431-2436

Lopez FJ, Liposits Z, Merchenthaler I (1992a) Evidence for a negative ultrashort loop feedback regulating galanin release from the arcuate nucleus-median eminence functional unit. *Endocrinology* 130:1499-1507

Lopez FJ, Donoso AO, Negro-Vilar A (1992b) Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 130:1986-1992

Lopez FJ, Meade EH Jr, Negro-Vilar A (1993) Endogenous galanin modulates the gonadotropin and prolactin proestrous surges in the rat. *Endocrinology* 132:795-800

Luckman SM, Rosenzweig I, Dickson SL (1999) Activation of arcuate nucleus neurons by systemic administration of leptin and growth hormone-releasing peptide-6 in normal and fasted rats. *Neuroendocrinology* 70:93-100

- M -

Ma YJ, Junier MP, Costa ME, Ojeda SR (1992) Transforming growth factor-alpha gene expression in the hypothalamus is developmentally regulated and linked to sexual maturation. *Neuron* 9:657-670

Ma YJ, Berg-von der Emde K, Moholt-Siebert M, Hill DF, Ojeda SR (1994a) Region-specific regulation of transforming growth factor alpha (TGF alpha) gene expression in astrocytes of the neuroendocrine brain. *J Neurosci* 14:5644-5651

Ma YJ, Hill DF, Junier MP, Costa ME, Felder SE, Ojeda SR (1994b) Expression of epidermal growth factor receptor changes in the hypothalamus during the onset of female puberty. *Mol Cell Neurosci* 5:246-262

Mabley J, Wayman CP, Wilson JF (1991) Endogenous gamma-aminobutyric acid tonically inhibits release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from rat hypothalamic slices. *Eur J Pharmacol* 209:127-129

MacConell LA, Widger AE, Barth-Hall S, Roberts VJ (1998) Expression of activin and follistatin in the rat hypothalamus: anatomical association with gonadotropin-releasing hormone neurons and possible role of central activin in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine* 9:233-241

MacConell LA, Lawson MA, Mellon PL, Roberts VJ (1999) Activin A regulation of gonadotropin-releasing hormone synthesis and release in vitro. *Neuroendocrinology* 70:246-254

MacMillan SJ, Clarke G (1983) Opioid peptides have differential actions on sub-populations of arcuate neurones. *Life Sci* 33 :529-532

Maeno H, Kiyama H, Tohyama M (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol Brain Res* 18:43-58

Mains RE, Eipper BA, Ling N (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. PNAS 74:3014-3018

Mann PE, Foltz G, Rigero BA, Bridges RS (1999) The development of POMC gene expression in the medial basal hypothalamus of prepubertal rats. Dev Brain Res 116:21-28

Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. J Comp Neurol 350:412-438

Marks DL, Smith MS, Vrontakis M, Clifton DK, Steiner RA (1993) Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. Endocrinology 132:1836-1844

Marks DL, Lent KL, Rossmanith WG, Clifton DK, Steiner RA (1994) Activation-dependent regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. Endocrinology 134:1991-1998

Masotto C, Wisniewski G, Negro-Vilar A (1989). Different gamma-aminobutyric acid receptor subtypes are involved in the regulation of opiate-dependent and independent luteinizing hormone-releasing hormone secretion. Endocrinology 125:548-553

Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. Annu Rev Cell Biol 6:597-641

Mateo AR, Hijazi M, Hammer RP Jr (1992) Dynamic patterns of medial preoptic mu-opiate receptor regulation by gonadal steroid hormones. Neuroendocrinology 55:51-58

Matera C, Wardlaw SL (1993) Dopamine and sex steroid regulation of POMC gene expression in the hypothalamus. Neuroendocrinology 58:493-500

Matsuo A, Tooyama I, Isobe S, Oomura Y, Akiguchi I, Hanai K, Kimura J, Kimura H (1994) Immunohistochemical localization in the rat brain of an epitope corresponding to the fibroblast growth factor receptor-1. Neuroscience 60:49-66

Meddle SL, Follett BK (1997) Photoperiodically driven changes in Fos expression within the basal tuberal hypothalamus and median eminence of Japanese quail. J Neurosci 17:8909-8918

Medhamurthy R, Gay VL, Plant TM (1992) Repetitive injections of L-glutamic acid, in contrast to those of N-methyl-D,L-aspartic acid, fail to elicit sustained hypothalamic GnRH release in the prepubertal male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Neuroendocrinology 55:660-666

Meister B, Hokfelt T (1988) Peptide- and transmitter-containing neurons in the mediobasal hypothalamus and their relation to GABAergic systems: possible roles in control of prolactin and growth hormone secretion. Synapse 2:585-605

Meister B, Scanlon MF, Hokfelt T (1990) Occurrence of galanin-like immunoreactivity in growth hormone-releasing factor (GRF)-containing neurons of the monkey (*Macaca fascicularis*) infundibular nucleus and median eminence. Neurosci Lett 119:136-139

Meister B (2000) Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 59:265-304

Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A (1986a) Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 248:475-517

Melander T, Hokfelt T, Rokaeus A, Cuello AC, Oertel WH, Verhofstad A, Goldstein M (1986b) Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *J Neurosci* 6:3640-3654

Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M (1995) Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136:679-686

Melcangi RC, Galbiati M, Magnaghi V, Cavarretta I, Martini L, LHRH-secreting neurons: role of growth factors and steroids. Program of the Forum of European Neuroscience (FENS), Brighton (UK), 2000, p. 187; published in *European Journal of Neuroscience*, volume 12, supplement 11

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996a) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P (1996b) Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 8:733-735

Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1990) Colocalization of galanin and luteinizing hormone-releasing hormone in a subset of preoptic hypothalamic neurons: anatomical and functional correlates. *PNAS* 87:6326-6330

Merchenthaler I (1991) The hypophysiotropic galanin system of the rat brain. *Neuroscience* 44:643-654

Merchenthaler I, Lennard DE, Lopez FJ, Negro-Vilar A (1993) Neonatal imprinting predetermines the sexually dimorphic, estrogen-dependent expression of galanin in luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *PNAS* 90:10479-10483

Messi E, Galbiati M, Magnaghi V, Zucchi I, Martini L, Melcangi RC (1999) Transforming growth factor beta2 is able to modify mRNA levels and release of luteinizing hormone-releasing hormone in a immortalized hypothalamic cell line (GT1-1). *Neurosci Lett* 270:165-168

Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W (1988) Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol* 2:1352-1563

- Mezey E, Kiss JZ, Mueller GP, Eskay R, O'Donohue TL, Palkovits M (1985) Distribution of the pro-opiomelanocortin derived peptides, adrenocorticotrope hormone, alpha-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin (ACTH, alpha-MSH, beta-END) in the rat hypothalamus. *Brain Res* 328:341-347
- Miller MM, Tousignant P, Yang U, Pedvis S, Billiar RB (1995) Effects of age and long-term ovariectomy on the estrogen-receptor containing subpopulations of beta-endorphin-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of female C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology* 61:542-551
- Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert JP, Croix D, Beauvillain JC (1997a) Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 8:3167-3172
- Mitchell V, Habert-Ortoli E, Epelbaum J, Aubert JP, Beauvillain JC (1997b) Semiquantitative distribution of galanin-receptor (GAL-R1) mRNA-containing cells in the male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 66:160-172
- Mitchell V, Bouret S, Howard AD, Beauvillain JC (1999a) Expression of the galanin receptor subtype Gal-R2 mRNA in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16:265-277
- Mitchell V, Bouret S, Prevot V, Jennes L, Beauvillain JC (1999b) Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurones of the rostral preoptic area. *J Neuroendocrinol* 11:805-812
- Mitsushima D, Hei DL, Terasawa E (1994) gamma-Aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *PNAS* 91:395-399
- Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ (1990) The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127:1375-1384
- Morishita T, Hidaka T, Sugahara K, Noguchi T (1998) Leptin changes Ca²⁺/calmodulin-dependent response and up-regulates the gene expression of calcineurin in rat hypothalamus. *Life Sci* 63:PL311-315
- Morrell JI, Schwanzel-Fukuda M, Fahrbach SE, Pfaff DW (1984) Axonal projections and peptide content of steroid hormone concentrating neurons. *Peptides* 5:227-239
- Morrell JI, McGinty JF, Pfaff DW (1985) A subset of beta-endorphin- or dynorphin-containing neurons in the medial basal hypothalamus accumulates estradiol. *Neuroendocrinology* 41:417-426
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8:1298-1308

Naftolin F, Leranth C, Perez J, Garcia-Segura LM (1993) Estrogen induces synaptic plasticity in adult primate neurons. *Neuroendocrinology* 57:935-939

Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI, Foster DL (1998) Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 67:370-376

Nagatani S, Tsukamura H, Maeda K (1994) Estrogen feedback needed at the paraventricular nucleus or A2 to suppress pulsatile luteinizing hormone release in fasting female rats. *Endocrinology* 135:870-875

Nakagawa Y, Shiosaka S, Emson PC, Tohyama M (1985) Distribution of neuropeptide Y in the forebrain and diencephalon: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 361:52-60

Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann SM (1979) Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Endocrinology* 104:1749-1757

Nemeroff CB, Lamartiniere CA, Mason GA, Squibb RE, Hong JS, Bondy SC (1981) Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. *Neuroendocrinology* 33:265-267

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

Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K (1990) Immunohistochemical identification of galanin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Neuroendocrinology* 51:572-575

Nikolarakis KE, Loeffler JP, Almeida OF, Herz A (1988) Pre- and postsynaptic actions of GABA on the release of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Brain Res Bull* 21:677-683

Nordstrom O, Melander T, Hokfelt T, Bartfai T, Goldstein M (1987) Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the rat median eminence. *Neurosci Lett* 73:21-26

- O -

O'Donohue TL, Miller RL, Jacobowitz DM (1979a) Identification, characterization and stereotaxic mapping of intraneuronal alpha-melanocyte stimulating hormone-like immunoreactive peptides in discrete regions of the rat brain. *Brain Res* 176:101-23

O'Donohue TL, Massari VJ, Tizabi Y, Jacobowitz DM (1979b) Identification and distribution of alpha-melanotropin in discrete regions of the cat brain. *Brain Res Bull* 4:829-832

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

Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, Satoh N, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, et al (1995) Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 96:1647-1652

Ohtaki T, Kumano S, Ishibashi Y, Ogi K, Matsui H, Harada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M (1999) Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J Biol Chem* 274:37041-37045

Ohtsuka S, Miyake A, Nishizaki T, Tasaka K, Aono T, Tanizawa O (1987) Substance P stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus in vitro with involvement of oestrogen. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:247-252

Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM (1979) Release of prostaglandin Es by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology* 104:617-624

Ojeda SR, Urbanski HF, Costa ME, Hill DF, Moholt-Siebert M (1990) Involvement of transforming growth factor alpha in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus. *PNAS* 87:9698-9702

Ojeda SR, Ma YJ, Lee BJ, Prevot V (2000) Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res* 55:197-223

Oliver C, Mical RS, Porter JC (1977) Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* 101:598-604

Olmos G, Naftolin F, Perez J, Tranque PA, Garcia-Segura LM (1989) Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 32:663-667

Olster DH, Blaustein JD (1990) Immunocytochemical colocalization of progesterin receptors and beta-endorphin or enkephalin in the hypothalamus of female guinea pigs. *J Neurobiol* 21:768-780

- P -

Pang L, Hashemi T, Lee HJ, Maguire M, Graziano MP, Bayne M, Hawes B, Wong G, Wang S (1998) The mouse GalR2 galanin receptor: genomic organization, cDNA cloning, and functional characterization. *J Neurochem* 71:2252-2259

Parducz A, Perez J, Garcia-Segura LM (1993) Estradiol induces plasticity of gabaergic synapses in the hypothalamus. *Neuroscience* 53:395-401

Parducz A, Szilagyi T, Hoyk S, Naftolin F, Garcia-Segura LM (1996) Neuroplastic changes in the hypothalamic arcuate nucleus: the estradiol effect is accompanied by increased exoendocytotic activity of neuronal membranes. *Cell Mol Neurobiol* 16:259-269

Parker EM, Izzarelli DG, Nowak HP, Mahle CD, Iben LG, Wang J, Goldstein ME (1995) Cloning and characterization of the rat GALR1 galanin receptor from Rin14B insulinoma cells. *Mol Brain Res* 34:179-189

Parker RM, Herzog H (1999) Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci* 11:1431-1448

Petersen SL, McCrone S, Coy D, Adelman JP, Mahan LC (1993a) GABAA receptor subunit in cells of the preoptic area: colocalisation with LHRH mRNA using dual-label in situ hybridization histochemistry. *Endocrine Journal* 1:29-34

Petersen SL, Keller ML, Carder SA, McCrone S (1993b) Differential effects of estrogen and progesterone on levels of POMC mRNA levels in the arcuate nucleus: relationship to the timing of LH surge release. *J Neuroendocrinol* 5:643-648

Petersen SL, McCrone S, Keller M, Shores S (1995) Effects of estrogen and progesterone on luteinizing hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels: consideration of temporal and neuroanatomical variables. *Endocrinology* 136:3604-3610

Phelps CP, Kalra SP, Kalra PS (1992) In vivo pulsatile LHRH release into the anterior pituitary of the male rat: effects of castration. *Brain Res*, 569:159-163

Ping L, Mahesh VB, Brann DW (1994) A physiological role for N-methyl-D-aspartic acid and non-N-methyl-D-aspartic acid receptors in pulsatile gonadotropin secretion in the adult female rat. *Endocrinology* 135:113-118

Planas B, Kolb PE, Raskind MA, Miller MA (1994) Activation of galanin pathways across puberty in the male rat: assessment of regional densities of galanin binding sites. *Neuroscience* 63:859-867

Plata-Salaman CR, Ilyin SE, Turrin NP, Gayle D, Flynn MC, Romanovitch AE, Kelly ME, Bureau Y, Anisman H, McIntyre DC (2000) Kindling modulates the IL-1 β system, TNF- α , TGF- β 1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Mol Brain Res* 75:248-258

Porkka-Heiskanen T, Urban JH, Turek FW, Levine JE (1994) Gene expression in a subpopulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons prior to the preovulatory gonadotropin surge. *J Neurosci* 14:5548-5558

Prevot V, Bouret S, Stefano GB, Beauvillain JC (2000a) Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Rev* 34:27-41

Prevot V, Bouret S, Croix D, Takumi T, Jennes L, Mitchell V, Beauvillain JC (2000b) Evidence that members of the TGF β superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF β and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat. *J Neuroendocrinol* 12:665-670

Pu S, Horvath TL, Diano S, Naftolin F, Kalra PS, Kalra SP (1997) Evidence showing that beta-endorphin regulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) efflux: anatomical

and functional support for an interaction between opiates and nitric oxide. *Endocrinology* 138:1537-1543

- Q -

Quinones-Jenab V, Ogawa S, Jenab S, Pfaff DW (1996) Estrogen regulation of preproenkephalin messenger RNA in the forebrain of female mice. *J Chem Neuroanat* 12:29-36

- R -

Raposo PD, Castillo E, d'Alleva V, Broqua P, Pralong FP, Aubert ML (2000) Chronic blockade of the melanocortin 4 receptor subtype leads to obesity independently of neuropeptide Y action, with no adverse effects on the gonadotropic and somatotrophic axes. *Endocrinology* 141:4419-4427

Rasmussen DD, Liu JH, Wolf PL, Yen SS (1987) Neurosecretion of human hypothalamic immunoreactive beta-endorphin: in vitro regulation by dopamine. *Neuroendocrinology* 45:197-200

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

Rasmussen DD, Jakubowski M, Allen DL, Roberts JL (1992) Positive correlation between proopiomelanocortin and tyrosine hydroxylase mRNA levels in the mediobasohypothalamus of ovariectomized rats: response to estradiol replacement and withdrawal. *Neuroendocrinology* 56:285-294

Redding TW, Schally AV, Arimura A, Wakabayashi I (1971) Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology* 8:245-255

Renstrom E, Ding WG, Bokvist K, Rorsman P (1996) Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron* 17:513-522

Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM (1992) Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *PNAS* 89:11543-11546

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. *PNAS* 90:10130-10134

Rettori V, Canteros G, Renoso R, Gimeno M, McCann SM (1997) Oxytocin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from medial basal hypothalamic explants by releasing nitric oxide. *PNAS* 94:2741-2744

- Rivest S, Torres G, Rivier C (1992) Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1 beta on brain c-fos expression and neuroendocrine functions. *Brain Res* 587:13-23
- Rivest S, Rivier C (1993) Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. *J Neuroendocrinol* 5:445-450
- Rivier C, Vale W (1989) In the rat, interleukin-1 alpha acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. *Endocrinology* 124:2105-2109
- Rivier C, Vale W (1990) Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology* 127:849-856
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. *Endocrinology* 117:2471-2477
- Roselli CE, Resko JA (1987) The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. *Steroids* 50:495-508
- Roselli-Rehfuß L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD (1993) Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *PNAS* 90:8856-8860
- Rossmannith WG, Clifton DK, Steiner RA (1996) Galanin gene expression in hypothalamic GnRH-containing neurons of the rat: a model for autocrine regulation. *Horm Metab Res* 28:257-266
- Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E, Epelbaum J, Kordon C (1976) In vitro release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus: effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99:1663-1666
- Rotsztein WH, Drouva SV, Pattou E, Kordon C (1978a) Effect of morphine on the basal and the dopamine-induced release of LHRH from mediobasal hypothalamic fragments in vitro. *Eur J Pharmacol*:285-286
- Rotsztein WH, Drouva SV, Pattou E, Kordon C (1978b) Met-enkephalin inhibits in vitro dopamine-induced LHRH release from mediobasal hypothalamus of male rats. *Nature* 274:281-282
- Ruggiero DA, Baker H, Joh TH, Reis DJ (1984) Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *J Comp Neurol* 223:556-582

Sabatino FD, Collins P, McDonald JK (1989) Neuropeptide-Y stimulation of luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence in vitro by estrogen-dependent and extracellular Ca²⁺-independent mechanisms. *Endocrinology* 124:2089-2098

Sabatino FD, Collins P, McDonald JK (1990) Investigation of the effects of progesterone on neuropeptide Y-stimulated luteinizing hormone-releasing hormone secretion from the median eminence of ovariectomized and estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 52:600-607

Sahu A, Crowley WR, Tatemoto K, Balasubramaniam A, Kalra SP (1987) Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine⁴-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides* 8:921-926

Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS (1988) Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res* 457:376-378

Sahu A, Crowley WR, Kalra SP (1990) An opioid-neuropeptide-Y transmission line to luteinizing hormone (LH)-releasing hormone neurons: a role in the induction of LH surge. *Endocrinology* 126:876-883

Sahu A, Xu B, Kalra SP (1994) Role of galanin in stimulation of pituitary luteinizing hormone secretion as revealed by a specific receptor antagonist, galantide. *Endocrinology* 134:529-536

Sannella MI, Petersen SL (1997) Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors. *Endocrinology* 138:1667-1672

Sar M, Sahu A, Crowley WR, Kalra SP (1990) Localization of neuropeptide-Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. *Endocrinology* 127:2752-2756

Sarkar DK, Fink G (1980) Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol* 86:511-524

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

Sarkar DK, Minami S (1995) Diurnal variation in luteinizing hormone-releasing hormone and beta-endorphin release in pituitary portal plasma during the rat estrous cycle. *Biol Reprod*, 53(1):38-45

Schlessinger J, Ullrich A (1992) Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9:383-391

Schumacher M, Coirini H, McEwen BS (1989) Regulation of high-affinity GABA_A receptors in specific brain regions by ovarian hormones. *Neuroendocrinology* 50:315-320

- Schuman EM, Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-183
- Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101-1106
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46:2119-2123
- Scott CJ, Clarke IJ (1993) Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology* 132:1789-1796
- Seilicovich A, Duvilanski BH, Pisera D, Theas S, Gimeno M, Rettori V, McCann SM (1995) Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gamma-aminobutyric acid. *PNAS* 92:3421-3424
- Seong JY, Kang SS, Kam K, Han YG, Kwon HB, Ryu K, Kim K (1998) Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. *Mol Brain Res* 53:226-235
- Shimasaki S, Emoto N, Koba A, Mercado M, Shibata F, Cooksey K, Baird A, Ling N (1988) Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 157:256-263
- Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y (1998) Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett* 243:41-44
- Shivers BD, Harlan RE, Morell JJ, Pfaff DW (1983) Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304:345-347
- Shivers BD, Harlan RE, Pfaff DW (1989) A subset of neurons containing immunoreactive prolactin is a target for estrogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 49:23-27
- Shughrue PJ, Bushnell CD, Dorsa DM (1992) Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology* 131:381-388
- Shughrue PJ, Komm B, Merchenthaler I (1996) The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61:678-681
- 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

Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11:593-602

Simerly RB, Gorski RA, Swanson LW (1986) Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 246:343-363

Simerly RB, Swanson LW (1987) The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications for the control of gonadotropin secretion in the rat. *Brain Res* 400:11-34

Simerly RB, McCall LD, Watson SJ (1988) Distribution of opioid peptides in the preoptic region: immunohistochemical evidence for a steroid-sensitive enkephalin sexual dimorphism. *J Comp Neurol* 276:442-459

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

Simonian SX, Herbison AE (1997) Differential expression of estrogen receptor and neuropeptide Y by brainstem A1 and A2 noradrenaline neurons. *Neuroscience* 76:517-529

Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE (1999) Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol* 411:346-358

Skofitsch G, Jacobowitz DM (1985) Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6:509-546

Skykker MJ, Sim JA, Herbison AE (1999) Detection of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 140:5195-5201

Smith ER, Davison JM (1974) Location of feedback receptors: effects of intracranially implanted steroids on plasma LH and LRF response. *Endocrinology* 95:1566-1573

Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao WJ, Vaysse PJ, Branchek TA, Gerald C, Jones KA (1998) Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 273:23321-23326

Smyth CE, Knee R, Wilkinson M, Murphy PR (1997) Decline in basic fibroblast growth factor (FGF-2) mRNA expression in female rat hypothalamus at puberty. *J Neuroendocrinol* 9:151-159

Stanley SA, Small CJ, Kim MS, Heath MM, Seal LJ, Russell SH, Ghatei MA, Bloom SR (1999) Agouti related peptide (Agrp) stimulates the hypothalamo pituitary gonadal axis in vivo & in vitro in male rats. *Endocrinology* 140:5459-5462

Steiner RA, Kabigting E, Lent K, Clifton DK (1994) Diurnal rhythm in proopiomelanocortin mRNA in the arcuate nucleus of the male rat. *J Neuroendocrinol* 6:603-608

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377:530-532

Suzuki M, 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. *Brain Res Mol Brain Res* 14:239-249

Szentagothai J, Flerko B, Mess B, Halasz B (1972) Hypothalamic control of the anterior pituitary. Budapest : Akademiai Kiado

- T -

Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF (1995) Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF-beta and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 216:208-214

Tappaz ML, Brownstein MJ, Kopin IJ (1977) Glutamate decarboxylase (GAD) and gamma-aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. *Brain Res* 125:109-121

Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138:5063-5066

Tong Y, Zhao HF, Labrie F, Pelletier G (1990) Regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. *Neurosci Lett* 112:104-108

Tong Y, Pelletier G (1992) Role of dopamine in the regulation of proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the arcuate nucleus and pituitary gland of the female rat as studied by in situ hybridization. *Mol Brain Res* 15:27-32

Trentini GP, Botticelli A, Botticelli CS (1974) Effect of monosodium glutamate on the endocrine glands and on the reproductive function of the rat. *Fertil Steril* 25:478

Trudeau VL, Pope L, de Winter JP, Hache RJ, Renaud LP (1996) Regulation of activin type-II receptor mRNA levels in rat hypothalamus by estradiol in vivo. *J Neuroendocrinol* 8:395-401

Tsai PS, Werner S, Weiner RI (1995) Basic fibroblast growth factor is a neurotropic factor in GT1 gonadotropin-releasing hormone neuronal cell lines. *Endocrinology* 136:3831-3838

Tsuruo Y, Kawano H, Nishiyama T, Hisano S, Daikoku S (1983) Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus. Light and electron microscopy. *Brain Res* 289:1-9

Tsuruo Y, Hisano S, Daikoku S (1984a) Morphological evidence for synaptic junctions between substance P-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Neurosci Lett* 46:65-69

Tsuruo Y, Hisano S, Okamura Y, Tsukamoto N, Daikoku S (1984b) Hypothalamic substance P-containing neurons. Sex-dependent topographical differences and ultrastructural transformations associated with stages of the estrous cycle. *Brain Res* 305:331-341

Tsuruo Y, Kawano H, Kagotani Y, Hisano S, Daikoku S, Chihara K, Zhang T, Yanaihara N (1990) Morphological evidence for neuronal regulation of luteinizing hormone-releasing hormone-containing neurons by neuropeptide Y in the rat septo-preoptic area. *Neurosci Lett* 110:261-266

Tsuruo Y, Kawano H, Hisano S, Kagotani Y, Daikoku S, Zhang T, Yanaihara N (1991) Substance P-containing neurons innervating LHRH-containing neurons in the septo-preoptic area of rats. *Neuroendocrinology* 53:236-245

Turner JW, Simpkins JW (1977) Effect of hypothalamic lesions and androgen on plasma luteinizing hormone in the castrated male rat. *Neuroendocrinology*, 24 :80-89

- U -

Ueda S, Nishimura M, Takahashi H, Yoshimura M, Kawata M (1991) Immunohistochemical study of the neuropeptide-Y immunoreactivity in the paraventricular and the preoptic area of the rat following experimental lesions. *Biomed Res* 12 :49-258

Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*;367:1-48

Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB (1991) Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 44:613-625

Urban JH, Das I, Levine JE (1996) Steroid modulation of neuropeptide Y-induced luteinizing hormone releasing hormone release from median eminence fragments from male rats. *Neuroendocrinology* 63:112-119

- V -

Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko P, et al (1988) Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 44:1-34

Van den Pol AN, Cassidy JR (1982) The hypothalamic arcuate nucleus of rat--a quantitative Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204:65-98

Van den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE (1990) Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276-1278

Van den Pol AN (1991) Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J Neurosci* 11:2087-2101

Velasco M, Luchsinger A (1998) Dopamine: pharmacologic and therapeutic aspects. *Am J Ther* 5:37-43

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, Hokfelt T, Wu JY (1982) GABA neuron systems in hypothalamus and the pituitary gland. Immunohistochemical demonstration using antibodies against glutamate decarboxylase. *Neuroendocrinology* 34:117-125

Vivien D, Bernaudin M, Buisson A, Divoux D, MacKenzie ET, Nouvelot A (1998) Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 70:2296-2304

Voigt P, Ma YJ, Gonzalez D, Fahrenbach WH, Wetsel WC, Berg-von der Emde K, Hill DF, Taylor KG, Costa ME, Seidah NG, Ojeda SR (1996) Neural and glial-mediated effects of growth factors acting via tyrosine kinase receptors on luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 137:2593-2605

- W -

Wamsley JK, Young WS 3d, Kuhar MJ (1980) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. *Brain Res* 190:153-174

Wang S, He C, Hashemi T, Bayne M (1997) Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes. *J Biol Chem* 272 :31949-31952

Wardlaw SL, Kim J, Sobieszczyk S (1996) Effect of morphine on proopiomelanocortin gene expression and peptide levels in the hypothalamus. *Mol Brain Res* 41:140-147

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

Waters SM, Krause JE (2000) Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 95:265-271

Wayman CP, Wilson JF (1991) Characteristics of NMDA receptors that stimulate release of hypothalamic alpha-MSH. *Neuroreport* 2:481-484

Wayman CP, Wilson JF (1992) Endogenous glutamate stimulates release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from the rat hypothalamus. *Neuropeptides* 23:93-97

Wayman CP, Pike NV, Wilson JF (1994) N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimulates release

of alpha-MSH from the rat hypothalamus through release of nitric oxide. *Brain Res* 666:201-206

Weiland NG, Wise PM (1990) Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology* 126:804-808

Wetsel WC, Hill DF, Ojeda SR (1996) Basic fibroblast growth factor regulates the conversion of pro-luteinizing hormone-releasing hormone (Pro-LHRH) to LHRH in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 137:2606-2616

Wiemann JN, Clifton DK, Steiner RA (1989) Pubertal changes in gonadotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin gene expression in the brain of the male rat. *Endocrinology* 124:1760-1767

Wilcox JN, Roberts JL (1985) Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 117:2392-2396

Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Ollmann MM, Gantz I, Watson SJ, Barsh GS (1999) Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 140:2387-2397

Wise PM, Scarbrough K, Weiland NG, Larson GH (1990) Diurnal pattern of proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of proestrous, ovariectomized, and steroid-treated rats: a possible role in cyclic luteinizing hormone secretion. *Mol Endocrinol* 4:886-892

Wood J, Garthwaite J (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33:1235-1244

Woods AJ, Stock MJ (1996) Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 381:745

- X -

Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M (1992) A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey.

Xu B, Pu S, Kalra PS, Hyde JF, Crowley WR, Kalra SP (1996a) An interactive physiological role of neuropeptide Y and galanin in pulsatile pituitary luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 137:5297-5302

Xu B, Sahu A, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1996b) Disinhibition from opioid influence augments hypothalamic neuropeptide Y (NPY) gene expression and pituitary luteinizing hormone release: effects of NPY messenger ribonucleic acid antisense oligodeoxynucleotides. *Endocrinology* 137:78-84

Xu M, Urban JH, Hill JW, Levine JE (2000) Regulation of hypothalamic neuropeptide Y Y1 receptor gene expression during the estrous cycle: role of progesterone receptors. *Endocrinology* 141:3319-3327

- Y -

Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, Satoh M (1993) In situ hybridization study of interleukin-1 beta mRNA induced by kainic acid in the rat brain. *Mol Brain Res* 20:153-161

Yabuuchi K, Minami M, Katsumata S, Satoh M (1994) Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain. *Mol Brain Res* 27:27-36

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

Yang Z, Copolov DL, Lim AT (1995) Glutamate enhances the adenylyl cyclase-cAMP system-induced beta-endorphin secretion and POMC mRNA expression in rat hypothalamic neurons in culture: NMDA receptor-mediated modulation. *Brain Res* 692:129-136

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM (1997) Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *PNAS* 94:1023-1028

- Z -

Zanisi M, Messi E, Motta M, Martini L (1987) Ultrashort feedback control of luteinizing hormone-releasing hormone secretion in vitro. *Endocrinology* 121:2199-2204

