

**UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON

Année 2008-2009

N°25.09.06

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**Contribution à l'étude de la population  
de neurones producteurs des peptides RFRP  
dans l'hypothalamus de rat.**

**THÈSE**

présentée et soutenue publiquement

le 11 mai 2009

par

**Kévin LEGAGNEUX**

Né le 29/07/1980 à Le Mans (72)

Membres du jury :

C. PEYRON	Rapporteur	CNRS UMR 5167, Lyon
Y. TILLET	Rapporteur	INRA UMR 6175, Nouzilly
D. FELLMANN	Examineur	Université de Franche-Comté
P-Y. RISOLD	Directeur de thèse	Université de Franche-Comté
R. DELAGE-MOURROUX	Examineur	Université de Franche-Comté

## **Remerciements**

*La thèse constitue une expérience marquante, passionnante et intensive. Après ces nombreuses et laborieuses années passées au sein du Laboratoire d'Histologie, me voici enfin arrivé au bout de ma peine. Refermant cet ouvrage, je peux maintenant me retourner pour contempler cette période.*

*Grâce à un grand nombre de personnes au laboratoire mais également en-dehors, elle a été plus agréable, vivante et excitante. Qu'il s'agisse de sciences ou d'états d'âmes, nous avons beaucoup partagé : la joie (les jolis doubles marquages), la traversée du désert (surtout au moment de réorienter le sujet), l'excitation (les premiers résultats de RT-PCR semi-quantitative), la colère (les coupes au cryostat pas toujours des plus belles) et le soulagement (la publication de l'article après deux tentatives...enfin !!!). Je tiens ici à saluer toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail de thèse.*

*Pour tout cette période, je tiens en premier lieu à remercier très sincèrement mon directeur de thèse, le Docteur Pierre-Yves Risold. « Malgré toutes les difficultés rencontrées, tu as toujours su être à mon écoute, tu m'as soutenu et conseillé, et fait preuve avec moi de la même patience que celle requise par la recherche scientifique. J'ai apprécié tous tes conseils, toutes tes solides connaissances en neuroanatomie mais aussi dans tout un tas de domaines, nos discussions sur les nouvelles technologies automobiles, et ton sens de la perfection pour préparer les différents articles. Un très grand merci pour la patience dont tu as fait preuve pour la rédaction du manuscrit et surtout pour la préparation de la soutenance : grâce à toi, non sans mal, je pense avoir relevé ce grand défi. »*

*Je remercie également le Professeur Michèle Jouvenot. « Professeur, vous m'avez fait la faveur d'accepter que je mène, dans votre équipe, un projet passionnant mais qui n'a malheureusement pas tenu toutes ses promesses. »*

*Le troisième angle de cette trinité est mon épouse Karine. « Sans ton soutien et ton réconfort quotidiens, je n'aurais peut-être pas pu aller au bout de cette aventure. La confiance que tu as placée en moi pour poursuivre mes études à un moment où j'aurais très certainement tout stoppé n'est pas étrangère à l'obtention de ce doctorat. Je sais que tu as souvent été la plus angoissée de nous deux. Je te remercie pour ta compréhension dans les moments les plus délicats, et aussi*

*l'aide que tu m'as apportée pendant ces trois années et demies. Une longue vie s'ouvre maintenant à nous. »*

*Autour de cet ouvrage gravitent bien d'autres personnes sans lesquelles son accomplissement aurait été vain ou impossible. Ainsi, je fais part de ma gratitude au Professeur Dominique Fellmann d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, aux Docteurs Christelle Peyron et Yves Tillet pour avoir acceptés de faire partie de mon jury et de s'être attelés à la lecture et à la correction de ce mémoire, ainsi qu'au Professeur Régis Delage-Mourroux d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Ensuite, je remercie les membres passés et actuels du laboratoire qui ont pu m'apporter une aide technique précieuse et une sympathique compagnie, ils sauront se reconnaître. Plus particulièrement, je tiens à remercier Karine Charrière pour son aide logistique très précieuse, et Christophe (l'autre membre actif de l'association ARKA !!!) pour sa précieuse aide technique. Un grand merci à toute l'équipe pour les petites discussions scientifiques ou non au détour du couloir ou devant un petit thé : Anne, Annie, les deux Claude (C et J), Fabrice alias Fafa, Gabrielle alias Gaby, Martine, Saïd, Sophie,...*

*Concluons cette page de remerciements par une pensée pour ma famille mais aussi pour ma belle-famille, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Après m'avoir supporté, dans tous les sens du terme, depuis l'époque où je n'étais qu'un petit morveux, ils ont dû à nouveau partager mes doutes de ces dernières années et méritent pour cela ma reconnaissance tendre et affectueuse. Ils ont su me soutenir malgré la distance entre nous et comprendre nos si rares et si courtes venues dans le temps. J'espère qu'ils seront tous fiers de ces sacrifices.*

*Tous ces remerciements ont été rédigés dans un moment de profond relâchement intellectuel, sans véritable rigueur ni souci taxinomique. J'ai laissé au hasard de ma mémoire, plus impressionnée par les évènements récents, répétés ou chargés d'émotions, le soin de retrouver les différentes personnes à remercier. Dans un autre état d'esprit ou à un autre moment, ces remerciements auraient certainement été tout autres.*



# SOMMAIRE

<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
1. Introduction générale	17
2. Rappels bibliographiques	19
2.1 Les neurones de la ‘zone à MCH’	19
2.2 Les peptides RFamide : depuis FMRF...	25
3. But du travail : hypothèses et objectifs	39
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>43</b>
<b>TAMPONS ET SOLUTIONS</b>	<b>73</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>79</b>
1 <sup>ère</sup> partie : <i>Anatomie des systèmes ‘méastine’ et RFRP</i>	81
1. Distribution des périkaryons à ‘méastine’ et RFRP	83
1.1 Distribution des neurones à ‘méastine’ chez le rat	83
1.2 Distribution des neurones hMet-positifs dans l’hypothalamus humain	95
1.3 Distribution des neurones à RFRP chez le rat	105
1.4 Confrontation des marquages RFRP et méastine : contrôle de la spécificité de l’anticorps hMet	110
1.5 Neurones neuroendocrines	110
1.6 Co-distribution avec MCH, Hcrt, TH, SRIF et GnRH	111
1.7 Conclusion	123
2 <sup>ème</sup> partie : <i>Étude du développement du système RFRP</i>	129
2. Études ontogénétique et morphofonctionnelle des neurones à RFRP	131
2.1 Ontogenèse du système à RFRP	131
2.2 Approche hodologique et étude morphofonctionnelle du système RFRP	134
2.3 Conclusion	143
<b>DISCUSSION</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>173</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>177</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Fig 1 : Diagramme de genèse des neurones à MCH	22
Fig 2 : Diagramme de neurogenèse de l'hypothalamus	24
Fig 3 : Arbre phylogénétique des peptides RFamide	25
Fig 4 : Représentation schématique des peptides méastinergiques	29
Fig 5 : Facteurs de régulation de l'activité de la méastine	31
Fig 6 : Régulation fine de l'axe gonadotrope par la méastine	32
Fig 7 : Représentation schématique des peptides RFRP/GnIH	33
Fig 8 : Schéma des mécanismes d'action des neurones à GnIH	36
Fig 9 : Différents types de cellules présentes dans un frottis vaginal	46
Fig 10 : Photographies de frottis vaginaux lors du cycle estrien chez la rate	47
Fig 11 : Photographies de frottis vaginaux lors de la mise en reproduction	47
Fig 12 : Représentation schématique du prélèvement de l'hypothalamus	58
Fig 13 : Représentation schématique du vecteur plasmidique pGEM <sup>®</sup> -T Easy	63
Fig 14 : Distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet (immunofluorescence)	85
Fig 15 : Cartographie de la distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet	89
Fig 16 : Distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet (enzymologie-complexes PAP)	93
Fig 17 : Dimorphisme sexuel de la distribution des neurones 'méastinergiques'	97
Fig 18 : Distribution des neurones méastinergiques par hybridation <i>in situ</i>	99
Fig 19 : Distribution des neurones méastinergiques chez l'homme	101
Fig 20 : Cartographie de la distribution des neurones méastinergiques chez l'homme	103
Fig 21 : Distribution des neurones à RFRP par hybridation <i>in situ</i>	107
Fig 22 : Cartographie de la distribution de l'ARNm RFRP	109
Fig 23 : Double marquage hybridation <i>in situ</i> (RFRP) et immunohistochimie (méastine)	113
Fig 24 : Cartographie des neurones neuroendocrines, confrontation avec les neurones 'méastinergiques'	115
Fig 25 : Double marquage hybridation <i>in situ</i> (RFRP) et immunohistochimie (MCH)	119
Fig 26 : Double marquage hybridation <i>in situ</i> (RFRP) et immunohistochimie (tyrosine hydroxylase)	121
Fig 27 : Double marquage hybridation <i>in situ</i> (RFRP) et immunohistochimie (somatostatine)	125
Fig 28 : Double marquage hybridation <i>in situ</i> (RFRP) et immunohistochimie (GnRH)	127
Fig 29 : Genèse des neurones à RFRP	133

Fig 30 : Projections afférentes aux neurones à RFRP	139
Fig 31 : Innervation des corps cellulaires RFRP des projections du noyau latéral du septum	141
Fig 32 : Variations des taux d'expression de l'ARNm RFRP sous conditions expérimentales	145
Fig 33 : Représentation schématique des projections du système RFRP	158
Fig 34 : Confrontation des populations de neurones de l'hypothalamus tubéral	162
Fig 35 : Vagues successives de neurogenèse de l'hypothalamus tubéral	165
Fig 36 : Circuits physiologiques liés aux réactions de stress et de défense	172

## **INDEX DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Comparaison des séquences des peptides FMRF et Met-Enképhaline	26
Tableau 2 : Références des anticorps primaires utilisés	54
Tableau 3 : Données de la littérature pour la distribution des neurones méastinergiques	150
Tableau 4 : Comparaison des séquences des peptides RFamide	153



# **ABRÉVIATIONS**



aa : acide aminé  
ac : commissure blanche antérieure  
ACB : noyau accumbens  
aco : branche olfactive de la commissure antérieure  
act : branche temporale de la commissure antérieure  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : acide désoxyribonucléique, complémentaire  
ADP : noyau préoptique antérodorsal  
AgRP : 'agouti-related peptide'  
AHA : aire hypothalamique antérieure  
AHN : noyau antérieur de l'hypothalamus  
AHNa : partie antérieure du noyau antérieur de l'hypothalamus  
AHNc : partie centrale du noyau antérieur de l'hypothalamus  
AHNp : partie postérieure du noyau antérieur de l'hypothalamus  
AMd : partie dorsale du noyau antéromédian du thalamus  
 $\alpha$ -MSH : ' $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone' ou  $\alpha$ -mélanotropine  
AOB : bulbe olfactif accessoire  
AONE : partie externe du noyau olfactif antérieur  
AONI : partie latérale du noyau olfactif antérieur  
AONm : partie médiane du noyau olfactif antérieur  
APN : noyau prétectal antérieur  
ARH : noyau arqué de l'hypothalamus  
ARN : acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATP : adénosine triphosphate  
AVP : aire préoptique ventrolatérale  
AVPV : noyau antéroventral périventriculaire  
B : noyau de Barrington  
BAC : noyau de la commissure antérieure  
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate  
BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine  
BST : noyau de la strie terminale  
CA1/CA2/CA3 : champs 1/2/3 de la corne de Ammon  
CART : 'cocaine- and amphetamine-regulated transcript'

cc : corps calleux  
ccg : genou du corps calleux  
CEAl : partie latérale du noyau central de l'amygdale  
CL : noyau central latéral du thalamus  
CLA : claustrum  
CM : noyau central médian du thalamus  
CONF : confinement  
CP : noyau caudoputamen  
cpd : pédoncule cérébral  
CTP : cytosine triphosphate  
CUN : noyau cunéiforme  
cVMH : capsule du noyau ventromédian de l'hypothalamus  
cyclo : cyclophiline  
DAB : diaminobenzidine  
DIG : digoxygénine  
DMH : noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
DMHd : parties dorsale du noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
DMHp : partie postérieure du noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
DMHv : partie ventrale du noyau dorsomédian de l'hypothalamus  
DMX : noyau moteur dorsal du nerf vague  
dNTP : désoxynucléotide triphosphate  
DTN : noyau tegmental dorsal  
DR : noyau dorsal du raphé  
E : estrogènes  
E0, E11-E20 : 1<sup>er</sup> jour de gestation, 11<sup>ème</sup>-20<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire  
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique  
ER $\alpha$  : récepteur  $\alpha$  aux estrogènes  
FG : fluorogold  
fGRP : 'frog growth hormone-releasing peptide'  
FS : fundus du striatum  
FSH : 'follicle-stimulating hormone'  
fx : fornix  
GALP : 'galanin-like peptide'  
GEN : corps genouillé latéral (ou noyau géniculé du thalamus)

GnIH : 'gonadotropin-inhibitory hormone'  
GnRH : 'gonadotropin-releasing hormone'  
GPR54 : récepteur à la métastine-54, couplé aux protéines G  
GRF1-37 : 'growth hormone-releasing factor, fragment 1-37' (ou somatotropine)  
GTP : guanosine triphosphate  
H1 : fasciculus thalamique  
H2 : fasciculus lenticulaire  
Hcrt/Orx : hypocrétines/orexines  
I : zone internucléaire  
IAD : noyau interantérodorsal du thalamus  
ICc : noyau central du colliculus inférieur  
ICd : noyau dorsal du colliculus inférieur  
ICe : noyau externe du colliculus inférieur  
IF : noyau interfasciculé du raphé  
ILA : aire infralimbique  
IMD : noyau intermédiodorsal du thalamus  
int : capsule interne  
IPTG : isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
IS : immunosérum  
ISO : aires isocorticales  
Kp-54 : kisspeptin-54 (ou métastine)  
LA : noyau latéral de l'amygdale  
LDT : noyau tegmental latérodorsal  
LH : 'luteinizing-hormone'  
LHA : aire hypothalamique latérale  
LM : noyau mamillaire latéral  
LP : noyau postérieur latéral du thalamus  
LPO : aire préoptique latérale  
LRNm : partie magnocellulaire du noyau réticulé latéral  
LS : noyau latéral du septum  
LSc : partie caudale du noyau latéral du septum  
LSr : partie rostrale du noyau latéral du septum  
LSr.dl : partie rostrale dorsolatérale du noyau latéral du septum  
LSr.m : partie rostrale médiane du noyau latéral du septum

LSr.vl : partie rostrale ventrolatérale du noyau latéral du septum  
LSv : partie ventrale du noyau latéral du septum  
MA : noyau préoptique magnocellulaire  
MBO : corps mamillaires  
MCH : hormone de mélan-concentration  
mct : tractus corticohypothalamique médian  
MDRNv : partie ventrale du noyau réticulé médullaire  
ME : éminence médiane  
MEA : noyau médian de l'amygdale  
MEPO : noyau préoptique médial  
Met/hMet/rMet : métastine, homme, rat  
MEV : partie mésencéphalique du noyau trigéminal  
MH : noyau médian de l'habenula  
MOB : bulbe olfactif principal  
MPN : noyau préoptique médian  
MPNc : partie centrale du noyau préoptique médian  
MPNl : partie latérale du noyau préoptique médian  
MPNm : partie médiane du noyau préoptique médian  
MPO : aire préoptique médiane  
MPT : aire prétectale médiane  
MRN : noyau mésencéphalique réticulé  
MS : noyau médian du septum  
mtg : faisceau mamillotegmental  
mtt : faisceau mamillothalamique  
NBT : 4-nitroblue tetrazolium chloride  
NDB : noyau de la bande diagonale  
NK3 : neurokinine-3  
NLL : noyau du lemniscus latéral  
NOT : noyau du tractus optique  
NPC : noyau de la commissure postérieure  
NPAF : neuropeptide AF  
NPFF : neuropeptide FF  
NPSF : neuropeptide SF  
NPY : neuropeptide Y

NTB : noyau du corps trapézoïde  
NTP : nucléoside triphosphate  
NTSl : partie latérale du noyau du tractus solitaire  
NTSm : partie médiane du noyau du tractus solitaire  
OB : bulbes olfactifs  
och : chiasma optique  
opt : tractus optique  
P0, P3-P30 : naissance des animaux, 3<sup>ème</sup>-30<sup>ème</sup> jour de vie postnatale  
PA : noyau postérieur de l'amygdale  
PAG : substance grise périaqueductale  
PAP : complexes peroxydase-antiperoxydase  
PARN : noyau réticulé parvicellulaire  
pb : paires de base  
PB : noyau parabrachial  
PBld : partie latérale dorsale du noyau parabrachial  
PBle : partie latérale externe du noyau parabrachial  
PBmm : partie médiomédiane du noyau parabrachial  
PBS : tampon phosphate salin  
PCG : substance grise centrale du pons  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PD : noyau préoptique postérodorsal  
PFA : paraformaldéhyde  
PH : noyau postérieur de l'hypothalamus  
PHA-L : *phaseolus vulgaris*-leucoagglutinine  
PIR : aire piriforme  
PL : aire prélimbique  
pm : tractus mamillaire principal  
PMd : noyau prémamillaire dorsal  
PMv : noyau prémamillaire ventral  
PO : complexe postérieur du thalamus  
POMC : proopiomélanocortine  
PPN : noyau pédonculopontique  
PPT : noyau prétectal postérieur  
PR : noyau périréuniens

PRNr : partie rostrale du noyau réticulé du pons  
PrRP : 'prolactin-releasing peptide'  
PS : noyau parastrial  
PSCH : noyau préoptique suprachiasmatique  
PT : noyau parataenial  
PV : noyau périventriculaire  
PVa : noyau périventriculaire antérieur  
PVH : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
PVHam : cellules magnocellulaires du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
PVHap : aire parvocellulaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
PVHf : partie fornicaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
PVHpv : aire périventriculaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
PVi : partie intermédiaire du noyau périventriculaire  
PVp : partie postérieure du noyau périventriculaire  
PVpo : noyau périventriculaire préoptique  
PVT : noyau paraventriculaire du thalamus  
RA : restriction alimentaire  
RAR : restriction alimentaire et réalimentation  
RE : noyau reuniens  
RFRP : 'RFamide-related peptide'  
RH : noyau rhomboïde  
RL : noyau linéaire rostrale du raphé  
RNase : ribonucléase  
RT : noyau réticulé du thalamus  
RT-PCR : transcription inverse par réaction de polymérisation en chaîne  
SBPV : zone subparaventriculaire  
SC : colliculus supérieur  
SCd : corne dorsale de la moelle épinière  
SCH : noyau suprachiasmatique  
SCN : noyau suprachiasmatique  
SF : noyau septofimbrial  
SGN : noyau supragénuculé  
SH : noyau septohippocampal  
SI : substance innominée

SN : substance noire  
SNC : système nerveux central  
SNc : partie compacte de la substance noire  
SNr : partie réticulée de la substance noire  
SO : noyau supraoptique  
SOr : noyau supraoptique rétrochiasmatique  
SPVC/SPVI : parties caudale/interpolaire du noyau trigéminal  
SRIF : somatostatine  
SSC : sel de citrate de sodium  
STN : noyau subthalamique  
SUM : noyau supramamillaire  
SUMl : partie latérale du noyau supramamillaire  
T : testostérone  
TAE : tampon Tris-acide Acétique-EDTA  
TE : tampon Tris-EDTA  
TEA : triéthanolamine  
TH : tyrosine-hydroxylase  
TM : noyau tubéromamillaire  
TMd : partie dorsale du noyau tubéromamillaire  
TRS : noyau triangulaire du septum  
TU : aire hypothalamique tubérale  
UTP : uridine triphosphate  
V3 : 3<sup>ème</sup> ventricule (ou 3V)  
V4 : 4<sup>ème</sup> ventricule  
VL : ventricule latéral  
VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus  
VMHc : partie centrale du noyau ventromédian  
VMHdm : partie dorsomédiane du noyau ventromédian  
VTA : aire tegmentale ventrale  
WB : western-blot  
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
ZI : zona incerta



# **INTRODUCTION**



## 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les techniques immunohistochimiques restent irremplaçables afin de décrire la distribution fine de protéines et de neuropeptides dans le système nerveux central. Ces techniques sont complémentaires des approches de biochimie et de biologie moléculaire qui, entre autre, permettent de localiser et quantifier l'expression de ces protéines ou de leur ARNm, ou même d'altérer l'expression du gène correspondant. Ces techniques immunohistochimiques ont donc permis et permettent encore d'étudier la distribution de centaines de neuropeptides ou de protéines dans le SNC de nombreuses espèces, notamment des rongeurs.

Cependant, un anticorps ne reconnaît pas un peptide mais un épitope, et des marquages non spécifiques de la molécule étudiée ne sont pas rares et ont été la source de nombreux débats. Notre équipe est particulièrement sensible à ces phénomènes. En effet, historiquement, elle travaille sur deux populations de neurones peptidergiques hypothalamiques : les neurones producteurs de l'hormone de mélanocortine 'MCH' et ceux producteurs des peptides hypocrétines/orexines 'Hcr/Orx'. Les deux populations ont été initialement fortuitement mises en évidence grâce à des anticorps dirigés contre des neuropeptides non exprimés par ces cellules, mais qui les reconnaissaient par marquages croisés : ainsi, alors que caractérisés en 1989, les neurones à MCH étaient déjà étudiés pendant la période 1983-1989 par des anticorps anti-alpha mélanotropine ' $\alpha$ -MSH' et anti-somatocristine humaine 1-37 ' $\text{GRF}_{1-37}$ ' (entre autre, Watson et Akil, 1979 ; Daikoku *et al.*, 1985 ; Fellmann *et al.*, 1986, 1987), et plus récemment les neurones à hypocrétines 'Hcr/Orx', peptides découverts en 1998 (De Lecea *et al.* ; Sakurai *et al.*) étaient reconnus par des anticorps anti-prolactine ovine (Griffond *et al.*, 1995, 1998 ; Grillon *et al.*, 1998 ; Risold *et al.*, 1998).

Le travail présenté dans ce mémoire découle d'une collaboration entamée en 2004/2005 avec l'équipe dirigée par le Professeur François Pralong, praticien au service 'Endocrinologie, Diabétologie et Métabolisme' du centre hospitalier de Lausanne. Ce groupe s'intéressait aux

contrôles neuroendocriniens de la reproduction et de l'obésité, et aux interactions dans l'hypothalamus entre les neurones producteurs du neuropeptide Y, de la gonadolibérine et d'un peptide de la famille des peptides RFamide appelé méstaline. La découverte de ce peptide dans le système nerveux central était très récente, et l'objet de notre collaboration, et l'objectif initial de notre travail, était d'en étudier la distribution fine, grâce à un anticorps commercial (anti-hMet, Phoenix Pharmaceuticals) déjà utilisé dans la littérature (Brailoiu *et al.*, 2005) et généreusement offert par l'équipe suisse, avant d'entamer un travail destiné à identifier anatomiquement la nature des relations entre les différents systèmes NPY, GnRH et méstaline.

Cependant, les marquages obtenus avec l'anticorps anti-hMet étaient difficilement conciliables avec certaines données de la littérature, mais suggéraient l'existence d'une population de neurones dont la localisation a éveillé notre intérêt car complémentaire de celle des neurones étudiés par notre groupe dans la 'zone à MCH'. Des investigations ont montré que ces neurones sont producteurs d'un neuropeptide de la même famille que la méstaline, appelé RFRP, mais connu chez d'autres espèces de vertébrés, sous le nom GnIH, pour avoir un effet opposé à la méstaline notamment sur l'axe gonadotrope. Nos travaux ont donc été réorientés sur l'étude de ces neurones producteurs de RFRP afin d'en analyser le développement et certains aspects morphofonctionnels chez le rat, et de comparer ces données à celles obtenues au laboratoire et concernant les neurones à MCH et Hcrt.

L'enchaînement de ces événements est donc reflété dans l'organisation du présent mémoire : après une introduction destinée à présenter les différents peptides d'intérêt et les neurones hypothalamiques qui les produisent, nous exposerons les principaux résultats concernant la distribution du marquage fourni par l'anticorps dirigé contre la méstaline humaine dans l'hypothalamus de vertébrés, avant de présenter nos travaux concernant la distribution, le développement, certaines des connexions des neurones à RFRP et enfin des résultats d'approches plus fonctionnelles.

## **2 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

Les recherches au sein du laboratoire d'histologie, désormais composante de l'équipe EA3922, ont été longuement focalisées sur l'étude du système hypothalamo-hypophysaire avant de s'orienter progressivement vers une approche neuroanatomique de l'organisation morphofonctionnelle de deux populations de neurones hypothalamiques. Ces neurones sont producteurs respectivement de l'hormone de mélanocortine 'MCH' et des peptides hypocrétines/orexines 'Hcr/Orx'.

### **2.1 LES NEURONES DE LA 'ZONE À MCH'**

#### **2.1.1 LES NEURONES À MCH**

La population de neurones à MCH a été initialement décrite chez le rat en 1979 par immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre l'hormone de stimulation des mélanocytes ' $\alpha$ MSH'. Par la suite, de nombreux travaux (Watson et Akil, 1979 ; Daikoku *et al.*, 1985 ; Fellmann *et al.*, 1986, 1987) ont permis d'étudier cette population neuronale, en utilisant un anticorps dirigé contre la MCH de saumon (sMCH) (Nahon *et al.*, 1989 ; Breton *et al.*, 1989). En 1992, les travaux de Bittencourt *et al.* ont confirmé la distribution, déjà observée précédemment, du système MCH dans le diencephale ventral de rat, et en particulier dans l'aire hypothalamique latérale. Cependant, bien que majoritairement retrouvés dans les régions tubérales de l'aire hypothalamique latérale dont la région périfornicale, des corps cellulaires sont aussi localisés dans les aires hypothalamiques médiane et périventriculaire, essentiellement dans la partie postérieure du noyau antérieur, le noyau dorsomédian, la capsule du noyau ventromédian et le noyau périventriculaire. On retrouve enfin une fraction non négligeable de neurones à MCH dans la région rostromédiane de la zona incerta, anatomiquement rattachée au thalamus ventral. Chez des rates en lactation, des neurones exprimant la MCH ont aussi été localisés dans la partie rostrale du noyau paraventriculaire, dans le noyau périventriculaire préoptique et dans la partie

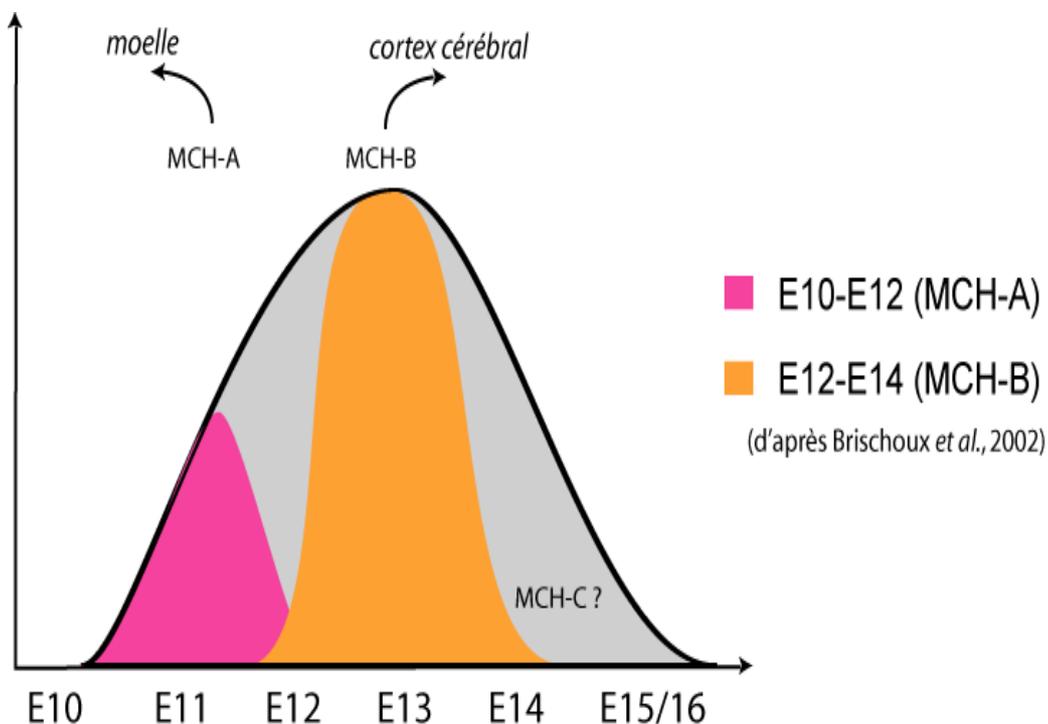
médiane du noyau préoptique médian (Knollema *et al.*, 1992). Depuis, cette observation n'a jamais été confirmée par d'autres travaux. Deux autres territoires d'expression minoritaire du gène de la MCH dans les tubercules olfactifs et le tegmentum dorsal ont aussi été identifiés (Bittencourt *et al.*, 1992 ; Presse *et al.*, 1992).

Les projections MCH ont une distribution diffuse dans l'ensemble du système nerveux central. Ces projections s'étendent des bulbes olfactifs à la moelle épinière (Skofitsch *et al.*, 1985 ; Zamir *et al.*, 1986 ; Bittencourt *et al.*, 1992). Le faisceau médian du télencéphale constitue la voie majeure des projections tant ascendantes que descendantes. Bien qu'une cartographie claire et détaillée de la distribution des fibres à MCH ne soit pas encore réalisée, de nombreuses régions cérébrales sont innervées et suggèrent leur participation dans des fonctions variées. Dans le télencéphale, les aires les plus densément innervées forment le complexe septal médian (noyau du septum médian et noyau de la bandelette diagonale). L'ensemble du manteau cortical, l'amygdale, les noyaux de la strie terminale, le fundus du striatum, le noyau cortical endopiriforme reçoivent une innervation moins dense. Dans le thalamus, les noyaux de la ligne médiane et intralaminaire sont faiblement innervés. Dans le diencéphale ventral, l'aire hypothalamique latérale est densément irriguée. Les noyaux périvericulaire, préoptique antéroventral, arqué et dorsomédian (implication neuroendocrine et viscéromotrice) présentent une innervation beaucoup moins importante. Des fibres sont aussi retrouvées dans l'éminence médiane, majoritairement dans la partie interne, et le lobe postérieur de l'hypophyse. Dans l'hypothalamus postérieur, la partie latérale du noyau mamillaire médian est très irriguée. Dans le mésencéphale, des aires réticulées, le noyau pédonculopontique (locomotion, attention), les noyaux du raphé, l'aire tegmentale ventrale, le noyau géniculé latéral ventral et le colliculus supérieur (polymodal), le colliculus inférieur (audition), la partie médiane du noyau parabrachial (gustation et fonction sensori-viscérale) sont beaucoup moins innervés. De nombreuses études de traçages rétrograde et antérograde ont confirmé l'origine hypothalamique des projections des

neurones à MCH dans le cortex et la moelle épinière (Brischoux *et al.*, 2002), le complexe septal médian (Bittencourt et Elias, 1993, 1998), la substance grise périaqueducule (Elias et Bittencourt, 1997), le noyau mamillaire médian (Casatti *et al.*, 2002) et le noyau parabrachial (Touzani *et al.*, 1993). Cependant, d'un point de vue général, l'organisation, la cartographie détaillée, l'identification des cibles et des trajets des projections des neurones MCH ne sont pas encore clairement définis.

Des études morphofonctionnelles ont suggéré que la population des neurones à MCH n'est pas homogène mais que des sous-populations pourraient être impliquées dans des réponses différentes. Notamment, après avoir reçu un choc osmotique ou une stimulation hormonale, les neurones à MCH répondent différemment selon leur localisation (Presse et Nahon, 1993 ; Murray *et al.*, 2000 ). Plusieurs équipes (Elias et Bittencourt, 1997 ; Bittencourt et Elias, 1998 ; Bayer *et al.*, 1999 ; Bayer, 2000) ont montré, par des techniques de traçage de voies nerveuses, que tous les neurones à MCH n'étaient pas impliqués dans les mêmes circuiteries neuronales, expliquant, selon eux, les différentes réponses physiologiques (voir ci-après). Cependant, ces études ne caractérisaient pas clairement d'éventuelles sous-populations. Par contre, notre équipe a montré qu'au moins deux sous-populations pouvaient être décrites sur la base de l'expression, par ces neurones, d'autres neuropeptides et du récepteur à la neurokinine-3 (NK3). En fait, il fut montré que presque tous les neurones à MCH exprimant le récepteur NK3 expriment également le peptide CART 'cocaine- and amphetamine-regulated transcript' (Griffond *et al.*, 1997 ; Broberger, 1999 ; Vrang *et al.*, 1999 ; Cvetkovic *et al.*, 2003, 2004). Les neurones de ces deux sous-populations se différencient aussi par leurs projections : ceux à MCH+/CART+/NK3- étant à l'origine des projections spinales, alors que ceux co-exprimant les trois molécules sont à l'origine des projections corticales. Cependant, ces deux groupes de cellules sont bien des sous-populations d'une population MCH ; du moins, les résultats obtenus par Brischoux *et al.* (2001) ont montré que tous les neurones à MCH naissent en un pic très large du 10<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jour de

vie embryonnaire à partir du même territoire du neuroépithélium germinatif (Brischoux *et al.*, 2001). Cependant, des études plus poussées de la genèse de ces neurones ont révélé qu'ils étaient en fait générés en une seule vague avec deux pics étroits distincts (Fig 1). La première sous-population MCH-A est générée en un pic étroit à E11 et projette vers la moelle épinière. La seconde, MCH-B, naît en un pic plus large à E13 et projette vers le cortex cérébral (Brischoux *et al.*, 2002). Ceci a renforcé l'hypothèse selon laquelle la population hypothalamique de neurones à MCH est unique mais non homogène. Ces travaux de Brischoux *et al.* confortaient donc l'hypothèse de l'existence d'une aire hypothalamique de distribution des corps cellulaires producteurs de la MCH. Cette régionalisation des neurones à MCH ne respecte pas les structures cytoarchitectoniques bien définies, et est localisée sous forme d'une bande de tissu limitée rostralement et ventralement par le fornix, et postérieurement et dorsalement par le faisceau mamillothalamique.



**Fig 1 :** Diagramme de la neurogenèse des neurones à MCH (en gris). Comparaison des pics de genèse des deux sous-populations MCH-A et MCH-B (d'après Brischoux, 2002).

### 2.1.2 LES NEURONES À HYPOCRÉTINES/OREXINES

Dans cette zone à MCH, de nombreux corps cellulaires producteurs d'autres peptides ont été identifiés : c'est le cas des neurones producteurs des hypocretines/orexines, peptides découverts en 1998 simultanément par deux équipes qui les nommèrent hypocretines-1 et -2 pour De Lecea *et al.* et orexines-A et -B pour Sakurai *et al.*. Ces neurones à hypocretines étaient déjà étudiés avec des anticorps dirigés contre la prolactine ovine. En fait, notre équipe montrait l'année suivante, que les neurones à hypocretines/orexines ne contiennent pas l'ARNm de la prolactine (Risold *et al.*, 1999).

En 1998, Peyron *et al.* ont établi une cartographie précise de la distribution des neurones à Hcr (corps cellulaires et fibres). Les périkaryons sont localisés dans l'aire de distribution des neurones à MCH, exclusivement dans la région tubérale de l'hypothalamus en arrière du noyau paraventriculaire. La majorité des corps cellulaires sont observés dans les aires périfornicales dorsales et latérales de l'hypothalamus. Quelques cellules sont distribuées dans l'aire hypothalamique postérieure ou le noyau dorsomédian.

Ces neurones projettent de façon diffuse dans l'ensemble du système nerveux central, de manière similaire à la population de neurones à MCH. Ainsi, les neurones à hypocretines innervent l'ensemble du manteau cortical. Certaines régions télencéphaliques comme l'amygdale (aire amygdalienne antérieure et noyau central), les noyaux latéral et médian du septum, la bande diagonale de Broca et les noyaux de la strie terminale, sont très innervées. L'hypothalamus est la région diencephalique la plus abondamment innervée. Les projections sont diffuses et abondantes dans les régions préoptiques (aire préoptique médiane, noyaux préoptiques latéral et magnocellulaire). Dans l'hypothalamus antérieur, seuls les noyaux supraoptique et suprachiasmatique ne sont pas innervés. Le noyau antérieur de l'hypothalamus est faiblement innervé. Les noyaux paraventriculaire et dorsomédian, la partie caudale du noyau ventromédian et l'aire hypothalamique latérale sont riches en fibres. Hypothalamus tubéral (noyau arqué),

latéral (région périfornicale) et postérieur (noyaux tubéromamillaire et submamillaire) présentent une forte densité de fibres Hcrt. Le thalamus est peu innervé. Les noyaux central, paraventriculaire, subthalamique et subparafasciculaire et la partie rostrale de la zona incerta sont les structures thalamiques les plus innervées. Enfin, certains noyaux spécifiques du tronc cérébral (noyau du tractus solitaire, locus coeruleus, substance grise périaqueducale, noyau du raphé) contiennent une innervation dense. La moelle épinière présente une innervation homogène et diffuse.

Les travaux d'Amiot *et al.* ont montré par la technique du marquage au BrdU que les neurones à hypocréatine sont générés entre le 11<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire, avec un pic étroit au 12<sup>ème</sup> jour (Amiot *et al.*, 2005). Comparés aux neurones à MCH, la population des neurones à Hcrt est générée en un pic étroit, suggérant que la population puisse être plus homogène. Par ailleurs, ce pic est encadré par les deux pics de genèse des neurones A et B à MCH (fig 2).

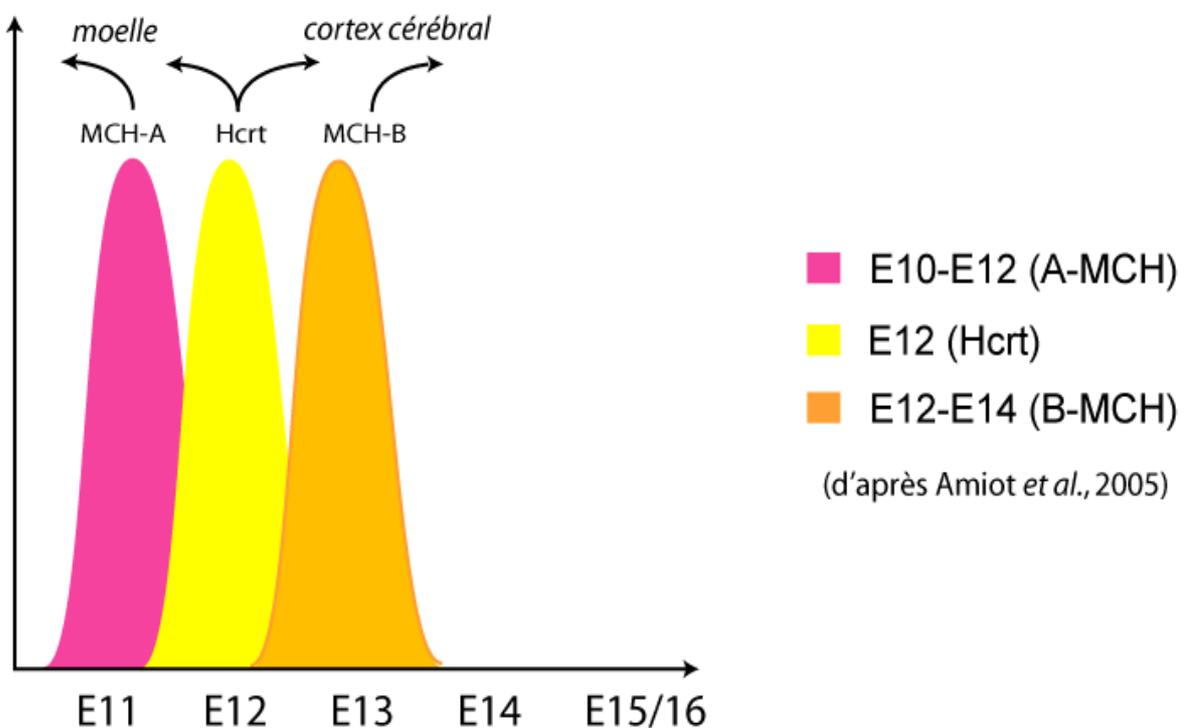
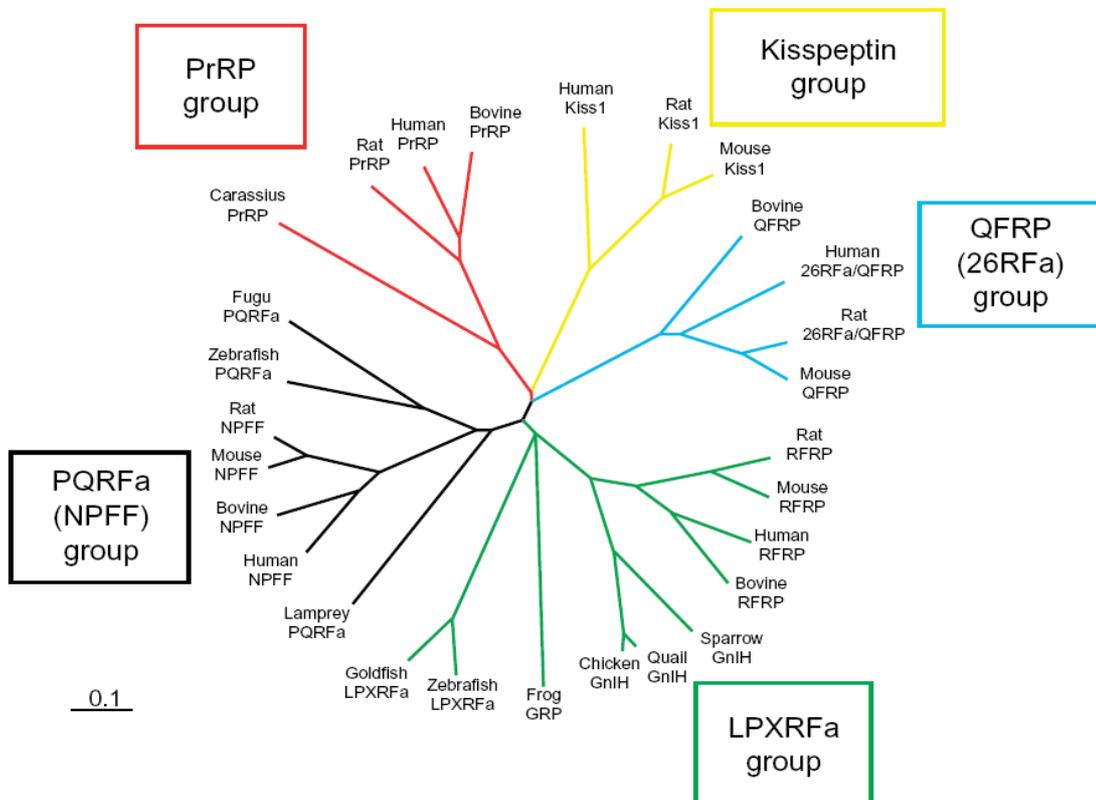


Fig 2 : Diagramme de la neurogenèse de l'hypothalamus. Comparaison des pics de genèse des neurones à MCH et à Hcrt. (d'après Amiot *et al.*, 2005)

## 2.2 LES PEPTIDES RF-AMIDE : DEPUIS FMRF...

Chaque membre de la famille des peptides à RFamide possède à son extrémité C-terminale le motif aminoacidorique Arg (R)-Phe(F)-NH<sub>2</sub>, à l'exception du peptide métastine chez les rongeurs dont la séquence à l'extrémité C-terminale est composée des acides aminés Arg(R)-Tyr(Y)-NH<sub>2</sub>. L'identification des différents peptides et l'analyse de leur structure aminoacidorique à l'extrémité C-terminale indiquent que tous les peptides de la famille RFamide semblent dériver d'un gène ancestral commun. Alors que la séquence à l'extrémité carboxy-terminale est conservée au cours de l'évolution, les peptides à RFamide présentent, au contraire, une diversité remarquable dans la séquence de l'extrémité N-terminale, conférant ainsi les différents embranchements de peptides à RFamide (fig 3) avec un panel d'activités biologiques aussi diverses. A l'heure actuelle, cinq embranchements de la famille des peptides à RFamide sont clairement identifiés : kisspeptides (métastine), QFRP, LPXRFa (RFRP), NPFF et PrRP (Osugi *et al.*, 2006 ; Bechtold et Luckman, 2007).



**Fig 3 :** Arbre phylogénétique non exhaustif des peptides RFamide chez les mammifères et autres vertébrés. La barre d'échelle fait référence à une distance phylogénétique de substitutions de 0,1 acide aminé par site. (Bechtold et Luckman, 2007).

### 2.2.1 GÉNÉRALITÉS

L'histoire de la famille des peptides RFamide a débuté avec l'identification en 1977 du premier membre composé de quatre acides aminés, appelé FMRF 'Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>' (Price et Greenberg, 1977). Ce térapeptide a été isolé des ganglions du mollusque *Macrocallista nimbosa*. FMRF présentait une importante activité cardioexcitatrice. En 1980, Boer a démontré l'existence du peptide FMRF dans le système nerveux central de différentes espèces. Cette découverte a suggéré l'existence d'autres peptides de la famille à RFamide dans la totalité du règne animal, mais surtout la mise en évidence, pour la première fois, du rôle du peptide FMRF en tant que neuromédiateur/neurotransmetteur (Boer *et al.*, 1980). Cependant, dès 1981, la spécificité des anticorps dirigés contre le peptide FMRF est remise en cause. Des études d'immunohistofluorescence sur le système nerveux central de rat ont été réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre une forme (Met-Enképhaline-Arg-Phe) de la Met-enképhaline structurellement proche du peptide FMRF (tableau 1) : le marquage obtenu n'était pas si différent de celui fourni par l'anticorps anti-FMRF. Le marquage était dû au fait que les anticorps utilisés reconnaissaient tout peptide ayant la séquence Arg-Phe-NH<sub>2</sub> à leur extrémité C-terminale (Weber *et al.*, 1981).

PEPTIDE	SÉQUENCE	ESPÈCE
FMRF	<b>FMRF</b>	Nombreuses espèces (dont rat)
Met-Enképhaline	YGGFM	rat
Met-Enképhaline-Arg-Phe	YGG <b>FMRF</b>	rat

Tableau 1 : Comparaison des séquences des peptides FMRF et Met-Enképhaline du rat. Identification des réactions croisées apportées par les anticorps utilisés (d'après Weber *et al.*, 1981).

Dès lors, cette notion d'aspécificité reconnue a été considérée comme outil pour l'identification d'autres peptides à RFamide. En 1983, ces anticorps ont permis à l'équipe de Dockray de mettre en évidence, chez le poulet, un pentapeptide (LPLRF) constituant la partie C-terminale de la forme longue de la Met-enképhaline et dont l'activité biologique n'a pas été corrélée avec celle de la Met-Enképhaline (Dockray *et al.*, 1983). En 1985, Yang *et al.* ont mis en évidence un rôle

de peptides similaires à FMRF, dans l'analgésie induite par la Met-enképhaline ou la morphine, activité biologique différente de l'activité initialement reconnue au peptide FMRF (Yang *et al.*, 1985a). Cette activité dans l'anti-nociception opioïde a permis l'identification de deux peptides RFamide composés de 8 et 12 acides aminés (les neuropeptides NPF et NPAF/NPSF) (Yang *et al.*, 1985b). La même année, les travaux de Kavaliers ont mis en avant l'action de FMRF dans l'inhibition de la prise alimentaire induite soit par la restriction alimentaire soit par la morphine (Kavaliers *et al.*, 1985). Cette nouvelle découverte a été déterminante pour les recherches de l'implication d'autres peptides RFamide dans une multitude de voies physiologiques, et en particulier les voies relatives aux fonctions liées à la reproduction et à la lactation, avec la découverte par Aarnisalo *et al.* et par Hinuma *et al.* en 1998 de l'activité respective des peptides NPF et PrRP 'prolactin-releasing peptide' sur la sécrétion de la prolactine (Aarnisalo *et al.*, 1997 ; Hinuma *et al.*, 1998). Hinuma *et al.* ont aussi identifié les récepteurs de peptides appelés chez l'homme, peptides RFRP (hRFRP-1, hRFRP-2 et hRFRP-3). Les récepteurs de ces peptides, composés de 7 domaines transmembranaires et couplés aux protéines G, sont appelés récepteurs OT7T022. Ils présentent une très forte homologie de structure avec le récepteur de la prolactine et avec la famille de récepteurs au neuropeptide Y (Hinuma *et al.*, 2000). Le NPY est un peptide ayant une séquence aminoacidique en C-terminal très proche de celle des RFamide, puisqu'il s'agit du motif Arg(R)-Tyr(Y)-NH<sub>2</sub>.

Un grand nombre de peptides RFamide ont été identifiés à travers le règne animal, vertébré ou non. Dans le génome du nématode *Caenorhabditis elegans*, par exemple, il a été reporté plus de 50 peptides RFamide encodés par 20 gènes (Li *et al.*, 1999). Cependant, chaque espèce peut présenter un nombre variable de peptides RFamide. En 2000, seulement 2 gènes encodant des peptides RFamide étaient identifiés chez les mammifères. A l'heure actuelle, de nombreux peptides RFamide identifiés initialement chez certaines espèces ont trouvé un homologue chez au moins une autre espèce.

Lors de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux embranchements des peptides du groupe LPXRF (où X représente soit la leucine L, soit la glutamine Q) et des kisspeptines dont l'implication dans le contrôle de l'axe gonadotrope a fait l'objet de très nombreux travaux.

### 2.2.2 LES NEURONES MÉTASTINERGIQUES

En 1999, Lee *et al.* travaillaient sur la pharmacologie des récepteurs à la galanine dans le cerveau de rat, quand ils ont isolé l'ADN complémentaire et identifié le gène d'un récepteur couplé aux protéines G, appelé rGPR54. Il présente une très forte ressemblance (45% d'homologie) avec la famille de gènes des récepteurs de la galanine. Par les techniques d'hybridation *in situ*, l'étude de la distribution dans le système nerveux central a été réalisée. Il est majoritairement exprimé dans les noyaux amygdaliens (noyaux cortical et médian de l'amygdale) et hypothalamiques (noyaux antérieur, dorsomédian et arqué, aire hypothalamique latérale). L'ARNm GPR54 est aussi retrouvé dans le tronc cérébral (colliculus supérieur, substance grise périaqueducule et noyau parabrachial). En 2001, trois groupes distincts vont identifier, de façon fortuite, le ligand naturel de ce récepteur. Ohtaki *et al.* vont, en 2001, identifier chez l'homme, un récepteur couplé aux protéines G, appelé hOT7T175, et liant le peptide isolé de placenta humain et ayant un effet inhibiteur de métastases de mélanomes malins humains, d'où son nom métastine (ou Kisspeptine 'KiSS' ; Lee *et al.*, 1996). Ce récepteur présente une très forte homologie de séquence avec GPR54. La même année, un autre récepteur humain couplé aux protéines G et activé par le peptide KiSS, est découvert : hAXOR12 qui présente 81% d'homologie de séquence aminoacidorique avec le récepteur GPR54 (Muir *et al.*, 2001). Toutes ces fortes homologies de séquences indiquent que les récepteurs hOT7T175, hAXOR12 et rGPR54 sont homologues. Ils sont distribués dans de nombreux territoires cérébraux (cortex, amygdale, hippocampe, hypothalamus, tronc cérébral et hypophyse) et les tissus périphériques (placenta, pancréas et foie). D'autres ligands du récepteur GPR54 vont être identifiés par l'équipe de Kotani en 2001.

Ces peptides dérivent d'un précurseur commun de 145 acides aminés et sont respectivement composés de 54, 14, 13 et 10 acides aminés (Fig 4). Ils sont tous encodés par le gène KiSS-1 et vont être désormais appelés kisspeptines (Kotani *et al.*, 2001). Les kisspeptines humaines possèdent à leur extrémité C-terminale, le motif très conservé de 10 acides aminés YNWNSFGLRF-NH<sub>2</sub>. C'est cette séquence qui est responsable de l'interaction avec le récepteur et donc, de l'activité biologique du peptide. La kisspeptine-10 (composée des 10 derniers acides aminés du précurseur) est un limitateur de l'invasion des trophoblastes villosus dans la paroi utérine humaine pendant la grossesse, en particulier pendant le 1<sup>er</sup> trimestre (Janneau *et al.*, 2002 ; Bilban *et al.*, 2004 ; Terao *et al.*, 2004). Ceci a conforté le rôle de la métastine dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Lee et Welch, 1997 ; Harms *et al.*, 2003). Chez la souris, des travaux (Stafford *et al.*, 2002) ont montré un homologue des kisspeptines humaines dont la séquence ne différait que d'un seul acide aminé : la dernière phénylalanine (...RF-NH<sub>2</sub>) en C-terminale est substituée par une tyrosine (...RY-NH<sub>2</sub>).

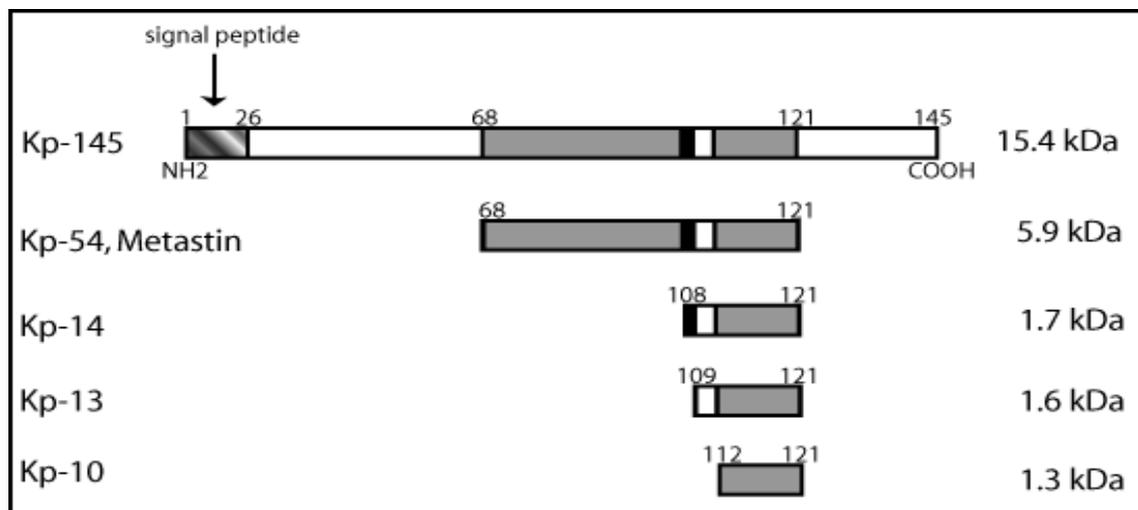


Fig 4 : Représentation schématique des peptides métastinergiques produits à partir du précurseur de 145 acides aminés, la prépro-métastine Kp-145 (d'après Bilban *et al.*, 2004)

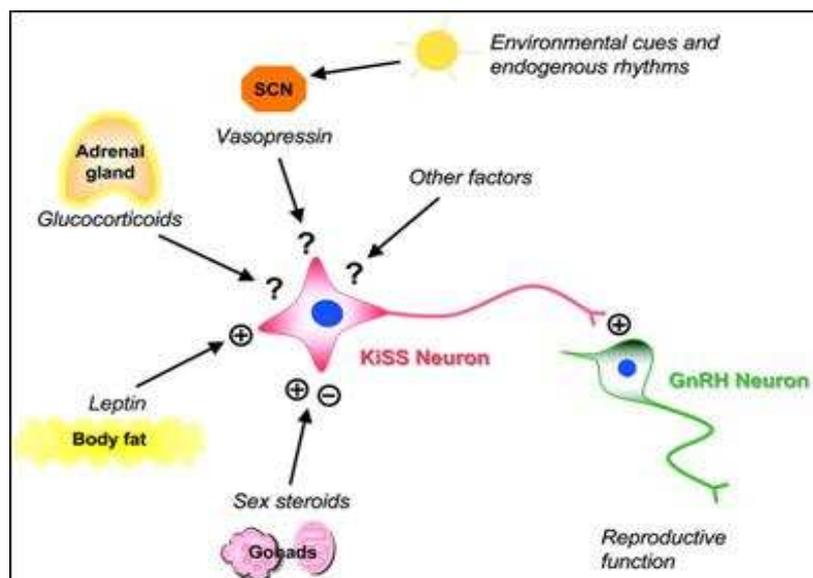
Chez l'homme, l'ARNm des kisspeptines est retrouvé abondamment dans le système nerveux central (hypothalamus et ganglions de la base) et les structures périphériques (placenta). Dès 2003, de nombreux travaux se sont orientés vers un rôle des kisspeptines dans les fonctions neuroendocrines, en particulier sur le contrôle de l'axe gonadotrope (Funes *et al.*, 2003). Chez

l'homme, des études ont été menées en 2003 par De Roux *et al.* dans une famille consanguine de 8 enfants dont 5 étaient atteints d'hypogonadisme hypogonadotrope, déficience de la sécrétion hypophysaire en hormones FSH 'follicle-stimulating hormone' et LH 'luteinizing hormone'. Chez ces patients atteints, une mutation dans le gène codant pour le récepteur GPR54 était observée (De Roux *et al.*, 2003). Cette mutation conduit à un récepteur non fonctionnel, ne pouvant lier les kisspeptines, à l'origine d'un retard de puberté et d'un désordre de la fonction de la reproduction. La kisspeptine-54, plus communément appelée métastatine, et son récepteur ont donc été pressentis pour être les gardiens de l'initiation de la puberté.

L'équipe de Seminara a confirmé ces précédents travaux, sur des souris invalidées pour le gène du récepteur GPR54 (Seminara *et al.*, 2003). L'axe gonadotrope est gouverné par l'hormone de libération de la gonadotropine 'GnRH'. Les travaux de Gottsch *et al.* ont démontré que les kisspeptines et leur récepteur étaient impliqués dans un circuit hypothalamique gouvernant l'axe neuroendocrine de la reproduction. Cette équipe a révélé la distribution de l'ARNm KiSS dans les territoires hypothalamiques impliqués dans la régulation de la sécrétion de la gonadotropine, avec une localisation massive dans les noyaux antéroventral périventriculaire, périventriculaire et arqué. D'autres cellules ont également été observées dans le noyau préoptique antérodorsal. De rares corps cellulaires ont été repérés dans les noyaux de l'amygdale et de la strie terminale (Gottsch *et al.*, 2004a). Une étude immunohistochimique a concerné la distribution des neurones métastinergiques dans le cerveau de rat. Les périkaryons marqués sont distribués essentiellement dans le noyau arqué, le noyau dorsomédian, le noyau paraventriculaire et le noyau du tractus solitaire. Les fibres immunoréactives sont localisées dans le cerveau entier, avec une plus grande densité dans le noyau de la strie terminale, les parties ventrale et dorsale du noyau latéral du septum, les noyaux arqué, dorsomédian et parastrial de l'hypothalamus, les noyaux habénulaire et paraventriculaire du thalamus, la substance grise périaqueducule et les noyaux parabrachial et du tractus solitaire (Brailoiu *et al.*, 2005).

La même année, le groupe de Messenger a montré que les projections des neurones à GnRH localisées dans l'éminence médiane exprimaient à leur surface le récepteur à la métastine. Ceci a suggéré une implication directe de cette dernière sur la sécrétion de la GnRH et a confirmé l'hypothèse émise simultanément par De Roux et Seminara : le système métastine/GPR54 est indispensable pour l'initiation de la puberté et la régulation du cycle estrien (Messenger, 2005 ; Messenger *et al.*, 2005 ; Seminara, 2005 ; Seminara et Kaiser, 2005).

Cette distribution a soulevé un certain nombre d'hypothèses. Le noyau arqué contient d'autres cellules producteurs d'autres peptides comme le NPY, le AgRP 'Agouti-Related Peptide', le peptide CART, le peptide POMC 'proopiomélanocortine' précurseur des peptides  $\alpha$ -MSH et  $\beta$ -endorphine, et le peptide GALP 'galanine-like peptide' (Gottsch *et al.*, 2004b). Ces peptides sont des acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie métabolique mais ont également des effets importants sur la sécrétion de GnRH (Kalra *et al.*, 1998). Ils sont régulés par les hormones du métabolisme via les capillaires fenestrés perméables aux facteurs circulants (leptine, insuline et hormone thyroïdienne) (Shahab *et al.*, 2005 ; Fernández-Fernández *et al.*, 2006 ; Tena-Sempere, 2006b) (Fig 5).



**Fig 5 :** Schéma illustrant les facteurs régulant l'activité de la métastine (Dungan *et al.*, 2006).

Chez des rats dont le métabolisme est perturbé (diabète), l'expression de la métastine est altérée. Des injections de leptine mais pas d'insuline sont suffisantes pour restaurer une expression normale (Castellano *et al.*, 2006b ; Hauge-Evans *et al.*, 2006). De plus, l'administration de métastine à des rats atteints d'une mutation du récepteur à la leptine provoque la sécrétion de la gonadotropine LH (Seminara, 2006). La compilation de ces données indique que la métastine agit de façon indépendante des taux de leptine et autres facteurs. Le système métastinergique est aussi soumis aux influences des hormones stéroïdiennes (Irwig *et al.*, 2004 ; Navarro *et al.*, 2004 ; Kinoshita *et al.*, 2005). L'expression des gènes KiSS-1 et du récepteur GPR54 est maximale lors du passage à la puberté. Elle est aussi variable chez la femelle adulte où le maximum d'expression est observé en diestrus du cycle estrien. La métastine joue un rôle majeur dans le déclenchement de l'ovulation (Kinoshita *et al.*, 2005 ; Castellano *et al.*, 2006c). Chez le mâle comme chez la femelle, testostérone et œstradiol inhibent l'expression de la métastine des neurones localisés dans le noyau arqué mais stimulent celle des neurones du noyau antéroventral périventriculaire. Ces considérations indiquaient un rétrocontrôle de la sécrétion de la métastine par les hormones sexuelles, négatif dans le noyau arqué et positif dans le noyau antéroventral périventriculaire (Smith *et al.*, 2005a, 2005b ; Popa *et al.*, 2005 ; Dungan *et al.*, 2006 ; Franceschini *et al.*, 2006 ; Gottsch *et al.*, 2006) (Fig 6).

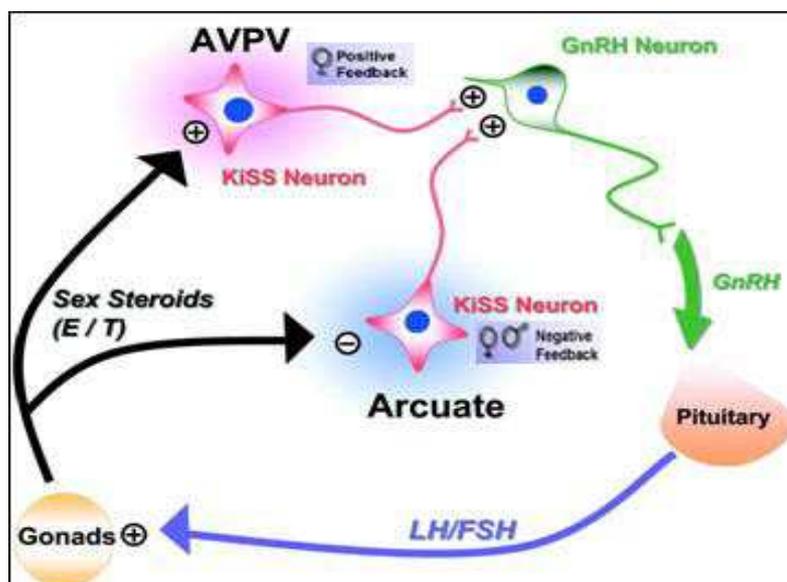


Fig 6 : Schéma illustrant la régulation fine de l'axe gonadotrope (Dungan *et al.*, 2006).

Des rats à l'approche de la puberté présentent une plus grande sensibilité à des injections de métastine pour la sécrétion de LH. Un certain dimorphisme sexuel est aussi observé dans cet effet : les femelles y sont plus sensibles. Cependant, le système métastinergique influence les neurones sécrétant la GnRH davantage par un interneurone que par action directe (Castellano *et al.*, 2006a ; Nazian, 2006). Clarkson et Herbison ont montré que les noyaux antéroventral périventriculaire et périventriculaire contenaient plus de neurones métastinergiques chez les femelles que chez les mâles (Clarkson et Herbison, 2006 ; Kauffman *et al.*, 2007). Or, seules les femelles sont soumises à des variations hormonales avec le cycle estrien. Ainsi, il est sensé de supposer que les neurones métastinergiques des noyaux antéroventral périventriculaire et périventriculaire ne sont pas seulement impliqués dans l'initiation de la puberté mais aussi dans le cycle estrien pour la génération de la décharge préovulatoire de GnRH de façon dépendante des taux basaux de GnRH et sous l'influence des estrogènes (Smith *et al.*, 2006a, 2006b ; Roa *et al.*, 2006 ; Tena-Sempere, 2006a ; Adachi *et al.*, 2007 ; Maeda *et al.*, 2007 ; Smith et Clarke, 2007 ; Yamada *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2008).

### 2.2.3 LES NEURONES À RFRP

Les peptides RFRP 'RFamide-related peptides' appartiennent à une autre sous-famille des peptides RFamide. Chez les mammifères, les peptides RFRP sont dénommés ainsi de par leur séquence aminoacidique LPXRF 'Leucine-Proline-X-Arginine-Phénylalanine', où X représente soit la leucine L, soit la glutamine Q. Chez les oiseaux, le peptide RFRP possède un homologue dit GnIH 'gonadotropin-inhibitory hormone', d'après son implication physiologique dans l'inhibition de la libération de la gonadotropine.

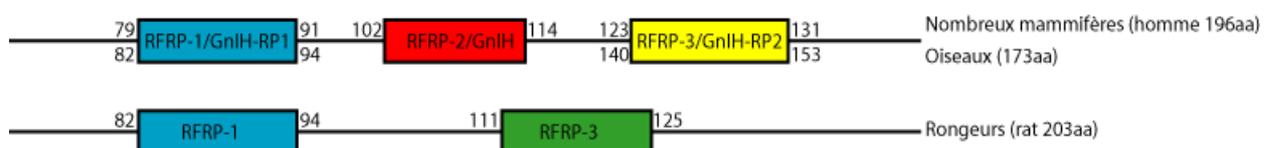


Fig 7 : Représentation schématique des différents peptides RFRP/GnIH matures produits à partir du précurseur prépro-RFRP/GnIH de différentes espèces.

Leur découverte est récente, puisque la première mise en évidence de l'existence de ces peptides RFRP/GnIH remonte à l'année 2000 (Hinuma *et al.* ; Tsutsui *et al.*). La majeure partie des principales études fonctionnelles a été réalisée chez les oiseaux. L'équipe de Tsutsui a été la première à mener ces travaux avec la mise en évidence du premier dodécapeptide aviaire ayant une extrémité C-terminale identique à celle des peptides RFRP isolé chez les mammifères (Tsutsui *et al.*, 2000). En fait, chez les oiseaux comme chez les mammifères, plusieurs peptides matures sont générés à partir d'un précurseur (Fig 7). Chez les oiseaux, Satake *et al.* ont caractérisé ces peptides matures dénommés GnIH, GnIH-RP1 'GnIH-related peptide 1' et GnIH-RP2 'GnIH-related peptide 2'. L'analyse des séquences aminoacidiqes des extrémités C-terminales des 3 peptides GnIH a fait apparaître de très grandes similitudes avec celles des peptides RFRP des mammifères : GnIH, GnIH-RP1, RFRP-1 et RFRP-2 ont une extrémité C-terminale LPLRF-NH<sub>2</sub>, alors que GnIH-RP2 et RFRP-3 ont la séquence LPQRF-NH<sub>2</sub> (Satake *et al.*, 2001). Les cellules contenant l'ARNm de ces peptides sont localisées dans le diencephale des oiseaux, en particulier dans le noyau paraventriculaire. Des fibres immunoréactives étaient retrouvées dans la couche externe de l'éminence médiane, ce qui a suggéré l'hypothèse du rôle de ce peptide dans le contrôle du système hypothalamo-hypophysaire chez les oiseaux, et plus spécifiquement sur la sécrétion de la gonadotropine et de la prolactine. En fait, chez les oiseaux, ce peptide n'exerçait un rôle que dans l'inhibition de la sécrétion de la gonadotropine, et a dès lors été appelé GnIH 'gonadotropin-inhibitory hormone'.

De plus, la régulation de la sécrétion de la gonadotropine chez les oiseaux a été démontrée par des mesures des taux d'expression du précurseur GnIH à différents temps de vie embryonnaire. Ubuka *et al.* ont montré que l'ARNm du précurseur était exprimé dès le 10<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire et son taux augmentait jusqu'à l'éclosion de l'œuf. Bien qu'exprimé dès E10 dans certains corps cellulaires du noyau paraventriculaire, aucune fibre immunoréactive n'est observée dans l'éminence médiane. Les premières sont observées à E17, ce qui signifie que les neurones GnIH positifs n'acquièrent leur fonction biologique qu'à l'approche de l'éclosion

(Ubuka *et al.*, 2003). Dès 2005, chez les oiseaux, un contrôle de la régulation du système GnIH par la mélatonine a été montré (Ubuka *et al.*, 2005). L'expression de GnIH est photopériodiquement régulée : elle est accrue en période de jour court correspondant à une durée allongée de sécrétion de mélatonine par la glande pinéale et les yeux. Dans le noyau paraventriculaire, les neurones exprimant le peptide GnIH expriment également un sous-type du récepteur à la mélatonine, Mel<sub>1c</sub> (Ubuka *et al.*, 2005 ; Tsutsui *et al.*, 2007). Ceci a suggéré une activité des neurones GnIH sous l'influence des rythmes circadiens, et variable selon les saisons (Leska et Dusza, 2007 ; Revel *et al.*, 2008 ; Gibson *et al.*, 2008). Un rôle direct de GnIH sur les gonades, à l'origine du contrôle négatif sur l'axe gonadotrope, a été suspecté (Bentley *et al.*, 2008). En effet, des injections de GnIH inhibaient la libération de gonadotropine et induisaient une régression testiculaire associée à une réduction de l'activité spermatique des testicules et une suppression du maintien du plumage adulte, chez des oiseaux. Ainsi, le peptide GnIH a un rôle sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique mais aussi un rôle sur les caractères sexuels secondaires (Ubuka *et al.*, 2006, 2008b). Cette observation a suggéré que les taux de gonadotropines circulantes étaient directement et inversement corrélés avec les taux de GnIH hypothalamiques au cours du développement : un faible taux de GnIH permettrait une activité positive de l'axe gonadotrope avec un développement normal des caractères sexuels secondaires. Enfin, l'effet inhibiteur de GnIH sur l'axe reproducteur semblait aussi corrélé avec l'environnement : en effet, il a été montré que le stress induit par la capture provoquait chez des oiseaux, une augmentation des taux de GnIH (Calisi *et al.*, 2008) (Fig 8).

Le peptide GnIH présente une très forte homologie de séquence en C-terminal avec NPFF, un peptide RFamide ayant une activité dans la prise alimentaire (Panula *et al.*, 1996). Un certain nombre d'études se sont donc intéressées à un éventuel rôle de GnIH dans la prise alimentaire. Tachibana *et al.* ont été les premiers à montrer un effet orexigénique de GnIH indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire et des stéroïdes sexuels. Chez des oiseaux placés en restriction alimentaire, une augmentation d'appétit a été observée de façon concomitante à une

réduction de l'activité sexuelle, alors que cet effet n'était pas observé chez des oiseaux élevés en conditions normales. Cet effet a été corrélé à l'action du peptide orexigène NPY, et observé en conditions physiologiques extrêmes (Tachibana *et al.*, 2004, 2005, 2008).

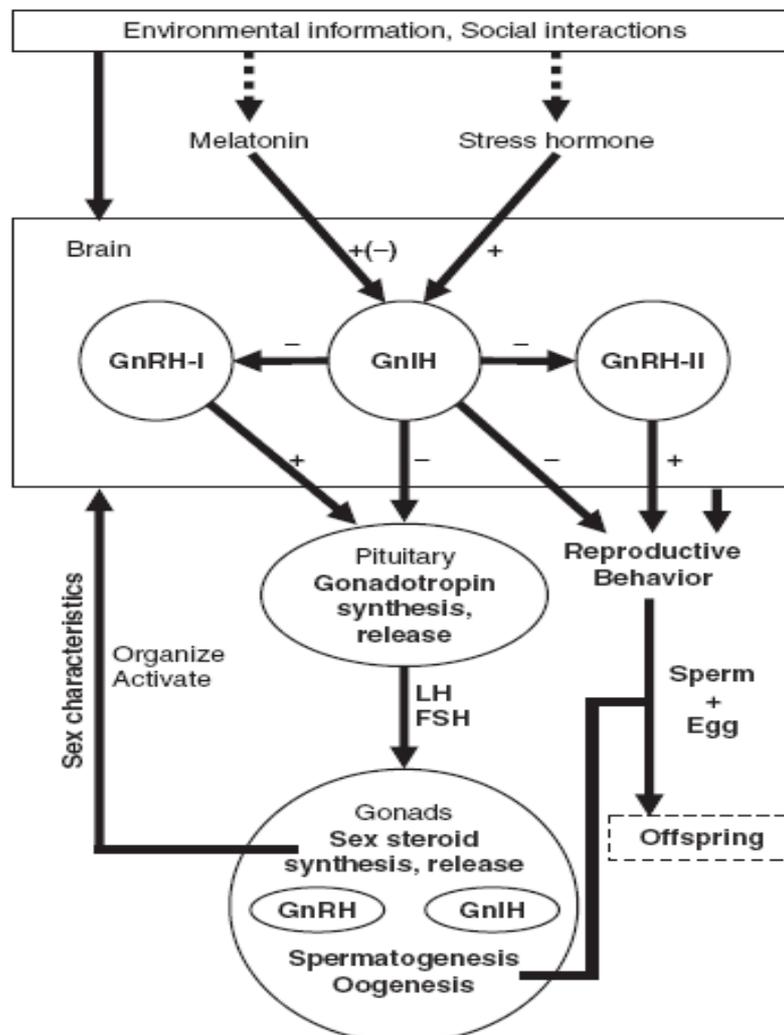


Fig 8 : Représentation schématique des mécanismes d'action/adaptation potentiels des neurones à GnIH dans le contrôle de l'axe gonadotrope et du comportement. (Ubuka *et al.*, 2008).

Les peptides GnIH possèdent des homologues chez les mammifères, appelés RFRP d'après leur séquence aminoacidique en C-terminal. Ainsi, un grand nombre de travaux se sont intéressés à la localisation et aux fonctions des peptides RFRP chez les mammifères. La première mise en évidence de l'existence de ces peptides RFRP a eu lieu la même année mais juste avant leurs homologues aviaires (Hinuma *et al.*, 2000). En effet, Hinuma *et al.* ont identifié, à partir de bases de données, un ADN complémentaire chez l'homme qui encode une préproprotéine à l'origine de 3 peptides hRFRP-1, hRFRP-2 et hRFRP-3 (Fig 7). Les récepteurs OT7T022 de ces peptides

ont dès lors été isolés (Hinuma *et al.*, 2000). A partir des peptides synthétiques, cette équipe a montré l'existence de peptides RFRP chez d'autres espèces, bœuf, rat et souris. Les précurseurs prépro-RFRP ont une taille variable, de 188 acides aminés chez la souris à 203 acides aminés chez le rat. Les 3 peptides isolés chez l'homme ne sont pas tous présents chez d'autres espèces, plus particulièrement le peptide mature RFRP-2 absent chez le rat et la souris. Chez le rat, l'ARN messager codant pour RFRP a été mis en évidence dans deux territoires, l'œil et l'hypothalamus, et plus particulièrement dans le noyau périventriculaire et entre les noyaux dorsomédian et ventromédian (Hinuma *et al.*, 2000 ; Fukusumi *et al.*, 2001). L'aire de distribution des neurones contenant l'ARNm RFRP s'étend jusque dans l'aire hypothalamique latérale. Chez la souris, les neurones RFRP-positifs sont localisés dans le noyau dorsomédian, l'olive supérieure latérale et le noyau du tractus solitaire (Ukena et Tsutsui, 2001).

Dans le noyau périventriculaire, des neurones dopaminergiques sont présents et impliqués dans le contrôle de la sécrétion de la prolactine : 74% d'entre eux expriment également le récepteur aux peptides RFRP. L'équipe d'Hinuma a montré que les peptides RFRP étaient impliqués dans la régulation de la prolactine d'une façon différente de la régulation par PrRP. RFRP-1 ne stimulait pas directement la sécrétion de prolactine mais altérait la libération de dopamine dans le système-porte hypothalamo-hypophysaire (Samson *et al.*, 2003). Cette donnée était en accord avec les travaux réalisés par l'équipe de Koda chez la grenouille. En effet, cette équipe a été la première en 2002 à isoler le premier peptide RFRP chez la grenouille, fGRP 'frog GH-releasing peptide', localisé essentiellement dans l'aire septale médiane, l'aire préoptique et le noyau suprachiasmatique. Des fibres immunoréactives sont localisées dans l'éminence médiane, suggérant un rôle dans la libération des hormones hypophysaires (gonadotropines, prolactine et hormone de croissance) sans présenter de dimorphisme sexuel (Koda *et al.*, 2002 ; Ukena *et al.*, 2002, 2003 ; Osugi *et al.*, 2004). Basée sur les recherches précédentes avec les différents rôles potentiels des peptides RFRP, une étude s'est intéressée plus particulièrement au peptide RFRP-3 qui partage une très forte homologie de séquences en C-terminal avec le peptide GnIH

et aussi avec un autre peptide de la famille RFamide appelé NPF ‘neuropeptide FF’. Ce dernier est impliqué dans la modulation de la douleur (Liu *et al.*, 2001, Pertovaara *et al.*, 2005) et la régulation de la prise alimentaire (Panula *et al.*, 1996). Les équipes de Yoshida d’un côté, et de Yano de l’autre côté, ont démontré en 2003 que les peptides RFRP-3 et NPF étaient exprimés dans des populations différentes de neurones et impliqués dans des voies fonctionnelles différentes (Yano *et al.*, 2003 ; Yoshida *et al.*, 2003). Ainsi, des peptides avec des séquences très proches exerçaient un rôle différent selon des espèces différentes.

En 2006, l’équipe de Kriegsfeld a été la première à clairement identifier et localiser le système RFRP chez les mammifères, précisément chez le hamster. Elle a établi une cartographie détaillée des cellules contenant le peptide RFRP. Les corps cellulaires étaient concentrés exclusivement dans le noyau dorsomédian. Les fibres RFRP-positives étaient distribuées dans tous les territoires où sont concentrés les neurones et les fibres à GnRH, à savoir le septum médian, la bande diagonale de Broca, l’aire préoptique et l’hypothalamus antérieur (et plus particulièrement dans le noyau arqué). Cette distribution suggérait donc un rôle direct des neurones RFRP sur les neurones à GnRH. Cette étude a aussi montré que 40% des neurones à RFRP exprimaient également le récepteur aux estrogènes ER $\alpha$ . C’était la première fois qu’un rôle des neurones RFRP dans les fonctions neuroendocrines était établi chez les mammifères. Des injections du peptide RFRP inhibaient la libération de LH médiée par les neurones à GnRH, ce qui suggérait également un rôle neuroendocrine direct sur l’hypophyse (Anderson *et al.*, 2005). De plus, ce rôle était sous l’influence des hormones sexuelles (Kriegsfeld, 2006 ; Kriegsfeld *et al.*, 2006 ; Bentley *et al.*, 2006a, 2006b ; Maddineni *et al.*, 2008 ; Murakami *et al.*, 2008 ; Smith *et al.*, 2008 ; Ubuka *et al.*, 2008a) et associé au développement des caractères sexuels secondaires (Johnson *et al.*, 2007) : le peptide RFRP-3 était responsable des différentes actions sur les systèmes liés à la reproduction et à l’homéostasie métabolique. Son rôle semblait primordial dans l’inhibition de l’axe reproducteur liée à des états pathologiques du métabolisme (obésité ou cachexie).

### 3 BUT DU TRAVAIL : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les travaux présentés dans ce mémoire sont nés d'une collaboration avec le Pr F. Pralong du centre hospitalier de Lausanne, et dont le but était l'étude de la distribution de la méstaline, membre de la famille des peptides à RFamide. L'équipe du Pr Pralong s'intéressait à la caractérisation du rôle des récepteurs au NPY dans le contrôle de l'axe gonadotrope après injection de leptine à des souris invalidées pour le récepteur Y1 (Pralong *et al.*, 2002). L'intérêt suscité par cette collaboration s'est accru lorsque nous nous sommes rendus compte que le peptide méstaline était possiblement présent dans des neurones bordant la 'zone à MCH'. Nous devions dans un premier temps réaliser une cartographie détaillée du peptide méstaline et de son ARNm dans le cerveau de rat, en utilisant l'anticorps dirigé contre la méstaline humaine (hMet) et commercialisé par Phoenix Pharmaceuticals. Ce travail était le préalable à une étude plus importante destinée à comprendre les interactions entre les systèmes NPY, méstaline et GnRH dans l'hypothalamus, notamment pour l'initiation de la puberté. Puis chez des animaux NPY1<sup>-/-</sup>, il était proposé d'analyser les causes du retard de la puberté (Pralong *et al.*, 2002) et de vérifier l'intégrité du système méstalinergique chez ces animaux mutants. Deux événements imprévus nous ont conduits à réorienter notre problématique de recherche. Le premier est que les résultats initialement observés par l'équipe du Pr Pralong concernant le retard de puberté des animaux NPY1<sup>-/-</sup> n'ont pas été retrouvés. L'explication a été une dérive génétique de la lignée. Le second est que la cartographie obtenue présentait une très forte homologie avec la distribution d'un autre peptide de la famille RFamide, RFRP/GnIH, réalisée par l'équipe de Kriegsfeld en 2006 sur le cerveau de hamster en utilisant un anticorps dirigé contre le peptide GnIH d'oiseau. Et un certain nombre de confusions sont apparues : comment une population de neurones peut-elle exprimer deux peptides de la même famille et dont les actions sont opposées ? Ainsi, il nous est apparu essentiel de vérifier dans un premier temps si les neurones producteurs du peptide méstaline, rapporté dans la littérature pour son activité activatrice de la reproduction, produisaient également le peptide RFRP à action opposée. Un certain nombre de travaux ont été menés en

utilisant un anticorps commercial dirigé contre la métastine humaine (hMet). Des interactions croisées de l'anticorps hMet sont apparues avec d'autres peptides de la famille RFamide, et notamment avec RFRP, de par leur extrémité C-terminale très proche. Très peu de données concernant une distribution rigoureuse de ce peptide étaient disponibles dans la littérature. Tout ceci nous a ainsi conduits à réaliser une cartographie précise et spécifique de la distribution de l'ARNm RFRP.

Par ailleurs, les travaux parallèlement menés au laboratoire concernent l'organisation anatomique et l'ontogenèse de deux populations de neurones respectivement productrices des peptides MCH 'melanin-concentrating hormone' et hypocréatine/orexine. L'aire de distribution de MCH ou 'zone à MCH' est assez étendue, des territoires les plus latéraux jusqu'aux territoires les plus proches du troisième ventricule. Par comparaison, les neurones à RFRP sont observés occupant des territoires les plus médians de ce que nous appelons la 'zone à MCH'. Ainsi le projet de ma thèse a été réorienté afin de tenter de caractériser cette nouvelle population de neurones vis-à-vis des neurones à MCH et à Hcrt, d'en étudier le développement ontogénétique, d'identifier certaines de leur innervation potentielle et de vérifier l'implication de ces neurones dans des réponses expérimentales en rapport avec leur aire de distribution et leurs connexions.

Le développement de la population de neurones à RFRP a été réalisé par des injections de bromo-désoxyuridine (BrdU) à des femelles à différents temps de gestation. Le BrdU est un analogue de l'uridine qui s'incorpore à l'ADN des cellules en phase S du cycle cellulaire. Combiné à des techniques d'hybridation *in situ* pour RFRP, le BrdU a permis de suivre la neurogenèse de ces neurones. Dans le même temps, des études d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des cerveaux d'embryons (E18 à E20) et de jeunes rats (P0 à P15) pour suivre l'évolution de la distribution des corps cellulaires à RFRP, c'est-à-dire déterminer le stade d'acquisition du phénotype chimique définitif.

Enfin, des études par la technique de traçage des voies nerveuses ont été menées afin d'identifier certaines des connexions (afférences et efférences) des neurones à RFRP, et des variations des taux d'ARNm RFRP ont été recherchées par RT-PCR semi-quantitative chez des animaux soumis à un stress aigu ou à une privation de nourriture.



**MATÉRIELS**  
**ET**  
**MÉTHODES**



# **1 MATÉRIELS D'ÉTUDES ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES**

## **1.1 ANIMAUX**

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des rats de la souche « Long-Evans » (laboratoires Charles River). Les animaux ont été élevés dans des conditions d'éclairage standard (cycle 12 h jour / 12 h nuit) avec boisson et nourriture à volonté.

### **1.1.1 DIFFÉRENTS TYPES DE MATÉRIEL ANIMAL**

Les études histologiques ont été effectuées sur des rats adultes mâles (n=15) pesant 250 à 300 g ou femelles (n=6) dont le stade du cycle estrien a été déterminé par frottis vaginal (voir ci-après).

Les études de développement ont été réalisées à partir des fœtus issus de femelles gestantes (n=6), depuis le 18<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire (E18) jusqu'à la naissance, et sur des rats nouveau-nés (n=10) depuis leur premier jour de vie (P0) jusqu'à leur sevrage (P30).

Les études fonctionnelles ont nécessité l'utilisation de rats mâles adultes pesant 250 à 300g (n=33) répartis en 4 lots expérimentaux :

- « contrôle » (nourriture et boisson à volonté) (n=9)
- « confinement » (cage de confinement pendant 3 h) (n=13)
- « restriction alimentaire » (pas de nourriture pendant 48 h) (n=6)
- « réalimentation » (réalimentation de 3h après restriction alimentaire de 48h) (n=5)

### **1.1.2 DÉTERMINATION DU STADE DU CYCLE ESTRIEN**

Le cycle de la rate est un cycle court de 4 jours, caractérisé par une polyovulation et composé de 4 stades. Chaque stade est caractérisé par des types cellulaires particuliers (Fig 9), observables

après coloration de Harris-Shorr (Shorr, 1941 ; Papanicolaou, 1942). La kératinisation cellulaire s'observe grâce à des techniques de colorations différentielles basées sur des variations d'affinité tinctoriale des cellules.

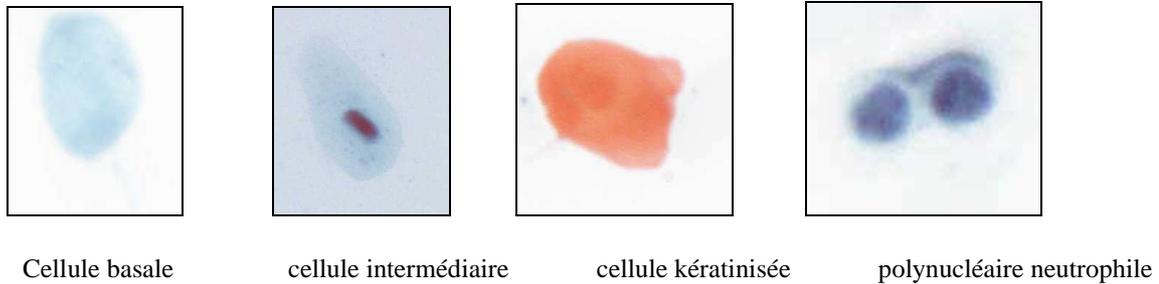


Fig 9 : Photographies des différents types de cellules présents dans des frottis vaginaux après coloration de Harris-Shorr au cours des stades du cycle estrien chez la rate.

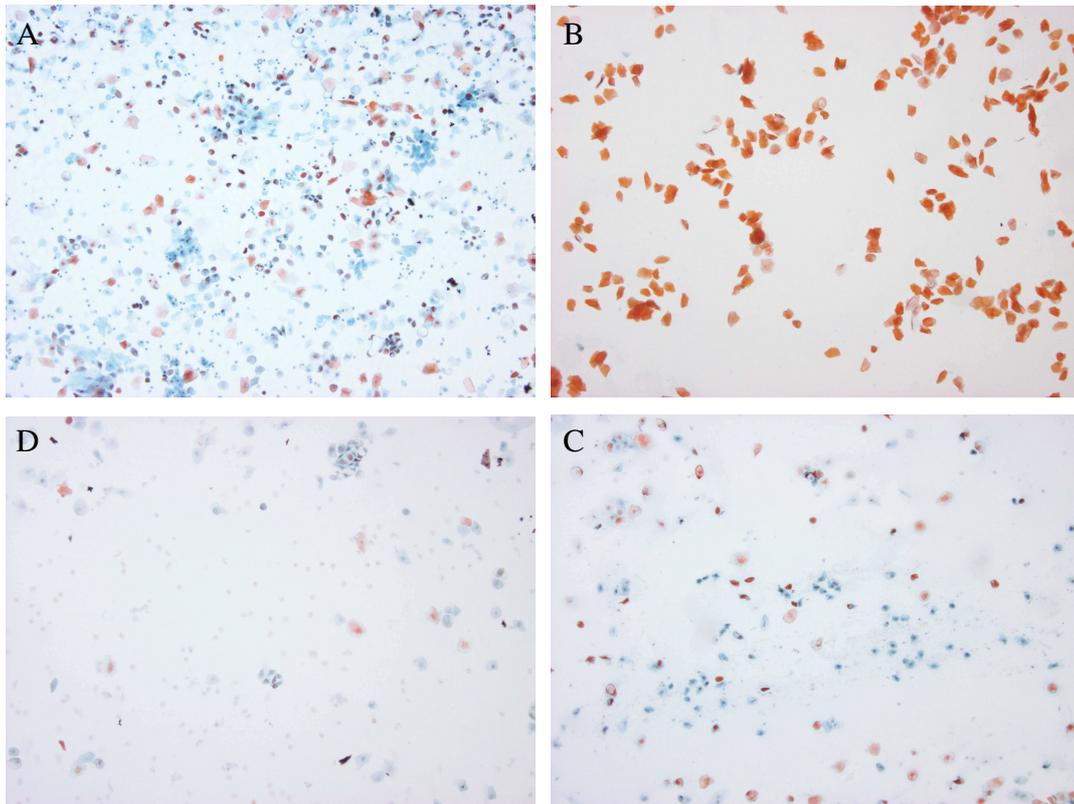
On peut donc facilement distinguer les 4 phases du cycle estrien (Fig 10), d'après la taille, la forme et la couleur des cellules :

- proestrus (Fig 10, A) : c'est à ce stade que le pic d'estrogènes est observé. Le frottis est dominé par la présence de grosses cellules basophiles (cellules basales) et de cellules intermédiaires. En début de phase, quelques cellules polynucléaires neutrophiles peuvent être observées. En fin de phase, quelques cellules kératinisées apparaissent.

- œstrus (Fig 10, B) : l'ovulation a lieu à ce stade. Le frottis est composé d'un nombre très important de cellules kératinisées acidophiles.

- diestrus 1 ou metestrus (Fig 10, C) : c'est la formation du corps jaune. Les cellules basales et les cellules polynucléaires neutrophiles réapparaissent. Quelques cellules intermédiaires de petite taille sont observées.

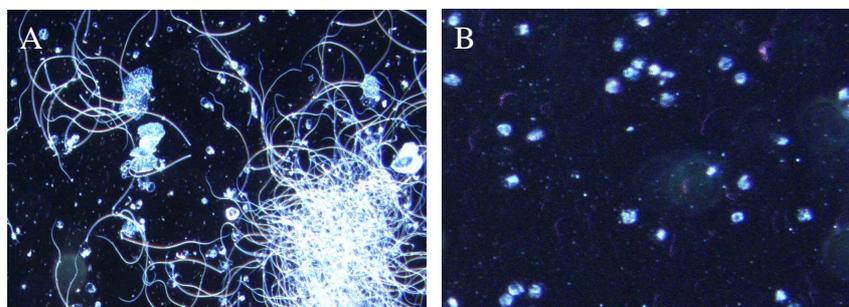
- diestrus 2 (Fig 10, D) : le frottis est pauvre en cellules. C'est le stade de 'repos sexuel'. On retrouve de petites cellules intermédiaires, quelques cellules basales et quelques polynucléaires neutrophiles.



**Fig 10 :** Photographies de frottis vaginaux après coloration de Harris-Shorr au cours des 4 stades du cycle estrien chez la rate.

### 1.1.3 DÉTERMINATION DES STADES FCETAUX

Les stades foetaux ont été déterminés par frottis vaginal (Fig 11). Les femelles sont placées avec les mâles le soir, et le frottis est réalisé le lendemain matin : la présence de spermatozoïdes indique que la femelle est à son premier jour de gestation noté E0 ; les foetus étant dans leur premier jour de développement embryonnaire. Les femelles sont placées de nouveau avec les mâles le soir-même si le frottis du matin s'est révélé négatif.



**Fig 11 :** Photographies de frottis vaginaux positif (A) et négatif (B). À noter la présence de spermatozoïdes en A.

## **1.2 TISSUS HUMAINS**

Les tissus humains utilisés proviennent de collections obtenues lors de précédents travaux (Brischoux *et al.*, 2002). Ils ont été obtenus, lors d'autopsies réalisées par l'intermédiaire du Dr Viennet, praticien hospitalier au laboratoire « Anatomie Pathologie » du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. Les prélèvements ont été réalisés, entre 1997 et 1999, sous la responsabilité du service hospitalier concerné et dans le respect des procédures réglementaires en vigueur en France.

Les tissus sont deux hypothalamus prélevés 10 h 30 et 11 h après les décès d'une femme âgée de 30 ans et décédée d'une hémorragie hépatique suite à un accident de voiture, après deux jours d'hospitalisation, et d'un homme âgé de 77 ans et décédé d'un cancer généralisé.

## **2 MÉTHODES DE FIXATION DES CERVEAUX**

### **2.1 FCETUS**

Une anesthésie profonde des femelles gestantes est réalisée par une injection intrapéritonéale d'une solution d'hydrate de chloral\* 7% (dose létale de 1mL pour 200g de poids corporel). La cavité abdominale est incisée de façon à en extraire les cornes utérines. Ces dernières sont déposées dans des boîtes de Pétri contenant une solution physiologique, afin d'extraire et de dégager les embryons de leurs enveloppes. Les embryons sont alors décapités et seules les têtes sont fixées par immersion dans une solution de paraformaldéhyde\* (PFA) 1% dans du tampon phosphate\* 0,1M pendant 24 h à 4°C.

## **2.2 NOUVEAU-NÉS ET JEUNES RATS**

Les nouveau-nés et les jeunes rats (jusqu'à P5) sont décapités sans anesthésie. Les cerveaux sont extraits délicatement des boîtes crâniennes et fixés par immersion dans une solution de PFA 1% dans un tampon phosphate 0,1M pendant 24 h à 4°C.

## **2.3 RATS ADULTES**

Les rats adultes (depuis le stade postnatal P30) sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une solution d'hydrate de chloral 7%. La cage thoracique est incisée et le cœur est dégagé. L'oreillette droite et le ventricule gauche sont fendus. Une canule est introduite à l'intérieur du ventricule jusqu'à remonter dans l'aorte ascendante. Une solution physiologique est injectée à l'aide d'une pompe péristaltique pour rincer le réseau vasculaire. Les tissus dont le cerveau sont alors fixés par la perfusion d'une solution de paraformaldéhyde PFA 1%. Une fois fixé, le cerveau est extrait délicatement de la boîte crânienne de l'animal et post-fixé toute la nuit dans le même fixateur.

## **2.4 HYPOTHALAMUS HUMAINS**

Les hypothalamus fraîchement prélevés ont été immergés immédiatement dans le liquide de Bouin\* pour être fixés pendant 4 jours. Chaque hypothalamus a été découpé en deux demi-hypothalamus symétriques de part et d'autre du troisième ventricule.

# **3 PRÉPARATION DU MATÉRIEL HISTOLOGIQUE**

## **3.1 COUPES AU CRYOSTAT (HYPOTHALAMI DE RAT)**

Après la postfixation, les cerveaux ont été immergés dans une solution cryoprotectrice de saccharose\* 15% dans du tampon phosphate 0,1M pendant 24 h à 4°C. Ils ont ensuite été

congelés dans la glace carbonique et stockés à -40°C jusqu'à la coupe au cryostat. Enfin, ils ont été débités en coupes sériées de 10µm d'épaisseur, récupérées sur lames gélatinées qui sont conservées à -40°C jusqu'à leur utilisation.

### **3.2 COUPES FLOTTANTES AU SLICER (HYPOTHALAMI DE RAT)**

Les cerveaux ont été traités comme décrit dans le paragraphe précédent. Les cerveaux sont découpés en trois blocs (antérieur, central et postérieur). Après congélation, chaque bloc a été débité au slicer en quatre séries de coupes frontales de 30µm d'épaisseur. Les coupes sont plongées dans des boîtes alvéolées contenant une solution de PBS simple/glycérol/éthylène glycol (2V/1V/1V) pour leur conservation au froid (-20°C). Les coupes sont rincées dans une solution de PBS simple avant leur utilisation.

### **3.3 COUPES A LA PARAFFINE (HYPOTHALAMI HUMAINS)**

Après 4 jours de fixation dans le liquide de Bouin, les demi-hypothalami sont déshydratés par des passages successifs dans des bains d'éthanol de titre croissant (1 bain à 70°, 2 bains à 95° et 3 bains à 100°) et de deux bains de butanol. L'inclusion des blocs a été réalisée dans la paraffine (Paraplast®) selon les techniques histologiques classiques (Martoja et Martoja-Pierson, 1967). Les blocs ont ensuite été débités en coupes frontales de 5-7µm d'épaisseur, étalées sur lames recouvertes d'eau gélatinée sur platine chauffante ( $T^{\circ} < 50^{\circ}\text{C}$ ). Les lames ont ensuite été séchées en étuve (40°C) pendant au moins une nuit et conservées à température ambiante au sec jusqu'à leur utilisation.

#### **4 COLORATION AU BLEU DE TOLUIDINE 1%**

La coloration des coupes adjacentes aux coupes traitées en immunohistochimie et/ou hybridation *in situ* permet l'analyse de la cytoarchitecture du tissu afin de faciliter la localisation des différentes populations de neurones immunoréactifs d'intérêt.

Le bleu de toluidine est un colorant de la chromatine, des nucléoles et des corps de Nissl. Les coupes sont plongées dans deux bains successifs d'eau distillée pour dissoudre les sels. Des bains d'alcool de titre croissant (95°, 100° et 100°) sont réalisés pour la déshydratation des coupes, avant d'être délipidisées dans trois bains successifs de xylène. Les coupes sont réhydratées dans des bains d'alcool décroissant puis d'eau distillée avant d'être plongées dans le colorant bleu de toluidine à 1% pendant 20 s. L'excès de colorant est éliminé dans des bains d'eau distillée. La coloration est différenciée dans des bains successifs d'alcool 70° et 95° contenant éventuellement quelques gouttes d'acide acétique ; la qualité de la différenciation est déterminée de façon subjective. Après avoir été déshydratées dans des bains d'alcool 100° et de xylène, les coupes sont montées de façon permanente dans la résine naturelle baume du Canada.

#### **5 INJECTION DE 5-BROMO-2'-DESOXYURIDINE**

Le 5-Bromo-2'-désoxyUridine (BrdU) est un analogue de l'uridine qui s'intègre, par substitution à la thymidine endogène, à l'ADN des cellules en division lors de la phase S du cycle cellulaire, et ce pendant le laps de temps de 30 min à 2 h suivant son injection par voie intrapéritonéale. Il est dès lors possible de déterminer la date de naissance ou de dernière mitose des neurones concernés en suivant par détection immunohistochimique, la concentration en BrdU dans les noyaux des neurones l'ayant incorporé.

Des femelles gestantes (entre E11 et E16) ont subi une injection intrapéritonéale d'une solution de BrdU préparée selon la méthode décrite par Markakis et Swanson (1997) [150mg de BrdU (Sigma) par kg de poids corporel, dissout dans une solution de NaOH 0,07M chauffée à 65°C].

## 6 TRAÇAGE DES VOIES NERVEUSES

Fluorogold (FG). Ce marqueur fluorescent de type rétrograde est incorporé par les terminaisons axonales des neurones et va s'accumuler dans les corps cellulaires. Dans notre étude, ce traceur a été injecté par voie vasculaire afin d'identifier les neurones projetant dans l'éminence médiane.

Les animaux ont été anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine\* (Imalgene<sup>®</sup> 1000, Merial) et de xylozine\* (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer). Ensuite, ils ont reçu une injection de 700µL de solution de FG (4mg/700µL) dans les veines jugulaire ou fémorale. Après 10 jours de survie, les animaux traités ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une solution d'hydrate de chloral 7%. Les cerveaux prélevés ont été fixés dans une solution de PFA 1%, comme décrit précédemment (paragraphe 2.3).

Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L, Vector). Ce marqueur est un traceur intra-axonal antérograde qui est capté au niveau des corps cellulaires des neurones et des dendrites puis transporté jusque dans les terminaisons nerveuses.

Les animaux traités ont été anesthésiés par une injection intramusculaire d'un mélange de kétamine\* (Imalgene<sup>®</sup> 1000, Merial) et de xylozine\* (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer), et placés dans un appareil de stéréotaxie. Les coordonnées stéréotaxiques des sites d'injection ont été déterminées d'après l'atlas de PAXINOS et WATSON (2<sup>ème</sup> édition, 1986). La peau du crâne des animaux est incisée ainsi que le périoste pour laisser apparaître la boîte crânienne. Le point de référence

Bregma est alors visible. Une première ouverture de la boîte crânienne est réalisée 6 mm en avant du bregma pour mettre en évidence le point correspondant au 0 antéropostérieur matérialisé par la dépression entre le cortex préfrontal et les bulbes olfactifs. Cette première fenêtre est indispensable pour une prise de coordonnées stéréotaxique très précise. Une seconde fenêtre est ouverte autour du point correspondant à l'emplacement de la coordonnée stéréotaxique recherchée. La dure-mère y est incisée pour permettre l'insertion d'une micropipette contenant le traceur suivant les coordonnées d'injection calculées (antéropostériorité, latéralité et profondeur). L'injection est réalisée de façon iontophorétique selon le mécanisme 7s ON / 7s OFF à 5 $\mu$ A pendant 20 min.

Après l'injection, l'animal est replacé dans sa cage jusqu'à sa récupération pendant 15 jours, temps nécessaire pour le transport du PHA-L. Ensuite, l'animal est anesthésié par une solution d'hydrate de chloral 7%. Le cerveau est alors fixé par une solution de PFA 1% selon la méthode décrite précédemment (paragraphe 2.3).

La qualité des marquages antérograde et rétrograde a été réalisée par observation de coupes sériées de cerveau (cryostat) au microscope à fluorescence (Olympus BX51). La localisation précise des neurones ayant internalisé le traceur a été déterminée par l'observation des coupes voisines colorées au bleu de toluidine.

## **7 TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHEMIE**

### **7.1 ANTICORPS UTILISÉS**

Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le tableau 2.

<b>Anticorps</b>	<b>Antigène</b>	<b>Dilution</b>	<b>Origine</b>	<b>Référence</b>
Métastine hMet	C-terminal (10 derniers aa) Métastine humaine	1/500	Phoenix Pharmaceuticals, Belmont (CA)	Brailoiu <i>et al.</i> , 2005
Métastine KP10 (lot #564) (lapin)	C-terminal (10 derniers aa) Métastine de souris	1/4000	Dr Caraty, laboratoire Physiologie de la reproduction et des comportements, Tours (Fr)	Franceschini <i>et al.</i> , 2006
Métastine (lot #254) (souris)	C-terminal (17 derniers aa) Métastine de rat	0,5µg/mL	Dr Maeda, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya (Jp)	Kinoshita <i>et al.</i> , 2005
MCH (lapin)	MCH de saumon	1/200	Laboratoire d'histologie, Besançon (Fr)	Risold <i>et al.</i> , 1989
Hcrt/Orex-A (chèvre)	Orexine-A (Hcrt) humaine	1/400	Santa Cruz Biotechnology	Cvetkovic <i>et al.</i> , 2004
BrdU (souris)	Uridine	1/50	Becton Dickinson	Brischoux <i>et al.</i> , 2001
TH (lapin)	TH pure isolée de phéochromocytome de rat	1/400	Institut Jacques Boy, Reims (Fr)	Labatut <i>et al.</i> , 1988
LHRH (lapin)	GnRH	1/3000	Laboratoire d'histologie, Besançon (Fr)	Bugnon <i>et al.</i> , 1976
SRIF	somatostatine	1/200	Laboratoire d'histologie, Besançon (Fr)	Fellmann D., 1978

Tableau 2 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.

## 7.2 MÉTHODES D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Les coupes réalisées au cryostat et conservées à  $-40^{\circ}\text{C}$  sont réhydratées dans du tampon phosphate contenant 0,3% de Triton X100 (PBS-Triton\*) pendant 10 min à température ambiante. Les coupes à la paraffine doivent être déparaffinées et réhydratées avant toute utilisation. Pour cela, elles sont plongées dans trois bains successifs de xylène (qui solubilise la paraffine) et 4 bains d'éthanol de titre décroissant (2 bains à 100%, 1 bain à 95% et 1 bain à 70%) de 10 à 15 min chacun. Elles sont ensuite lavées pendant 1 h à l'eau courante et finalement perméabilisées dans une solution de PBS-Triton pendant 15 min.

Les coupes sont ensuite incubées une nuit à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité, avec l'anticorps primaire à la dilution et dans le diluant appropriés. Les anticorps polyclonaux sont préparés dans un diluant contenant des lactoprotéines afin de saturer les sites de liaison aspécifique, alors que les anticorps monoclonaux sont préparés dans du PBS-Triton.

Les coupes sont ensuite rincées deux fois 10min dans du PBS-Triton avant d'être incubées 1 h à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité, en présence de l'anticorps secondaire conjugué au fluorochrome approprié à la dilution de 1/400. Finalement, les coupes sont rincées puis montées dans une solution de PBS-Triton/glycérine (V/V) pour permettre leur observation en microscopie à fluorescence.

Pour les coupes flottantes, le protocole précédent est légèrement modifié. Le temps d'incubation avec l'anticorps primaire est de 48 h sous agitation. L'anticorps secondaire est incubé toute la journée sous agitation. Anticorps primaires et secondaires sont beaucoup plus dilués que pour les coupes sur lames (cas de l'anticorps anti-KP10 dilué au 1/4000 pour coupes sur lame et 1/8000 pour coupes flottantes). Les coupes sont ensuite rincées toute la nuit dans une solution de PBS simple avant d'être montées sur lame et séchées.

### **7.3 METHODE AUX COMPLEXES PEROXYDASE-ANTIPEROXYDASE**

Cette technique est découpée en trois phases. La première étape (incubation avec l'anticorps primaire) ne diffère pas de la méthode de l'immunofluorescence indirecte. Après avoir été incubées toute la nuit (coupes au cryostat) ou 48 h (coupes au slicer) avec l'anticorps primaire, les coupes sont rincées dans deux bains de PBS-Triton pendant 10 min chaque bain. L'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin non conjugué (dilué au 1/200) est ensuite déposé et incubé sur les coupes pendant 1 h (coupes au cryostat) à température ambiante ou toute la journée sous agitation (coupes au slicer). Les coupes sont ensuite rincées dans trois bains successifs de PBS simple avant d'être incubées avec les complexes peroxydase-antiperoxydase (dilués au 1/200) pendant 1 h (coupes au cryostat) ou toute la nuit sous agitation (coupes au slicer). Des rinçages dans des bains de PBS simple sont nécessaires afin d'éliminer l'excès de complexes PAP non fixés. La dernière étape de cette méthode concerne la révélation par la précipitation d'un dérivé oxydé de la diaminobenzidine (DAB). Les lames sont plongées dans une solution de PBS contenant 0,05% de DAB, à laquelle est ajouté au dernier moment 0,01% d'eau oxygénée, substrat de la peroxydase. Le contraste des préparations est accru par passage très bref dans une solution d'acide osmique ( $\text{OsO}_4$ ) à 0,01%. Lorsque le marquage est jugé satisfaisant après observation au microscope, les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 30 min, déshydratées dans des bains d'éthanol de titre croissant (70%, 95%, 2x100%) pendant 3 min chacun, avant d'être montées au baume du Canada.

### **7.4 DÉTECTION DU BRDU**

Le protocole classique d'immunohistochimie décrit précédemment a été modifié pour la détection du BrdU. En effet, le BrdU incorporé à l'ADN est localisé dans le compartiment nucléaire. Un démasquage des sites antigéniques nucléaires moins accessibles aux anticorps est donc nécessaire.

Ce démasquage est réalisé par hydrolyse acide dans une solution d'HCl\* 1N à 65°C pendant 5 min. Les coupes sont ensuite rincées dans du tampon PBS simple\* deux fois 10 min à température ambiante. Une perméabilisation des coupes est réalisée dans un bain contenant du PBS-Triton pendant 30 min. Enfin, les coupes sont mises à incuber dans l'anticorps primaire anti-BrdU toute la nuit. Le marquage est révélé par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps secondaire d'âne anti-souris conjugué à la cyanine 3 (DAM-CY3, dilué au 1/400).

## **7.5 MÉTHODES DE DOUBLE MARQUAGE**

Cette technique est basée sur la combinaison de deux techniques d'immunodétection permettant la mise en évidence de colocalisations de marquage (peptides, récepteurs,...) au sein d'une même cellule ou la juxtaposition des marquages dans un territoire commun mais dans des cellules différentes (mise en évidence de plusieurs populations de neurones, relation entre des fibres nerveuses et des corps cellulaires de deux populations neuronales différentes,...). Les protocoles sont les mêmes mais les anticorps primaires -pour la recherche des différents antigènes- doivent être issus d'espèces différentes, et les fluorochromes conjugués aux anticorps secondaires sont différents.

## **7.6 OBSERVATIONS, ACQUISITIONS ET TRAITEMENT DES IMAGES**

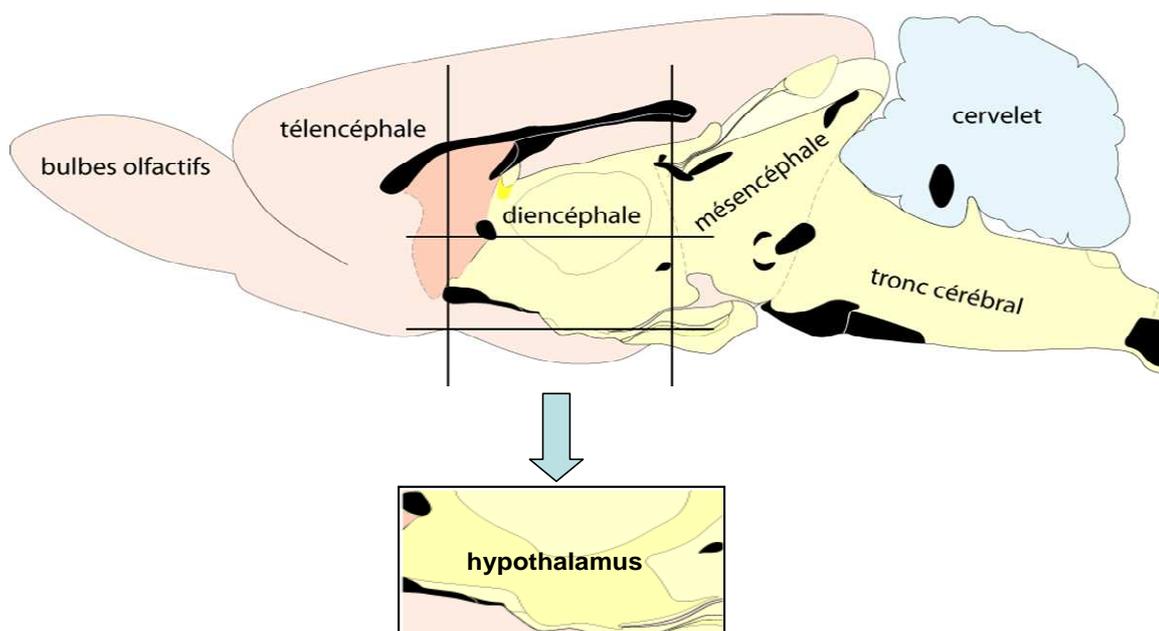
L'observation des coupes par fluorescence a été réalisée grâce au microscope Olympus BX51 associé à la caméra Olympus DP50 et à la source de fluorescence Olympus U-RFL-T. L'acquisition des images a été effectuée avec le logiciel AnalySIS<sup>®</sup> 5.1 (Soft Imaging System). Les images ont ensuite été importées dans les logiciels Adobe Illustrator<sup>®</sup> et Adobe Photoshop<sup>®</sup> pour le traitement (amélioration du contraste).

## 8 TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 8.1 CONSTRUCTION ET SYNTHÈSE DES RIBOSOMES rRFRP, rMET ET sMET

#### 8.1.1 PRÉLÈVEMENT DES CERVEAUX ET EXTRACTION DES ARN TOTAUX HYPOTHALAMIQUES

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été immédiatement prélevés par exérèse, et l'hypothalamus isolé par 2 sections frontales, rostrale au niveau du chiasma optique et caudale au niveau des corps mamillaires, par une section horizontale au niveau de la commissure blanche antérieure, et par 2 sections sagittales au niveau des sillons hypothalamiques latéraux (fig 12).



**Fig 12 :** Représentation schématique de la dissection de l'hypothalamus sur une coupe sagittale médiane de cerveau de rat.

Les hypothalami obtenus sont placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL contenant 1 mL d'une solution dénaturante de Trizol afin de chélater le maximum de protéines dans le broyat. Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 5 min puis centrifugés à 12000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et les ARN totaux sont extraits par 0,2 volume de

chloroforme. Après incubation à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 15 min à 4°C. A la phase aqueuse récupérée, est ajouté le même volume d'isopropanol : les ARN sont précipités à température ambiante pendant 10 min. Les ARN totaux précipités sont culotés par centrifugation à 12000g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'ARN obtenu est séché à température ambiante, lavé dans une solution d'éthanol 70° et centrifugé à 7500g pendant 5 min à 4°C. Le culot d'ARN est séché à température ambiante et repris dans 50µL d'eau ultrapure stérile toute la nuit à 4°C.

### **8.1.2 DOSAGE DES ARN TOTAUX D'HYPOTHALAMUS DE RAT**

Les ARN totaux en solution sont dosés après dilution au 1/100 et 1/200 dans de l'eau ultrapure stérile. Le rapport d'absorbance  $A_{260}/A_{280}$  est un indicateur de la pureté des ARN extraits : s'il est inférieur à 1.8, alors des protéines ont été prélevées après l'incubation dans le chloroforme. Les ARN totaux sont stockés sous forme d'aliquot à la concentration de  $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

### **8.1.3 TRANSCRIPTION INVERSE DES ARN TOTAUX (RT-PCR OU 'REVERSE-TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION')**

Avant de réaliser la transcription inverse des ARN, un aliquot de 1µg (soit 1µL) est dénaturé dans 12µL d'eau ultrapure stérile à 72°C pendant 10 min. Le milieu réactionnel pour une transcription inverse possède la composition suivante :

4µL de tampon de réaction 5X (M-MLV Buffer, Promega)
1µL d'hexamères aléatoires pd(N) <sub>6</sub> 100µM (Pharmacia)
1µL d'un mélange des 4 dNTP 25mM (Roche)
0.8µL d'inhibiteur de ribonucléase 40U.µL <sup>-1</sup> (RNAsin <sup>®</sup> , Promega)
0.2µL d'enzyme Moloney Murine Leukemia Virus RNase H 200U.µL <sup>-1</sup> (M-MLV, Promega)
13µL de solution d'ARN dénaturés

La transcription inverse est réalisée pendant 1h à 42°C, après que les hexamères aléatoires se soient hybridés aux ARN pendant 10 min à 23°C. La transcription inverse est stoppée par incubation pendant 5 min à 95°C provoquant l'inactivation de l'enzyme M-MLV et la déshybridation des hétéroduplex ADNc/ARN.

#### 8.1.4 AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE L'ADNC D'INTÉRÊT (PCR OU 'POLYMERASE CHAIN REACTION')

Avant de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADNc, la sélection d'amorces spécifiques de ce fragment doit être rigoureusement effectuée. Dans notre étude, nous avons pu amplifier différents fragments correspondant à l'ARNm de différents précurseurs de pré-protéines de rat. Les protéines étudiées et les amorces pour l'amplification de l'ARNm du précurseur sont répertoriées dans le tableau suivant :

Prépro	Amorce sens	Amorce anti-sens
rRFRP	5'-GTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTT-3'	5'-GCCCCTTGAAGGACTGGCTGGAGG-3'
rMet	5'-GAGAGCAAGCCTGGGGCTGCAGGA-3'	5'-CGAAGGAGTTCCAGTTGTAGG-3'
sMet	5'-GCGGTATGCAGAGAGCAAGC-3'	5'-CGAAGGAGTTCCAGTTGTAGG-3'

A l'aide de ces amorces sélectives, nous avons pu amplifier un fragment d'ADNc de 353pb correspondant aux nucléotides 247-599 de l'ARNm du précurseur de la préproRFRP de rat (rRFRP), un fragment d'ADNc de 184pb correspondant aux nucléotides 163-346 de l'ARNm du précurseur de la préproMétastine de rat (rMet) et un fragment d'ADNc de 194pb correspondant aux nucléotides 176-369 de l'ARNm du précurseur de la préproMétastine de souris (sMet, offerte par le Pr Pralong).

Le milieu réactionnel (kit Roche) pour une réaction de polymérisation en chaîne est composé de la façon suivante :

2 $\mu$ L de tampon de réaction 10X
3 $\mu$ L de MgCl <sub>2</sub> 25mM
1 $\mu$ L d'un mélange des 4 dNTP 10mM chacun
0.2 $\mu$ L d'enzyme <i>Taq</i> Polymérase 5U. $\mu$ L <sup>-1</sup>
1 $\mu$ L du couple d'amorces 10 $\mu$ M chacun
10.8 $\mu$ L d'eau ultrapure stérile
2 $\mu$ L de produit de RT-PCR

Les amplifications enzymatiques sont réalisées dans le thermocycleur PTC-200 (MJ-Research) en suivant la programmation en 3 étapes :

- une phase à 94°C pendant 3 min pour l'activation de l'enzyme *Taq* polymérase
- 35 cycles, chacun composé d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 s, d'une phase d'hybridation à 65°C pendant 30 s, et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 1 min 30 s
- une phase d'achèvement des processus d'élongation en cours à 72°C pendant 10 min

### **8.1.5 MIGRATION DES PRODUITS DE PCR ET ACQUISITION**

Les produits de PCR sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1.5% dans du tampon TAE\* 1X pendant 20 min à 100V. On peut ainsi vérifier la qualité de l'amplification des fragments attendus, les ADNc étant colorés au bromure d'éthidium et révélés par rayons ultraviolets. L'acquisition des signaux se fait sur le Gel Doc 2000 (Bio-Rad) avec le logiciel Quantity One<sup>®</sup> 4.3.2 (Bio-Rad).

### **8.1.6 SÉQUENÇAGE**

Afin de vérifier l'exactitude de la séquence nucléotidique des fragments d'ADNc à cloner, les bandes sont découpées du gel d'agarose, et l'extraction est réalisée avec le kit QIAquick<sup>®</sup> Gel

Extraction (Qiagen). Le séquençage est réalisé sur un analyseur automatique (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) selon la méthode de Sanger utilisant des di-désoxyribonucléosides triphosphates fluorescents (BigDye<sup>®</sup> terminator v3.1). Les profils sont ensuite analysés grâce au logiciel Sequencing Analysis<sup>®</sup>; les séquences sont finalement alignées aux données répertoriées sur le site GenBank<sup>™</sup>.

### **8.1.7 CLONAGE DES PRODUITS DE PCR**

La trousse pGEM<sup>®</sup>-T easy Vector System (Promega) a été utilisée pour nos expériences de clonage. Le vecteur pGEM<sup>®</sup>-T easy est un vecteur extension-T qui permet l'insertion de produits de PCR à bouts cohésifs amplifiés avec une enzyme *Taq* polymérase ajoutant une base adénosine à l'extrémité 3'. Ce vecteur est composé d'un site de clonage multiple situé à l'intérieur du gène *LacZ* et encadré par les promoteurs de transcription SP6 et T7, et d'un gène de résistance à l'ampicilline.

### **8.1.8 PURIFICATION DES AMPLICONS**

L'amplicon d'intérêt (double brin) est purifié grâce au kit commercial QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction (Qiagen) après avoir été extrait du gel d'électrophorèse, selon les recommandations du fournisseur. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 260nm, où une unité correspond à 50µg d'ADN double brin.

### 8.1.8.1 INSERTION DANS LE VECTEUR PLASMIDIQUE

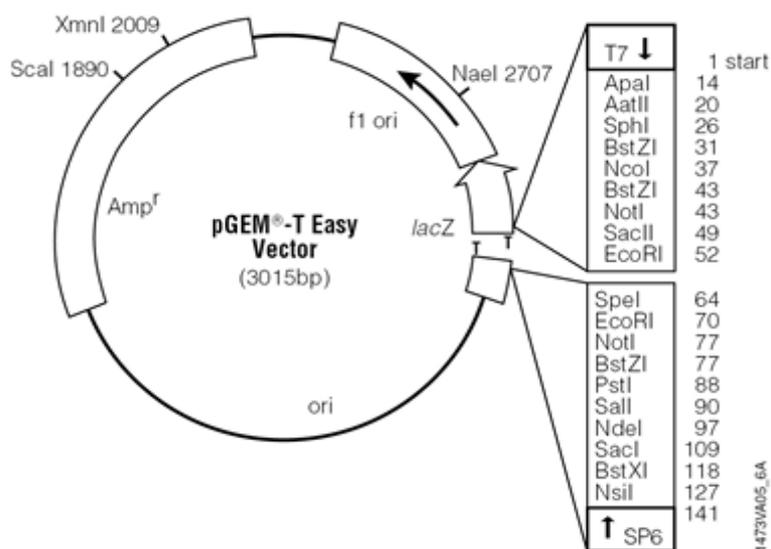


Fig 13 : Représentation schématique du vecteur plasmidique pGEM<sup>®</sup>-T Easy et du site d'insertion du fragment à cloner.

L'insertion dans le vecteur plasmidique pGEM<sup>®</sup>-T easy est réalisée selon les recommandations du fournisseur, en respectant le rapport insert:vecteur de 6:1 pour la quantité d'ADNc purifié à insérer c'est-à-dire une quantité d'insert de 35ng pour RFRP et 19ng pour Métastine. Le milieu réactionnel pour réaliser l'insertion est composé de la façon suivante :

5μL de tampon d'enzyme
1μL de vecteur de clonage (50ng.μL <sup>-1</sup> )
1μL d'enzyme T4 ADN ligase (3U.μL <sup>-1</sup> )
XμL d'ADN
Eau ultrapure stérile qsp 10μL

La ligation est réalisée à 23°C pendant 1 h.

### 8.1.8.2 TRANSFORMATION DES BACTÉRIES COMPÉTENTES

La ligation effectuée, 100μL de bactéries compétentes (DH5α-*E.coli*, Invitrogen) sont incubées avec 4μL de solution plasmide-insert (environ 20ng de plasmide recombinant) sur glace pendant 30 min. Un choc thermique de 55 s à 42°C est réalisé pour permettre l'entrée du plasmide contenant l'insert dans les bactéries, suivi d'un passage sur glace pendant 2 min, avant la mise en

culture des bactéries à 37°C pendant 1 h 30 min sous agitation dans 900µL de milieu Mueller-Hinton liquide. Les bactéries sont ensuite étalées dans des boîtes de Pétri sur milieu gélosé Mueller-Hinton complémenté d'ampicilline (100µg.mL<sup>-1</sup>, Euromedex), d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 40µg.mL<sup>-1</sup>, Euromedex) et de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside 2% (X-gal, 40µg.mL<sup>-1</sup>, Euromedex).

### **8.1.8.3 SÉLECTION DES BACTÉRIES RECOMBINANTES**

Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies de bactéries recombinantes sont repérées sur la boîte de Pétri. La sélection des bactéries transformées par le plasmide se fait par la présence du gène de résistance à l'ampicilline. Le produit à cloner est inséré dans le gène *LacZ*, supprimant ainsi l'expression de ce dernier codant la β-galactosidase, l'enzyme de dégradation du substrat chromogénique X-gal. Les bactéries ayant incorporé le plasmide seul vont pouvoir dégrader le X-gal en un produit coloré bleu, alors que les bactéries contenant le plasmide et l'insert ne dégradent pas le X-gal : la sélection des colonies de bactéries recombinantes se fait donc par l'absence de réaction colorée (colonies blanches). Des colonies recombinantes sont prélevées et remises en culture séparément dans du milieu Mueller-Hinton liquide complémenté d'ampicilline (100µg.mL<sup>-1</sup>) pendant une nuit à 37°C.

### **8.1.8.4 EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE PAR « MINIPREP »**

Le kit commercial Wizard<sup>®</sup>Plus Miniprep (Promega) est utilisé pour extraire l'ADN plasmidique des bactéries des différents clones, d'après les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique extrait est ensuite dosé par spectrophotométrie à 260 nm / 280 nm.

### 8.1.8.5 VÉRIFICATION DE LA CONSTRUCTION : PRÉSENCE, TAILLE ET ORIENTATION

Chaque clone sélectionné est vérifié par séquençage automatique (paragraphe 8.1.6, ‘Séquençage’) en utilisant les amorces spécifiques du vecteur (T7 ou SP6).

## 8.2 HYBRIDATION *IN SITU* (HIS)

Dans notre étude, seules des hybridations *in situ* froides ont été réalisées en utilisant des ribosondes synthétisées à partir du nucléotide UTP couplé à la digoxygénine (DIG-11-UTP).

### 8.2.1 OBTENTION DES RIBOSONDES RRFRP, RMET ET SMET

Les ribosondes sont synthétisées par transcription *in vitro* à partir du promoteur SP6, d’un fragment de l’ADNc d’intérêt (rRFRP, rMet et sMet) cloné dans le vecteur plasmidique pGEM<sup>®</sup>-T easy, grâce au kit DIG RNA labeling Mix (Roche). L’hybridation entre la sonde et l’ARNm du tissu se fait exclusivement avec la ribosonde en orientation ‘anti-sens’.

Les plasmides obtenus précédemment doivent être tout d’abord linéarisés par l’enzyme de restriction *NcoI* (Roche) dont un seul site de restriction est coupé sur le plasmide en-dehors de l’insert. La linéarisation est réalisée dans le milieu réactionnel suivant :

10µg de plasmide
20µL de tampon 10X d’enzyme
1µL d’enzyme de restriction <i>NcoI</i> (10U.µL <sup>-1</sup> )
Eau ultrapure stérile qsp 200µL

La linéarisation est réalisée à 37°C pendant 2 h. Le contrôle de la linéarisation est réalisé par migration électrophorétique de 500ng de plasmide linéarisé, sur gel d’agarose 1% TAE 1X.

Le vecteur plasmidique est ensuite purifié par addition d'un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (50:49:1). Le mélange est centrifugé 5 min à 10000 g à 4°C, et la phase aqueuse est récupérée dans un volume de chloroforme. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions est réalisée. La phase aqueuse est récupérée, et l'ADN plasmidique est précipité 30 min à -40°C en présence de deux volumes d'éthanol 99°. Le culot obtenu après centrifugation à 12000 g pendant 25 min à 4°C est lavé à l'alcool 70° par centrifugation à 12000 g pendant 3 min à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est placé dans un évaporateur sous vide pour être séché avant d'être repris dans de l'eau ultrapure stérile et enfin dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

La transcription *in vitro* pour l'obtention des ribosondes « anti-sens » est réalisée dans le milieu réactionnel suivant :

1µg d'ADN plasmidique linéarisé
2µL de tampon de transcription 10X
2µL de NTP (ATP 10mM, UTP 6,5mM, CTP 10mM, GTP 10mM et UTP-DIG 3,5mM)
2µL d'ARN polymérase SP6 (20U.µL <sup>-1</sup> )
1µL d'inhibiteur de RNase (20U.µL <sup>-1</sup> )
Eau ultrapure stérile qsp 20µL

Le mélange est incubé 2 h à 37°C, et l'ADN plasmidique est ensuite digéré 20 min à 37°C en présence de 2µL de DNase I (10U.µL<sup>-1</sup>). La réaction est stoppée par l'addition de 2µL d'EDTA 0,2M pH 8. La ribosonde est précipitée 2 h à -20°C dans 0,1 volume de chlorure de lithium 4M\* et 2,5 volumes d'éthanol 100°. Après avoir été centrifugé à 12000g pendant 20 min à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol 70° et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est séché et repris dans 50µL d'eau ultrapure stérile. La sonde est dosée par spectrophotométrie à 260nm.

Les dernières réactions de synthèse de la ribosonde rFRP ont été réalisées par une autre méthode plus rapide, en utilisant le kit commercial RNeasy<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup>Cleanup (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La réaction de transcription est identique au précédent protocole. Seule l'étape de purification diffère : elle est réalisée sur colonne, et non dans le chlorure de lithium.

La qualité de la transcription *in vitro* et l'intégrité de chaque ribosonde sont vérifiées par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1,5% TAE 1X de 1 $\mu$ L de sonde préalablement dénaturée à 80°C pendant 10 min. Les ribosondes obtenues sont stockées à 4°C et utilisées rapidement (dans les 3 mois).

### **8.2.2 PRÉ-HYBRIDATION**

Les coupes de cerveaux de rats réalisées au cryostat sont postfixées 10min à température ambiante dans une solution de PFA 4%. Les coupes de cerveaux adultes et postnataux vont être déprotéinées par incubation pendant 15 min à 37°C dans une solution de protéinase K (20 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) préparée dans son tampon\*, puis sont à nouveau postfixées dans la solution de PFA 4%. Les coupes de cerveaux d'embryons ne subissent pas de bain dans la solution de protéinase K ni de seconde postfixation. Les coupes sont ensuite traitées à température ambiante dans une solution de triéthanolamine (TEA) 0,1M pH 8 et HCl 10N pendant 8 min, puis le bruit de fond est annulé par acétylation pendant 5 min dans une solution de TEA 0,1M pH 8 et acide acétique anhydride. Les lames sont ensuite plongées dans le tampon SSC 5X pendant 15 min à température ambiante afin de bloquer les sites d'hybridation aspécifique. Enfin, les coupes sont recouvertes de tampon d'hybridation pendant 1 h à 56°C dans une atmosphère humide sous parafilm.

### **8.2.3 HYBRIDATION**

La ribosonde est dénaturée à 80°C pendant 5 min avant d'être diluée dans le tampon d'hybridation à la concentration de  $2\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Le parafilm est retiré délicatement et la ribosonde est déposée sur les coupes. L'hybridation est réalisée à 56°C pendant une nuit sous lamelle scellée à la colle 'rubbercement' (Royal Talens) dans une chambre humide pour éviter toute évaporation.

### **8.2.4 POST-HYBRIDATION ET RÉVÉLATION ENZYMATIQUE**

La colle 'rubbercement' est retirée et les lamelles sont décollées délicatement. Les lames sont placées dans des bains de tampon SSC à stringence croissante : SSC 2X pendant 5 min à température ambiante et SSC 0,2X pendant 90 min à 56°C. Les coupes sont ensuite rincées à température ambiante dans le tampon 1 pendant 5 min, et incubées 2 h avec l'anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (Roche). L'anticorps est dilué à raison de  $0,76\mu\text{L}$  par mL de tampon 1 complémenté de réactif de blocage des sites aspécifiques ( $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Blocking Reagent, Roche). Pour éliminer l'excès d'anticorps anti-DIG non fixé, les coupes sont rincées dans deux bains de tampon 1 pendant 10 min, puis dans un bain de tampon 3 pendant 5 min.

Les coupes sont enfin mises à incuber dans une solution de tampon 3 contenant les substrats de la phosphatase alcaline, le 4-nitroblue tetrazolium chloride ( $4,5\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ( $3,5\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). L'incubation est réalisée à température ambiante à l'obscurité pendant quelques heures suivant l'évolution du marquage. La réaction enzymatique produit une coloration violacée, et est stoppée dans un bain de tampon d'arrêt de réaction TE 1X pendant 10 min. Les coupes sont rincées dans du tampon PBS 1X, puis montées dans une solution de PBS/glycérine (V/V).

### **8.3 COUPLAGE HYBRIDATION *IN SITU* / IMMUNOHISTOCHEMIE**

Cette technique a été utilisée pour les études de distribution de l'ARNm RFRP en corrélation avec la distribution de peptides et enzymes déjà étudiés au laboratoire (MCH, TH, Hcrt, GnRH et Métastine).

Le couplage est réalisé en deux temps : le premier consiste à réaliser l'hybridation *in situ* dans son intégralité. Les coupes ne sont pas montées mais le marquage enzymatique est fixé 5 min à température ambiante dans une solution de PFA 4%. Les coupes sont rincées dans une solution de PBS 1X. La seconde étape consiste au dépôt des différents anticorps, comme décrit précédemment (techniques d'immunohistochimie) jusqu'au montage des coupes sous lamelle dans une solution de PBS/glycérine (V/V).

### **8.4 TECHNIQUES DE PCR 'SEMI-QUANTITATIVE' RELATIVE**

#### **8.4.1 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET PRÉLÈVEMENT**

Des rats mâles adultes de 300g sont placés sous différentes conditions : conditions normales, stress par immobilisation pendant 3 h, restriction alimentaire totale pendant 48 h, restriction alimentaire totale pendant 48 h suivie d'une réalimentation de 3 h.

Les rats sont sacrifiés par décapitation. Le cerveau est extrait de la boîte crânienne, et l'hypothalamus est disséqué du cerveau total.

L'extraction, le dosage et la transcription inverse des ARN totaux des hypothalami sont réalisés selon les protocoles classiques (voir « construction et synthèse d'une ribosonde », paragraphes 8.1.1 à 8.1.3).

#### 8.4.2 AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE L'ADNC D'INTERET (PCR OU « POLYMERASE CHAIN REACTION »)

La technique de RT-PCR 'semi-quantitative' relative (Kinoshita *et al.*, 1992 ; Zamorano *et al.*, 1996) consiste à co-amplifier simultanément dans le mélange réactionnel l'ADNc du gène d'intérêt (RFRP) et l'ADNc d'un gène de référence ubiquitaire et constitutif servant à la normalisation. Dans notre étude, le gène de la cyclophiline, 'cyclo' a été choisi. Avant de réaliser l'amplification d'un fragment d'ADNc, la sélection d'amorces spécifiques de ce fragment doit être rigoureusement effectuée. Les ARNm étudiés et les amorces couplées à un fluorochrome (6FAM) pour l'amplification de l'ADNc du précurseur sont répertoriées dans le tableau suivant :

Prépro	Amorce sens	Amorce anti-sens
6FAM-RFRP	5'-GTGCCCCACTCAGCAGCCAACCTT-3'	5'-GCCCCTTGAAGGACTGGCTGGAGG-3'
6FAM-Cyclo	5'-CGCCGCTTGCTGCAGACATGG-3'	5'-GAGTTGTCCACAGTCGGAGATGG-3'

A l'aide de ces amorces spécifiques, nous avons pu amplifier un fragment d'ADNc de 354pb correspondant aux nucléotides 246-599 de l'ARNm du précurseur de la préproRFRP de rat, et un fragment d'ADNc de 507pb correspondant aux nucléotides 26-534 de l'ARNm de la cyclophiline.

Le milieu réactionnel (kit Roche) pour une réaction de polymérisation en chaîne est composé de la façon suivante :

2 $\mu$ L de tampon de réaction 10X 3 $\mu$ L de MgCl <sub>2</sub> 25mM 1 $\mu$ L d'un mélange des 4 dNTP 10mM 0.2 $\mu$ L d'enzyme <i>Taq</i> Polymérase 5U. $\mu$ L <sup>-1</sup> 1 $\mu$ L du couple d'amorces RFRP 10 $\mu$ M chacun 1 $\mu$ L du couple d'amorces Cyclo 10 $\mu$ M chacun 10.8 $\mu$ L d'eau ultrapure stérile 1 $\mu$ L de produit de RT-PCR
---

Les amplifications enzymatiques sont réalisées dans le thermocycleur PTC-200 (MJ-Research) en suivant la programmation en 3 étapes :

- une phase à 94°C pendant 3 min pour l'activation de l'enzyme *Taq* polymérase,
- 35 cycles, chacun composé d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 45 s, d'une phase d'hybridation à 65°C pendant 30 s, et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 1 min 30s,
- une phase d'achèvement des processus d'élongation en cours à 72°C pendant 10 min.

### **8.4.3 OBSERVATIONS ET ACQUISITIONS**

Les produits de PCR obtenus sont ensuite analysés grâce à l'analyseur de fragments (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) à l'aide du logiciel GeneMapper®.



**TAMPONS**  
**ET**  
**SOLUTIONS**



# PRÉPARATION DU MATÉRIEL HISTOLOGIQUE

## ANESTHÉSIE

### Hydrate de chloral 7%

Hydrate de chloral	7g
Eau distillée	qsp 100mL

Injecter, en voie intrapéritonéale, une dose létale de 1mL pour 200g de masse corporelle.

### Mélange Xylasine / Kétamine

Xylasine 2% (Bayer)	1 volume
Kétamine 50mg.mL <sup>-1</sup> (Merial)	2 volumes

Injecter, en voie intramusculaire, un mélange de 150µL de xylasine et 300µL de kétamine pour 300g de masse corporelle.

## PERFUSION / FIXATION / CONGÉLATION

### Tampon phosphate 0,2M pH 7,2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	71,62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,2g
Eau distillée	qsp 1L

### Paraformaldéhyde 1% ou 4%

Paraformaldéhyde	10g ou 40g
Eau distillée	500mL

Dissoudre la poudre dans l'eau distillée en chauffant à 60°C. Ajouter quelques gouttes de NaOH 5N jusqu'à éclaircissement de la solution. Ajouter 500mL de tampon phosphate 0,2M pH 7,2.

### Tampon cryoprotecteur 15%

Tampon phosphate 0,2M pH 7,2	500mL
Saccharose	150g
Azoture de sodium	0,1g
Eau distillée	500mL

### Liquide de Bouin

Solution aqueuse saturée d'acide picrique	75mL
Formaldéhyde 37%	20mL
Acide acétique	5mL

# IMMUNOHISTOCHEMIE

## PBS simple, pH 7,2-7,4

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,42g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,27g
NaCl	8,76g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 7,2-7,4.

## PBS-Triton X-100

PBS simple	997mL
Triton X-100	3mL

## Diluant lait

PBS-Triton X-100	qsp 1L
Albumine sérique bovine	10g
Lactoprotéines (Régilait)	100g
Azoture de sodium	0,1g

Stocker le diluant lait à +4°C pendant au maximum 15 jours

# BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

## CULTURE DES BACTÉRIES

### Milieu Mueller-Hington liquide

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Eau distillée	qsp 1L

Pour obtenir le milieu gélosé, ajouter 17g d'agar par litre de milieu Mueller-Hington.

## ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

### Tampon TAE 5X

Trizma base	24,2g
Acide acétique glacial	5,71mL
EDTA (éthylène diamine tétra-acétique)	1,86g
Eau distillée	qsp 1L

### Agarose 1%-1,5% TAE 1X

Agarose	1-1,5g
Tampon TAE 1X	qsp 100mL

Ajouter du bromure d'éthidium (BET)  $1\text{mg.mL}^{-1}$  ( $60\mu\text{L}$  pour un gel de 100mL). Laisser polymériser sous hotte.

## HYBRIDATION *IN SITU*

### Tampon PBS 10X, pH 7,5

NaCl	90g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$	17,7g
NaOH	4g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 7,5. Autoclaver.

### Tampon de la protéinase K, pH 7,5

Trizma hydrochloride 20mM	3,152g
$\text{CaCl}_2$ 2mM	0,294g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 7,5. Autoclaver.

### Tampon SSC 20X, pH 7

NaCl	175,3g
Citrate de sodium	88,2g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 7. Autoclaver.

### Tampon d'hybridation

Formamide désionisé	2,5mL
SSC 10X	2,5mL
ADN Sperme de saumon ( $10\text{mg.mL}^{-1}$ )	$100\mu\text{L}$

### **Tampon 1, pH 7,5**

Trizma hydrochloride 100mM	12,114g
NaCl 150mM	8,76g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 7,5

### **Tampon de blocage « Blocking Reagent »**

Tampon 1 filtré	4mL
Réactif Boehringer	20mg

### **Tampon 3, pH 9,5**

Trizma base 100mM	12,114g
NaCl 100mM	5,84g
MgCl <sub>2</sub> 50mM	10,16g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 9,5.

### **Tampon TE 10X, pH 8**

Trizma base 10mM	12,11g
EDTA 1mM	3,72g
Eau distillée	qsp 1L

Ajuster le pH à 8.

# RÉSULTATS



# **1<sup>ère</sup> PARTIE**

## **ANATOMIE DES SYSTÈMES MÉTASTINE ET RFRP**



# **1 DISTRIBUTION DES PÉRIKARYONS À MÉTASTINE ET À RFRP**

## **1.1 DISTRIBUTION DES NEURONES À MÉTASTINE CHEZ LE RAT.**

De nombreux travaux concernant l'étude de la métastine dans le cerveau de rongeur ont été réalisés en utilisant différents anticorps. Pendant la durée de nos travaux, un seul de ces anticorps était commercialisé par le laboratoire Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, USA). Deux autres anticorps non commerciaux dirigés contre la métastine étaient également utilisés dans la littérature. L'un provient du laboratoire pharmaceutique japonais Takeda Pharmaceuticals (lot #254), l'autre a été produit par une équipe INRA (Dr Caraty, Université de Tours (lot #564)).

### **1.1.1 DISTRIBUTION DU MARQUAGE FOURNI PAR L'ANTICORPS ANTI-MÉTASTINE HUMAINE**

Un des objectifs initiaux de notre travail était de clarifier l'aire de distribution de la population de neurones à métastine. Des immunomarquages ont donc été effectués en utilisant l'anticorps commercial dirigé contre la métastine humaine, et plus particulièrement contre les 10 derniers acides aminés de la séquence peptidique de la métastine humaine. Cet anticorps était alors largement utilisé dans la littérature afin de mettre en évidence les neurones métastinergiques (Brailoiu *et al.*, 2005 ; Pompolo *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2007 ; Maeda *et al.*, 2007). Nous avons réalisé une cartographie précise de la distribution du marquage fourni par cet anticorps dans le cerveau du rat mâle adulte. Ceux-ci ont été réalisés sur des coupes flottantes, et ont été analysés et comparés aux structures cytoarchitectoniques identifiées sur les coupes voisines colorées par la méthode de Nissl (Fig 14).

Des cellules immunoréactives ont été observées dans plusieurs régions intra- et extra-hypothalamiques. En suivant l'axe rostrocaudal (Fig 14, 15), les premières cellules marquées étaient localisées dans la capsule du noyau ventromédian de l'hypothalamus (cVMH) et le noyau dorsomédian (DMH). Les corps cellulaires marqués les plus caudaux étaient retrouvés en-dehors des

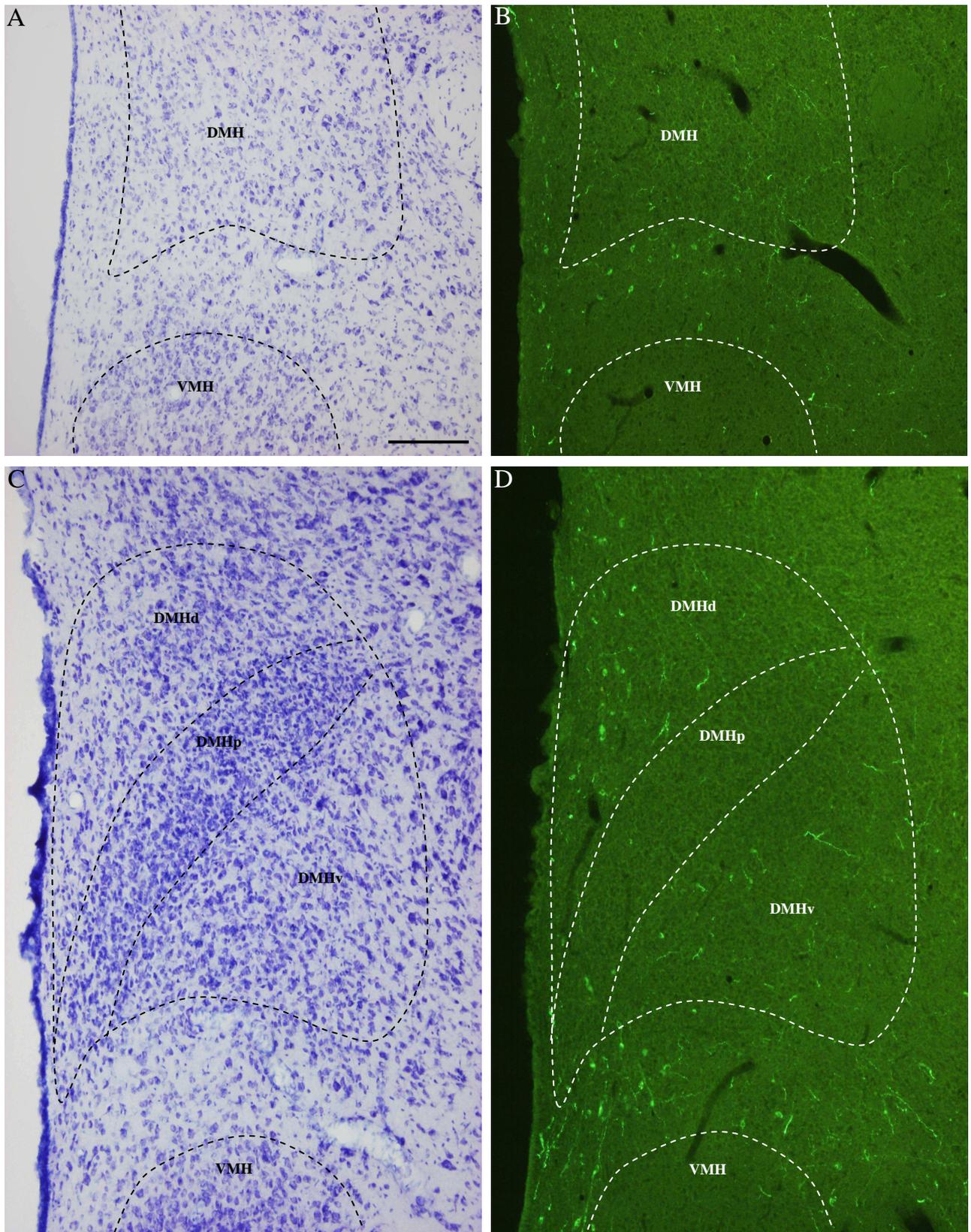
**Fig 14 :**

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des coupes frontales de cerveau de rat, de 10µm d'épaisseur.

(A,C) Identification des noyaux hypothalamiques dorsomédian (DMH) et ventromédian (VMH) sur des coupes frontales de cerveau de rat colorées par la coloration de Nissl.

(B,D) Distribution immunohistochimique des neurones marqués par l'anticorps commercial anti-hMet dirigé contre la métastine humaine, sur les coupes voisines de celles colorées. Les corps cellulaires sont observés dans les parties dorsale et ventrale du noyau dorsomédian (DMHd et DMHv) ainsi que dans la région entre les noyaux dorsomédian et ventromédian.

Barre d'échelle : 150µm



**Fig 14:** Distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat.

structures hypothalamiques dans la partie antérieure et médiane du noyau du tractus solitaire (NTSm, correspondant au niveau 70 de l'atlas de Swanson, 1992).

Les fibres révélées par l'anticorps anti-hMet sont distribuées dans de très nombreux territoires cérébraux, depuis les bulbes olfactifs jusqu'à la moelle épinière (Fig 15). Ces projections n'ont pas toutes le même aspect : certaines sont très fines, d'autres sont épaisses et variqueuses (Fig 16). D'un point de vue général, ces dernières ont une distribution diffuse dans le télencéphale basal, l'hypothalamus et le tronc cérébral. Chez les rats mâles, les fibres de fin calibre sont observées dans des territoires extra-hypothalamiques, en particulier dans le noyau parabrachial (PB) (Fig 16, A-B) et les couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière (SCd). Des fibres épaisses sont observées dans le noyau de Barrington (B) (Fig 16, C-F)

La cartographie fine de la distribution des ces projections est présentée dans la figure 15. Dans le télencéphale, les fibres épaisses sont peu abondantes et observées dans les régions corticales ou associées au cortex cérébral, tels que les bulbes olfactifs (OB). Quelques-unes sont localisées dans la couche granulaire des bulbes olfactifs primaires et accessoires, ainsi que dans les noyaux olfactifs antérieurs. Plus en arrière, des fibres sont observées dans l'aire prélimbique (PL), l'aire infralimbique (ILA), l'aire piriforme (PIR) et l'aire périrhinale. Dans les régions isocorticales (ISO), les fibres sont rares. Quelques-unes sont observées dans les aires somatomotrices. Dans le télencéphale basal, les fibres immunoréactives sont plus abondantes dans la région septale et certaines structures amygdaliennes (noyau central de l'amygdale, aire amygdalienne antérieure), et plus rares dans les noyaux de la base (noyau accumbens (ACB), le fundus du striatum (FS)) et dans d'autres noyaux amygdaliens (noyaux intercalé et latéral).

Dans le diencephale, l'hypothalamus est la région la plus innervée. Les projections y sont relativement abondantes bien que toujours diffuses dans les régions préoptiques ventrolatérale (AVP)

et latérale (LPO). Les fibres sont moins abondantes dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV), et les noyaux préoptiques médian (MPN) et médial (MEPO). Quelques fibres sont observées dans l'hypothalamus antérieur, et plus particulièrement dans le noyau paraventriculaire (PVH), la partie intermédiaire du noyau périventriculaire (PVi) et la région périsuprachiasmatique (PSCH). Le noyau antérieur (AHN) est peu irrigué. Dans l'hypothalamus tubéral, un réseau de fibres modérément dense est observé dans les noyaux arqué (ARH) et tubéral. Dans l'hypothalamus latéral, un nombre moins important de projections est marqué. Dans l'hypothalamus postérieur, quelques fibres sont observées dans les noyaux tubéromamillaire (TM), supramamillaire (SUM) et mamillaire latéral (LM). Des fibres sont observées dans le noyau hypothalamique postérieur en transit vers la substance grise périaqueducale (PAG).

Le thalamus est peu irrigué. Seul le noyau paraventriculaire (PVT) contient des fibres immunoréactives en nombre significatif. Quelques fibres prennent une route latérale dans la zona incerta (ZI) et sont retrouvées dans les noyaux ventraux du corps genouillé latéral (GEN). Certaines de ces fibres en transit poursuivent jusque dans le tectum.

Le tronc cérébral est caractérisé par la présence de projections denses dans certains noyaux spécifiques. On observe ces fibres dans les parties latérales dorsale (PBld) et externe (PBle) du noyau parabrachial. Il s'agit, dans cette structure, des fibres de petit calibre : le marquage obtenu est d'aspect ponctiforme suggérant la reconnaissance de très nombreux boutons. Ce même marquage ponctiforme est aussi obtenu dans une couche superficielle du SPVC évoquant un territoire d'intense innervation. Des structures du tegmentum dorsal comme la PCG contiennent un réseau de projections relativement dispersé par des fibres épaisses. Des projections épaisses plus nombreuses sont aussi observées dans le noyau de Barrington (B) (Fig 16, D-F). La partie dorsale du noyau du tractus solitaire contient des prolongements fins immunoréactifs. Des images très claires de paniers péricellulaires sont aussi observées dans le noyau réticulé latéralement au noyau ambigu.

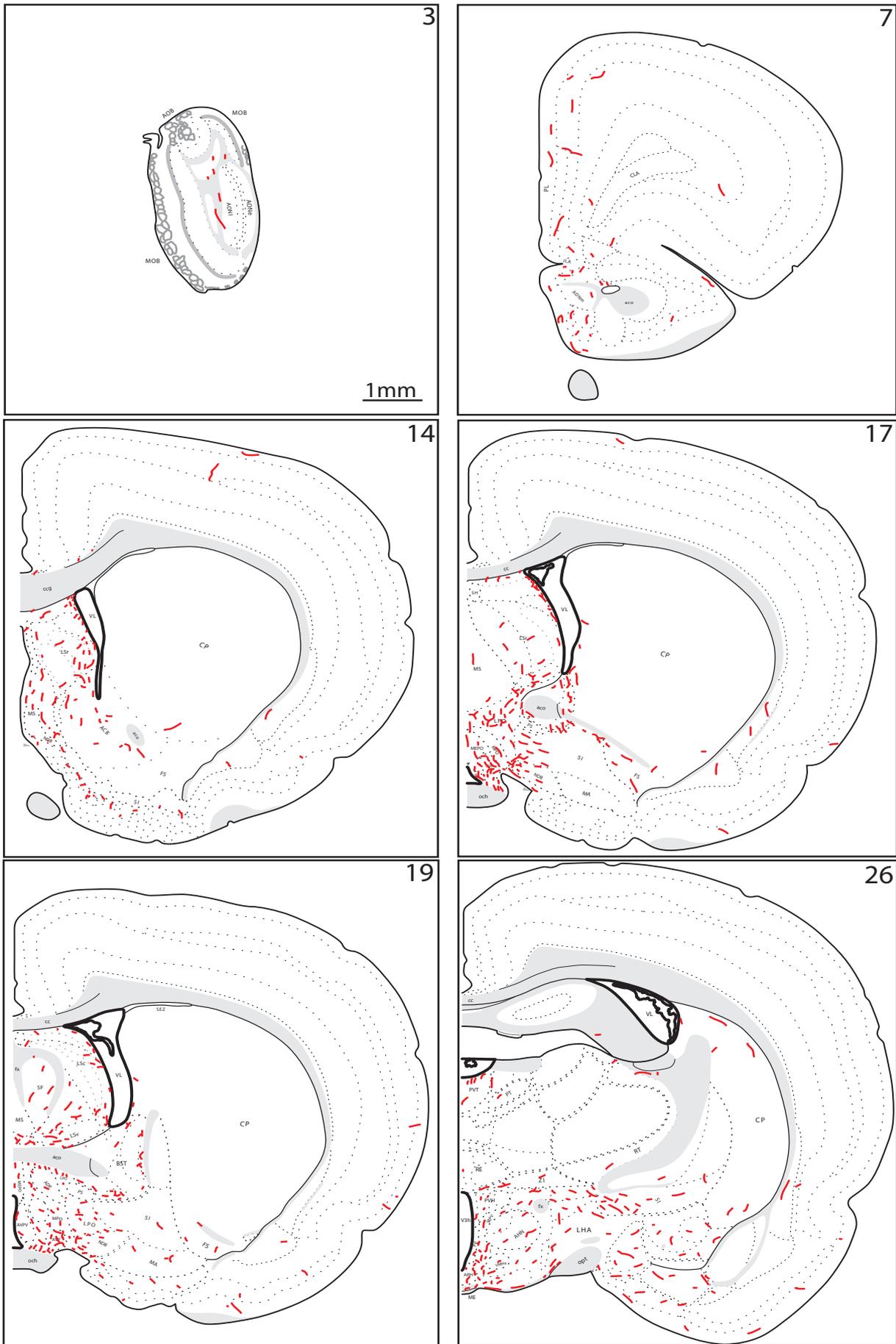
Enfin, les couches superficielles des cornes dorsales de la moelle épinière présentent un grand nombre de projections très fines qui ressemblent beaucoup à celles décrites dans le noyau parabrachial.

**Fig 15 :**

Cartographie détaillée de la distribution des corps cellulaires (points rouges) et des fibres (traits rouges) marqués par l'anticorps commercial anti-hMet et révélés par la méthode immunoenzymologique aux complexes PAP sur des coupes frontales (30µm) de cerveau de rat.

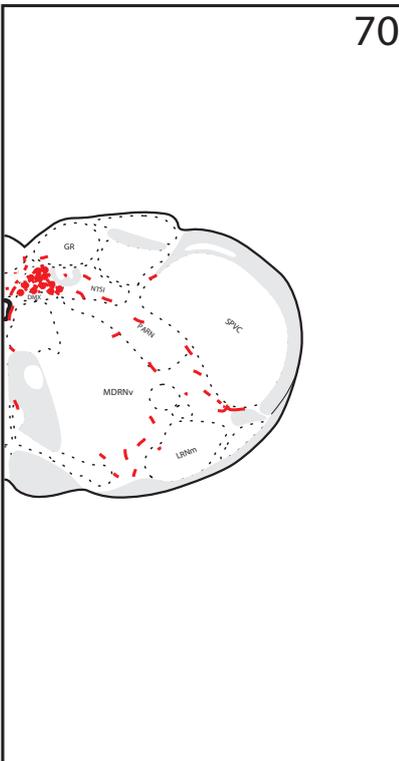
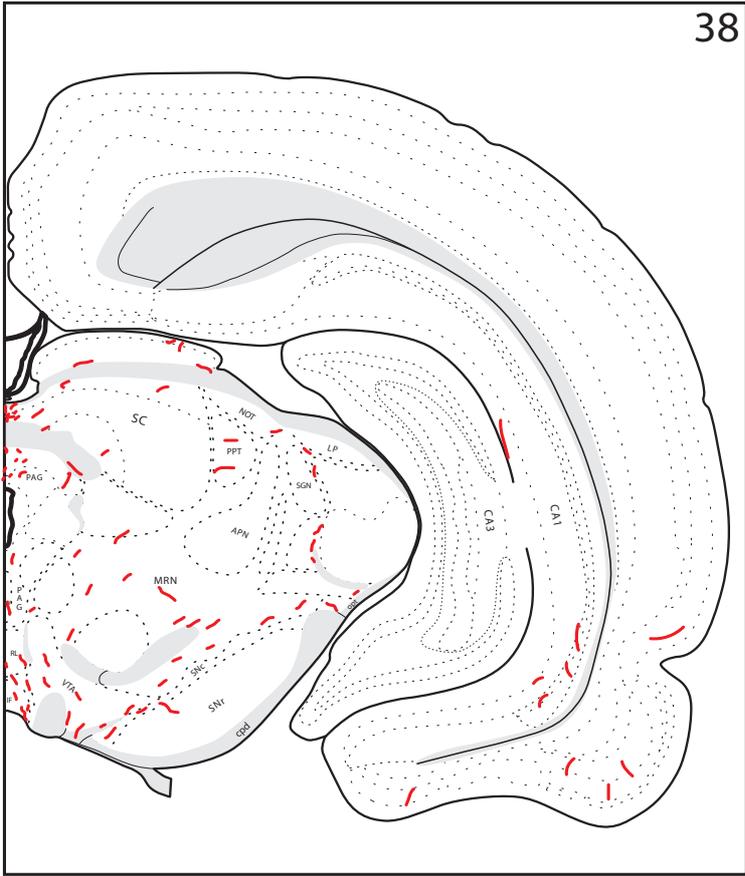
A noter que les coupes sont arrangées du niveau le plus rostral (bulbes olfactifs, niveau 3 de l'atlas de Swanson) au niveau le plus caudal (moelle épinière, niveau SC de l'atlas de Swanson).

Chaque point et chaque trait rouges représentent respectivement l'équivalent d'un corps cellulaire et d'une fibre marqués par l'anticorps anti-hMet.



**Fig 15 :** Cartographie de la distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet.





**Fig 15 :** (suite et fin)

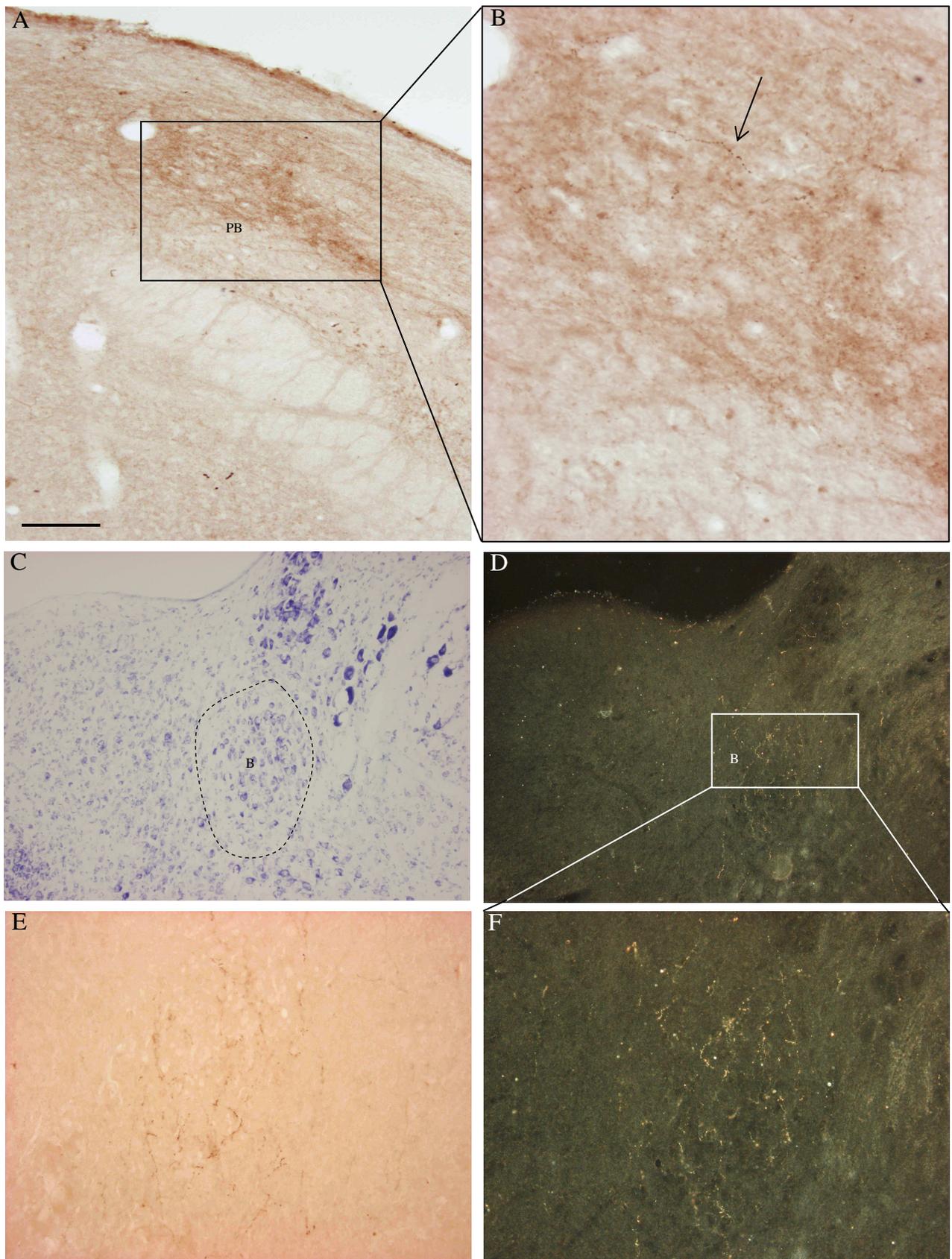
**Fig 16 :**

**(A,B)** Observation microscopique des fibres exprimant le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet et révélé par la méthode immunoenzymologique aux complexes PAP dans le noyau parabrachial (PB). La flèche en B indique une fibre épaisse avec de nombreuses varicosités. À noter également la présence d'un réseau dense de fibres fines.

**(C)** Coloration de Nissl sur une coupe horizontale de cerveau de rat passant par le noyau de Barrington (B).

**(D-F)** Photographies de fibres marquées par l'anticorps anti-hMet dans le noyau de Barrington sur une coupe horizontale de cerveau de rat. F est un fort grossissement de D.

Barre d'échelle : (A) 100 $\mu$ m ; (B-F) 50 $\mu$ m



**Fig 16:** Distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales (A,B) et horizontales (C-F) d'hypothalamus de rat (enzymologie – complexes PAP)

### **1.1.2 DIMORPHISME SEXUEL**

Sur des coupes de cerveau de rat femelle en proestrus, des projections denses et de petit calibre marquées par l'anticorps anti-hMet innervent les noyaux arqué (Fig 17, A, C) et antéroventral périventriculaire. Ce type de marquage n'avait pas été observé chez le rat mâle ni sur des coupes de cerveaux issus de femelles en œstrus ou diestrus. Ces marquages confirmaient donc des données de la littérature. Une innervation a été aussi observée chez les animaux femelles en œstrus dans des régions ventrales du noyau de la strie terminale (BST) (Fig 17, E-F). Cependant, sur ce matériel, il n'a pas été remarqué, par immunohistochimie, de corps cellulaires avec une distribution différente de celle observée chez le rat mâle adulte.

### **1.1.3 DISTRIBUTION DU MARQUAGE FOURNI PAR LES ANTICORPS NON COMMERCIAUX**

L'anticorps produit par le laboratoire japonais Takeda Pharmaceuticals a été utilisé dans de nombreux travaux (Kinoshita *et al.*, 2005 ; Adachi *et al.*, 2007 ; Yamada *et al.*, 2007). Il fournit un marquage des corps cellulaires exclusivement. Aucune projection n'a été observée sur notre matériel (rats mâles). Des périkaryons ont été observés uniquement dans le noyau arqué. Par ailleurs, le marquage obtenu était diffus et uniforme dans le cytoplasme, contrastant avec le marquage granulaire généralement fourni par les anticorps anti-peptide.

Le marquage fourni par l'anticorps synthétisé par le laboratoire du Dr. Caraty (Franceschini *et al.*, 2006) révèle des corps cellulaires et des projections. Les corps cellulaires immunoréactifs ont été observés dans le noyau arqué, le noyau antéroventral périventriculaire et la capsule du noyau ventromédian. Les projections diffuses suivent une distribution proche de celle observée avec l'anticorps anti-hMet.

#### **1.1.4 DÉTECTION DE L'ARNm MÉTASTINE**

Dans le cadre de notre collaboration, le Pr. Pralong nous a fourni la ribosonde complémentaire de la séquence 176-369 de l'ARNm de la prépro-métastine de souris (sMet) (Gottsch *et al.*, 2004a). Au laboratoire, nous avons également produit une ribosonde complémentaire de la séquence 153-346 de l'ARNm de la prépro-métastine de rat (rMet). Les marquages fournis (Fig 18) par ces deux sondes ont été confrontés à chacun de ceux fournis par les anticorps dirigés contre la métastine. Seule la sonde rMet nous a fourni un marquage des corps cellulaires suivant une distribution différente de chacun des trois anticorps. Les corps cellulaires exprimant le marquage par hybridation *in situ* étaient essentiellement distribués dans les noyaux arqué (ARH), antéroventral périventriculaire (AVPV) et périventriculaire (PV). Quelques périkaryons ont été retrouvés dans le noyau paraventriculaire antérieur (PVH). Aucun périkaryon contenant l'ARNm de la métastine n'est trouvé dans la capsule du noyau ventromédian. Le noyau médian de l'amygdale est la seule structure extra-hypothalamique dans laquelle quelques cellules exprimant l'ARNm de la métastine ont été localisées.

#### **1.2 DISTRIBUTION DES NEURONES hMET-POSITIFS DANS L'HYPOTHALAMUS HUMAIN.**

L'étude de la distribution du marquage fourni par l'anticorps dirigé contre la métastine humaine (hMet) a été réalisée sur des coupes déparaffinées d'hypothalami humains. Ces coupes provenaient de collections réalisées lors d'études précédentes (Brischoux, 2002). L'immunohistochimie avec l'anticorps dirigé contre la métastine humaine fournit un marquage de fibres et des périkaryons.

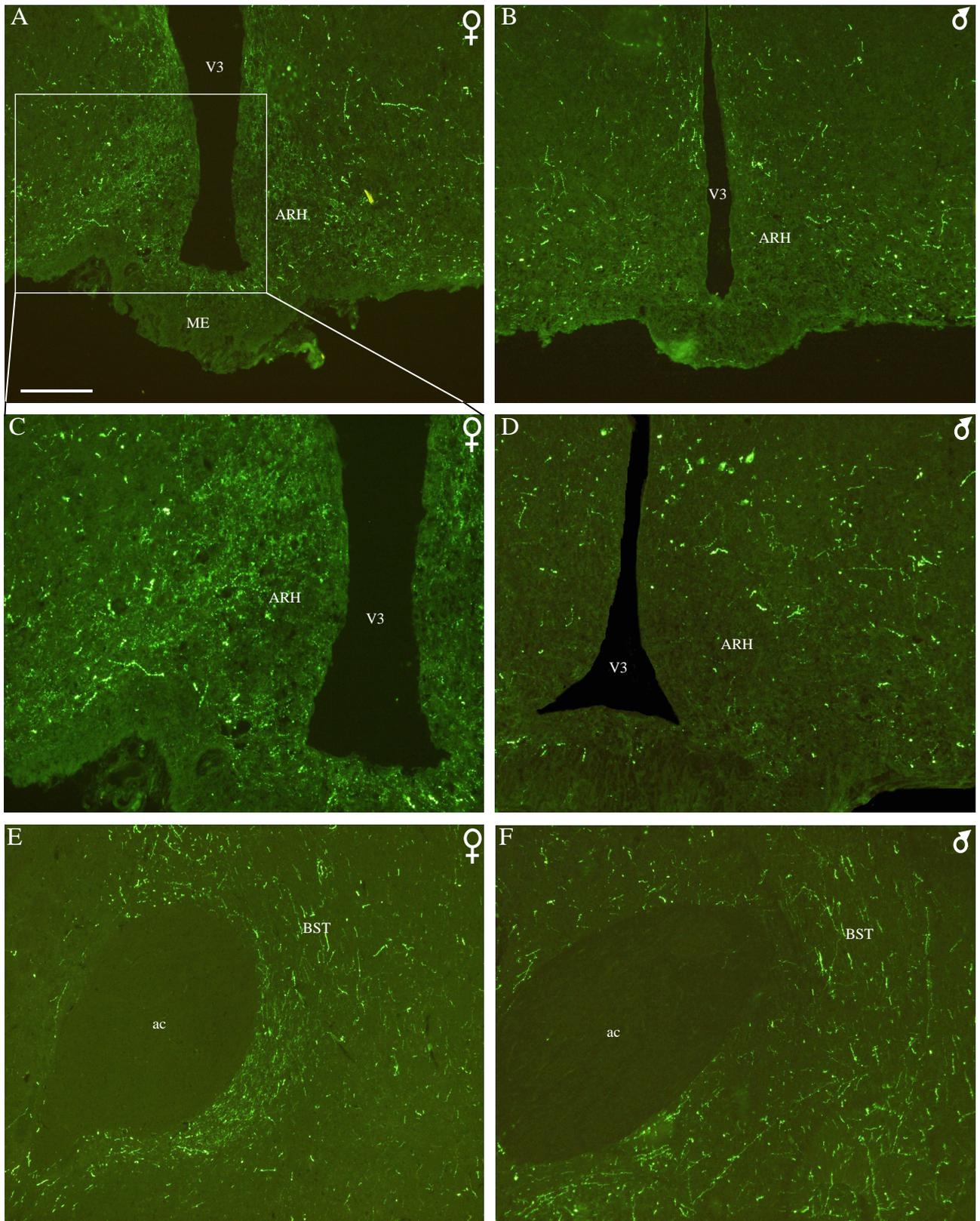
Les corps cellulaires marqués sont peu abondants et l'intensité de marquage est faible (Fig 19, A). Ce sont de petits neurones principalement localisés dans des structures périventriculaires. Quelques corps cellulaires sont retrouvés dans les territoires préoptiques, en particulier le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV), d'autres sont retrouvés dans la partie intermédiaire du noyau périventriculaire (PVi) au niveau de coupes passant par le noyau ventromédian (VMH).

**Fig 17 :**

Photographies de neurones marqués par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales de cerveau de rat femelle (**A,C,E**) et mâle (**B,D,F**).

Ces photographies illustrent le dimorphisme sexuel de la distribution de neurones marqués par l'anticorps anti-hMet dans le noyau arqué (ARH) (**A-D**) et dans le noyau de la strie terminale (BST) (**E,F**).

Barre d'échelle : (A,B) 200 $\mu$ m ; (C,D) 100 $\mu$ m ; (E,F) 150 $\mu$ m



**Fig 17:** Dimorphisme sexuel de la distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte mâle (B,D,F) et femelle (A,C,E).

**Fig 18 :**

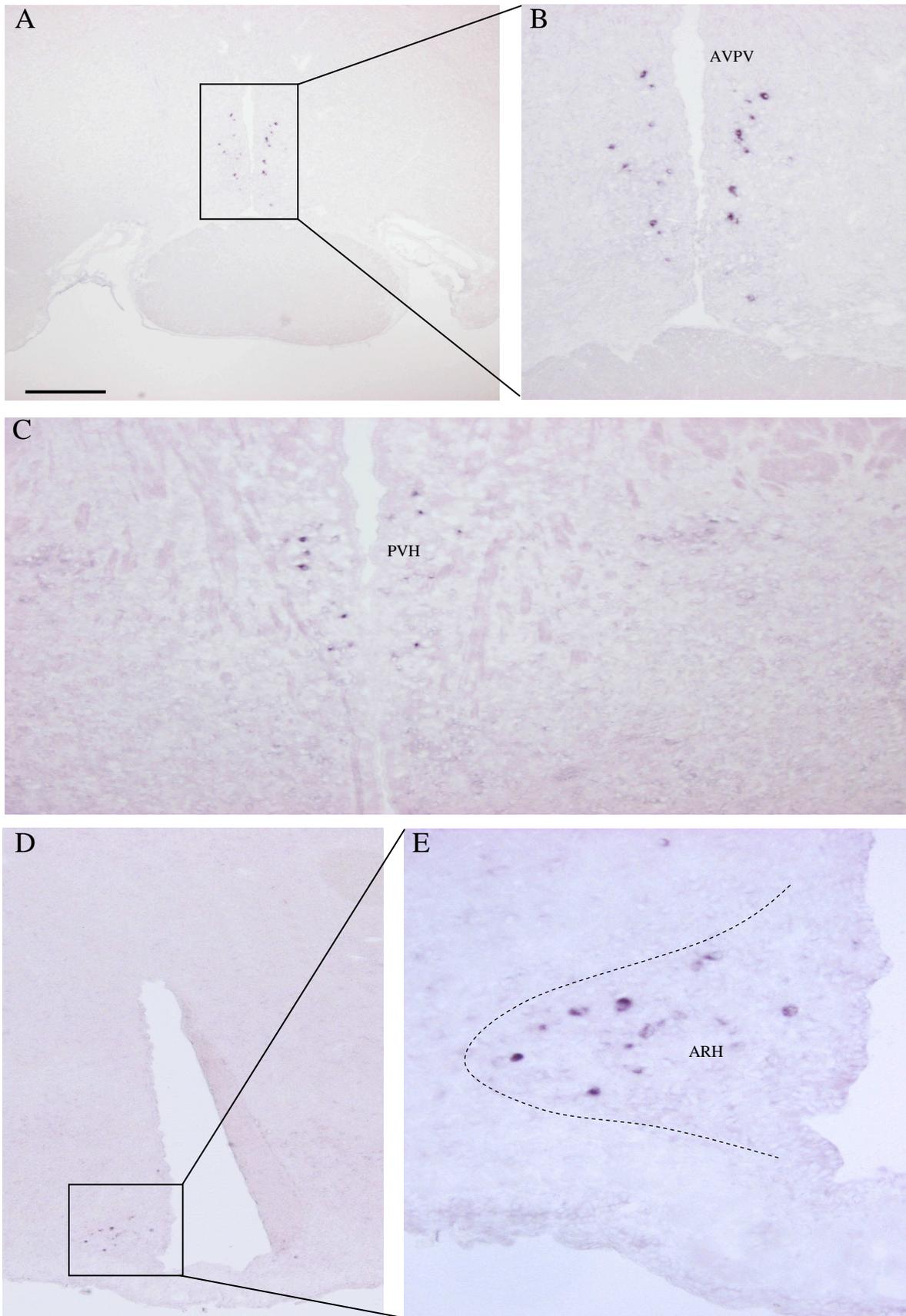
Photographies de neurones contenant l'ARNm de la métastine sur des coupes frontales de cerveau de rat. Le marquage a été obtenu par hybridation *in situ* avec la sonde rMet. Chaque tâche violacée correspond à un corps cellulaire.

**(A,B)** Ces photographies illustrent le marquage de corps cellulaires dans le noyau hypothalamique antéroventral périventriculaire (AVPV). B est un fort grossissement de A.

**(C)** Des corps cellulaires sont également marqués dans le noyau hypothalamique paraventriculaire (PVH).

**(D,E)** Sur ces photographies, on peut observer un nombre important de corps cellulaires exprimant l'ARNm de la métastine dans le noyau arqué (ARH). E est un fort grossissement de D.

Barre d'échelle : (A,B,C) 150µm ; (D) 200µm ; (E) 100µm



**Fig 18:** Distribution des neurones métastimulatoires (hybridation *in situ*) sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte.

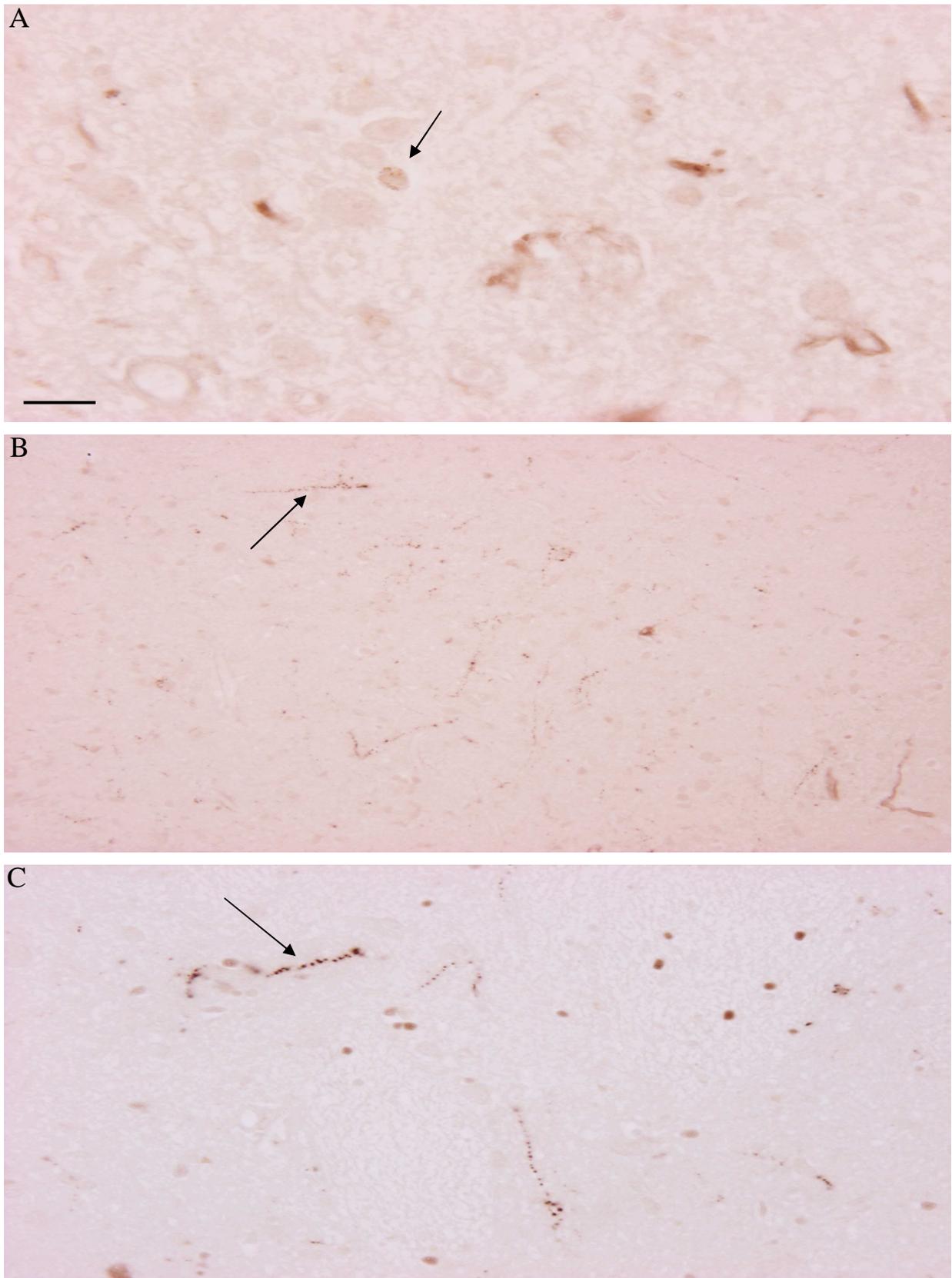
**Fig 19 :**

Photographies de neurones contenant le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales d'hypothalamus humain. Le marquage a été révélé par la méthode aux complexes peroxydase-antiperoxydase.

**(A)** Sur cette photographie, est illustré un corps cellulaire (flèche) contenant le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet. Le marquage est faible.

**(B,C)** Ces deux photographies présentent des fibres marquées par l'anticorps anti-hMet (flèches). Ces fibres sont intensément marquées et présentent un grand nombre de varicosités.

Barre d'échelle : (A) 100 $\mu$ m ; (B,C) 250 $\mu$ m



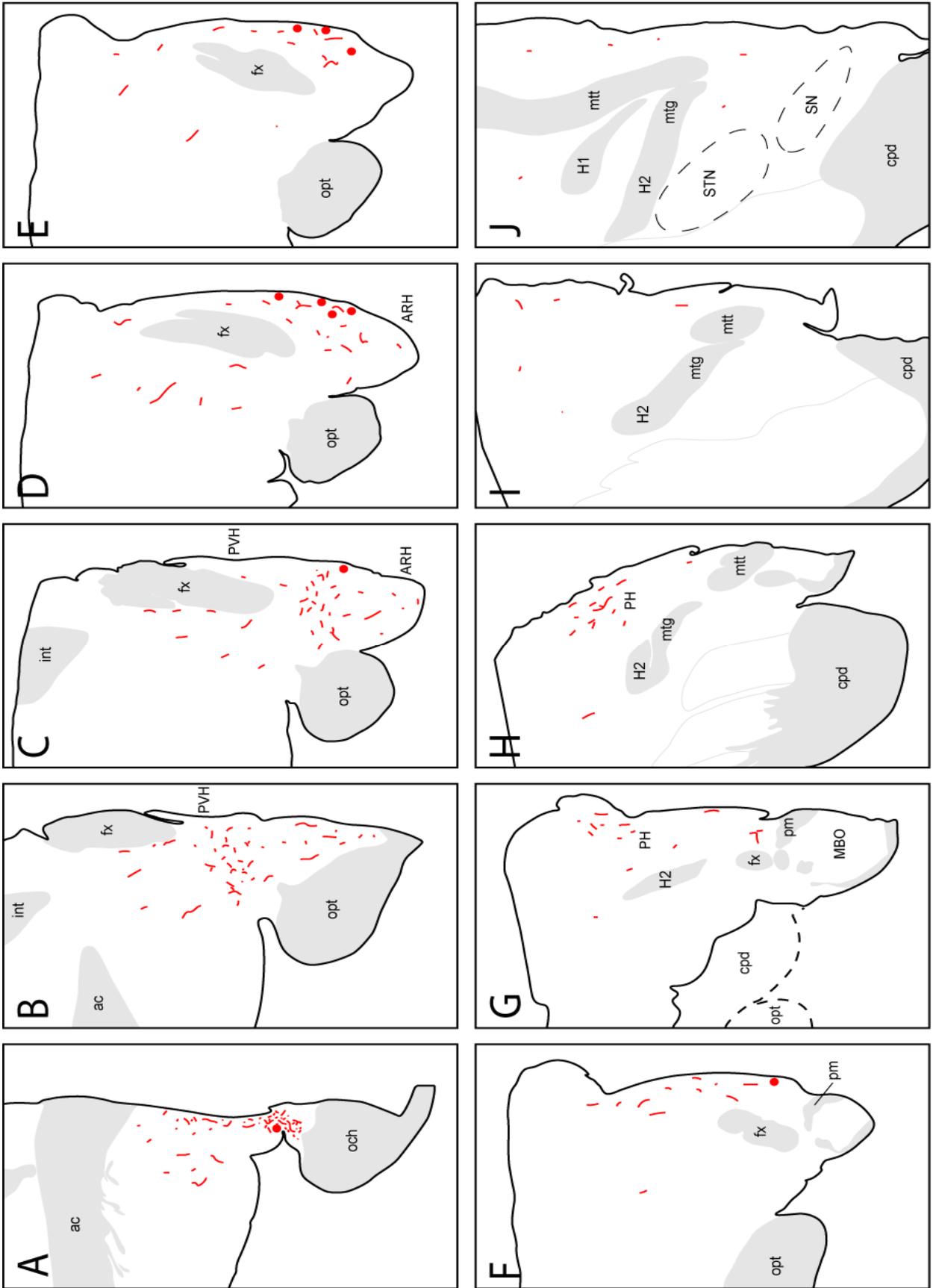
**Fig 19:** Distribution des neurones métaboliques sur des coupes frontales d'hypothalamus humain (enzymologie – complexes PAP).

**Fig 20 :**

Cartographie détaillée de la distribution des corps cellulaires (points rouges) et des fibres (traits rouges) marqués par l'anticorps commercial anti-hMet sur des coupes frontales (30µm) d'hypothalamus humain.

À noter que les coupes sont arrangées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (J).

Chaque point et chaque trait rouges représentent respectivement l'équivalent d'un corps cellulaire et d'une fibre marqués par l'anticorps anti-hMet.



**Fig 20:** cartographie de la distribution des neurones marqués par l'anticorps anti-hMet sur des coupes frontales d'hypothalamus humain disposées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (J).



Les fibres sont quant à elles abondamment représentées et très intensément marquées (Fig 19, B-C). Elles sont distribuées de façon diffuse dans l'hypothalamus avec une innervation plus abondante dans les territoires préoptiques et antérieurs (Fig 20). On retrouve également un groupe de fibres dans l'hypothalamus postérieur en transit vers le mésencéphale. Les fibres sont variqueuses et de calibre important.

### **1.3 DISTRIBUTION DES NEURONES À RFRP CHEZ LE RAT.**

L'étude de la distribution des neurones à RFRP a été réalisée uniquement par hybridation *in situ* sur des cerveaux de rats adultes mâles et femelles en utilisant une ribosonde marquée à la digoxygénine. La révélation enzymatique par la solution de NBT-BCIP fournit un marquage intense des corps cellulaires, ce qui a permis de visualiser l'aire de distribution précise de l'ARNm RFRP, exclusivement dans des structures hypothalamiques. Les corps cellulaires marqués sont de petite et moyenne taille (Fig 21). Ces neurones forment une petite famille : environ 2500 neurones RFRP ont été comptabilisés, estimation par cerveau entier (hypothalamus droit + gauche).

D'un point de vue général, la distribution de la population à RFRP ne présente pas de dimorphisme sexuel chez le rat. L'aire de distribution observée chez le mâle coïncide en tous points avec celle observée chez la femelle.

L'étude la distribution des neurones à RFRP a été réalisée selon l'axe rostrocaudal (Fig 22). Les premiers corps cellulaires sont retrouvés en petit nombre dans la zone subparaventriculaire (SBPV). Plus en arrière, on trouve des corps cellulaires dans l'aire ventrale périfornicale et la partie postérieure du noyau antérieur de l'hypothalamus (AHNp). Sur les coupes suivantes, ce noyau laisse la place au noyau dorsomédian (DMH) dans lequel quelques périkaryons sont trouvés. D'autres corps cellulaires sont localisés dans la partie intermédiaire du noyau périventriculaire (PVi) et le noyau arqué (ARH), alors qu'une grande quantité de neurones à RFRP est localisée dans la région dorsomédiane de la capsule du noyau ventromédian (cVMH). Plus caudalement, les neurones à RFRP sont localisés dans

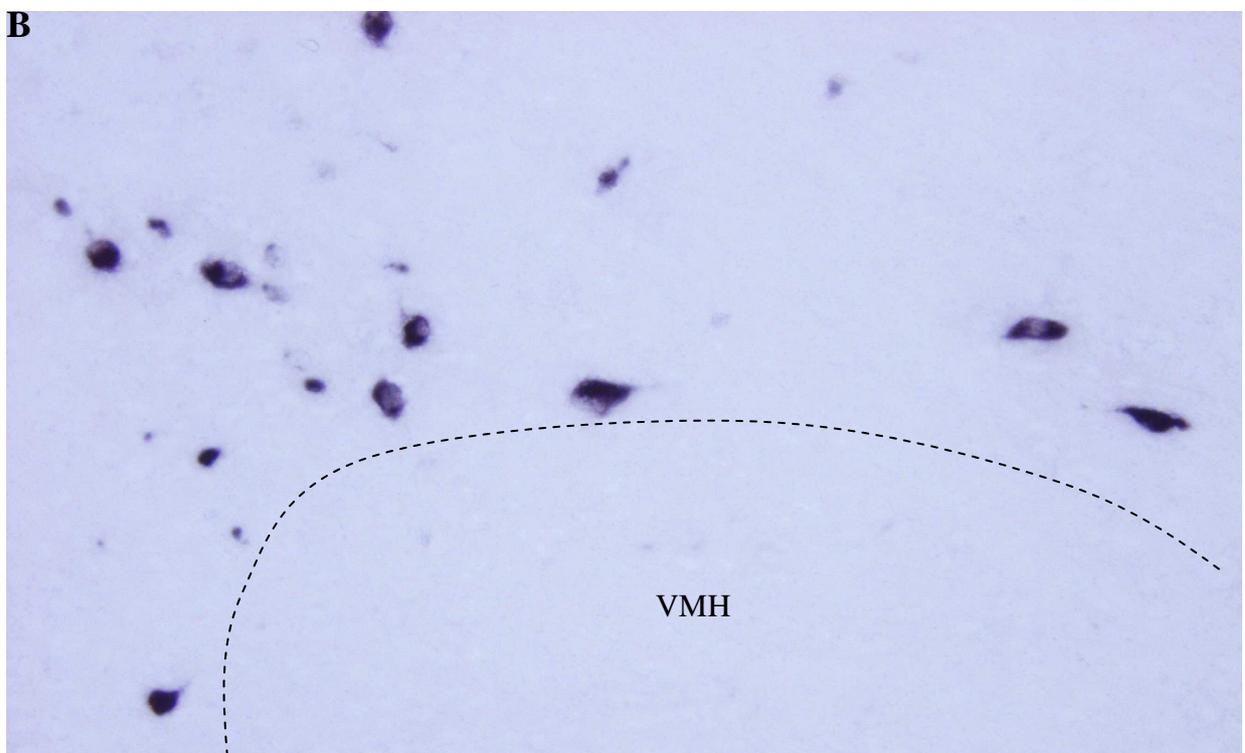
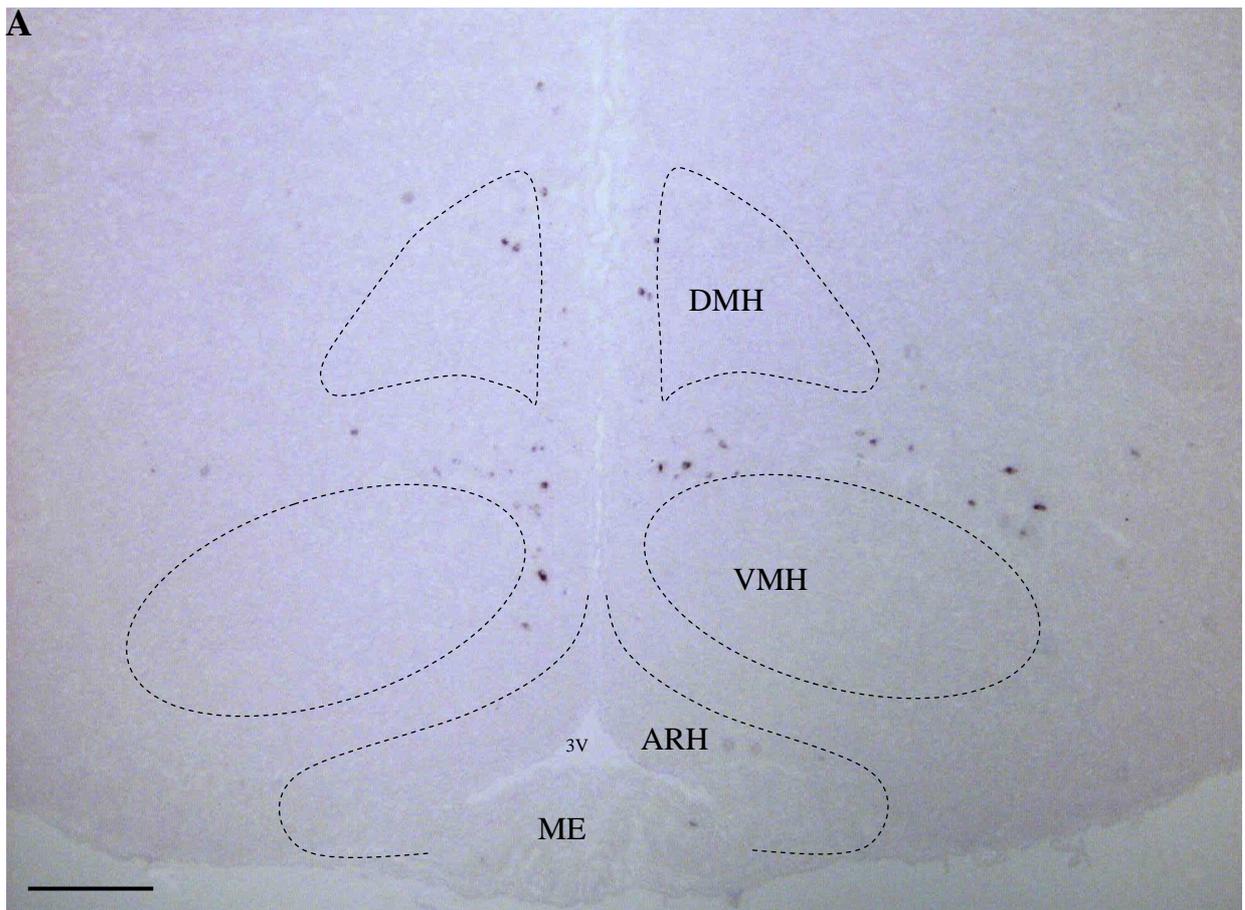
**Fig 21 :**

Photographies de neurones contenant l'ARNm RFRP sur une coupe frontale de cerveau de rat (niveau 29 de l'atlas de Swanson, 1992). Le marquage a été obtenu par hybridation *in situ*. Chaque tâche violacée correspond à un corps cellulaire.

(A) Cette photographie illustre le marquage de nombreux corps cellulaires dans la capsule du noyau ventromédian, entre les noyaux dorsomédian (DMH) et ventromédian (VMH), sur une coupe frontale de cerveau de rat.

(B) À plus fort grossissement, les corps cellulaires sont intensément marqués, et exclusivement retrouvés en-dehors du noyau ventromédian, plus particulièrement dans la capsule de ce noyau.

Barre d'échelle : (A) 150 $\mu$ m ; (B) 100 $\mu$ m



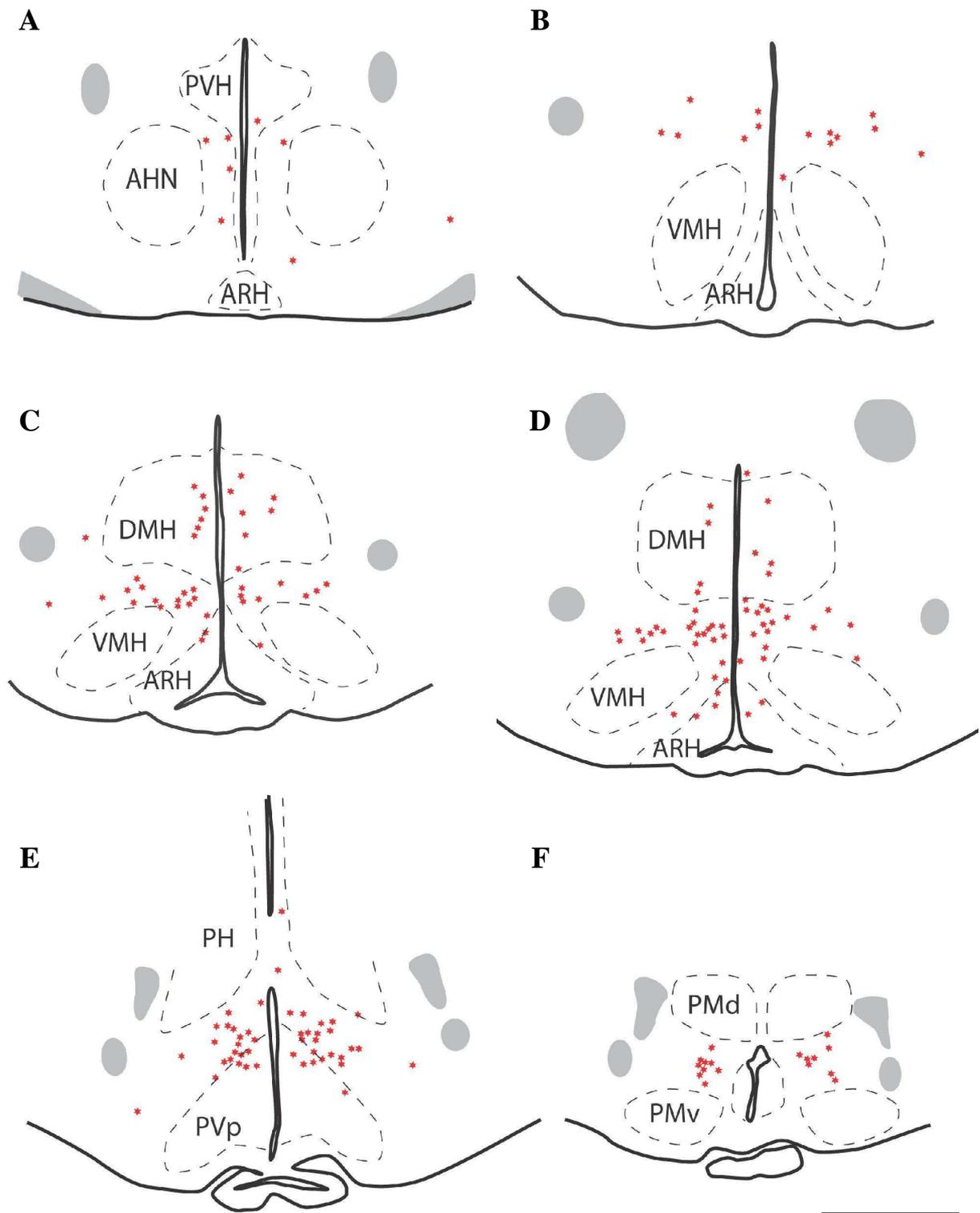
**Fig 21:** Distribution des neurones exprimant l'ARNm RFRP sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

**Fig 22 :**

Cartographie détaillée de la distribution des corps cellulaires (points rouges) contenant l'ARNm RFRP sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte, passant par l'hypothalamus. Chaque point représente l'équivalent d'un corps cellulaire RFRP-positif.

A noter que les coupes sont arrangées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (F).

Barre d'échelle = 1mm



**Fig 22:** Cartographie de la distribution des neurones contenant l'ARNm RFRP sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte arrangées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (F).

la partie postérieure et dorsale du noyau périventriculaire (PVp), dorsalement par rapport au noyau tubéromamillaire (TMd), ainsi que dans l'aire latérale de l'hypothalamus (LHA). Les derniers corps cellulaires contenant l'ARNm RFRP sont localisés entre les noyaux prémamillaires ventral (PMv) et dorsal (PMd).

#### **1.4 CONFRONTATION DES MARQUAGES RFRP ET MÉTASTINE: CONTRÔLE DE LA SPÉCIFICITÉ DE L'ANTICORPS ANTI-HMET.**

Des doubles marquages par combinaison des techniques d'hybridation *in situ* pour RFRP et d'immunohistochimie avec l'anticorps commercial hMet pour la métastine ont été réalisés. Les neurones marqués par hybridation *in situ* sont également tous marqués en immunohistochimie (Fig 23, A-C).

La spécificité de l'anticorps commercial anti-métastine vis-à-vis de RFRP, a été vérifiée par incubation de l'anticorps avec des concentrations croissantes du peptide synthétique RFRP-1. Pour des concentrations de peptide RFRP-1 comprises entre 0,1 et 1nM par  $\mu\text{L}$  d'anticorps pur, une inhibition partielle du marquage fourni par l'anticorps est obtenue. L'inhibition totale du marquage est obtenue pour une concentration de peptide RFRP-1 égale à 10nM par  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-métastine pur (Fig 23, D-E). À cette concentration, le marquage de corps cellulaires dans l'hypothalamus ainsi que les fibres de fort calibre n'était plus visible. Par contre, les fibres de fin calibre, notamment dans le noyau parabrachial ou les périkaryons du noyau du tractus solitaire, n'étaient pas affectées.

#### **1.5 NEURONES NEUROENDOCRINES**

Les neurones révélés par l'anticorps dirigé contre la métastine humaine hMet sont en grande majorité en position périventriculaire. Par ailleurs, les peptides RFamide, et en particulier la métastine et RFRP, sont impliqués dans le contrôle de nombreuses activités neuroendocrines.

Après injection de traceur rétrograde fluorogold par voie vasculaire, celui-ci est capté par les terminaisons axonales localisées dans l'éminence médiane, et s'accumule dans les corps cellulaires des neurones neuroendocrines. Ces cellules sont observées dans l'aire préoptique médiane ventrale (MPO), le noyau préoptique suprachiasmatique (PSCH), le noyau périventriculaire préoptique (PVpo), le noyau supraoptique (SO), les cellules magnocellulaires du noyau paraventriculaire (PVHam), le noyau périventriculaire antérieur (PVa), les aires parvocellulaire et périventriculaire du noyau paraventriculaire (PVHap et PVHpv), le noyau supraoptique rétrochiasmatique (SOr), le noyau antérieur de l'hypothalamus (nucleus circularis) et le noyau arqué (ARH). Les techniques de doubles marquages immunohistochimiques en utilisant l'anticorps dirigé contre la métastine humaine n'ont révélé aucune cellule neuroendocrine doublement marquée FG-hMet. De plus, très peu de cellules neuroendocrines sont innervées. Ces cellules sont localisées dans l'hypothalamus antérieur, plus particulièrement dans les noyaux préoptique suprachiasmatique, supraoptique, périventriculaire et paraventriculaire. Quelques rares cellules innervées sont distribuées dans le noyau arqué (Fig 24).

## **1.6 CO-DISTRIBUTION AVEC MCH, HCRT, TH, SRIF ET GNRH**

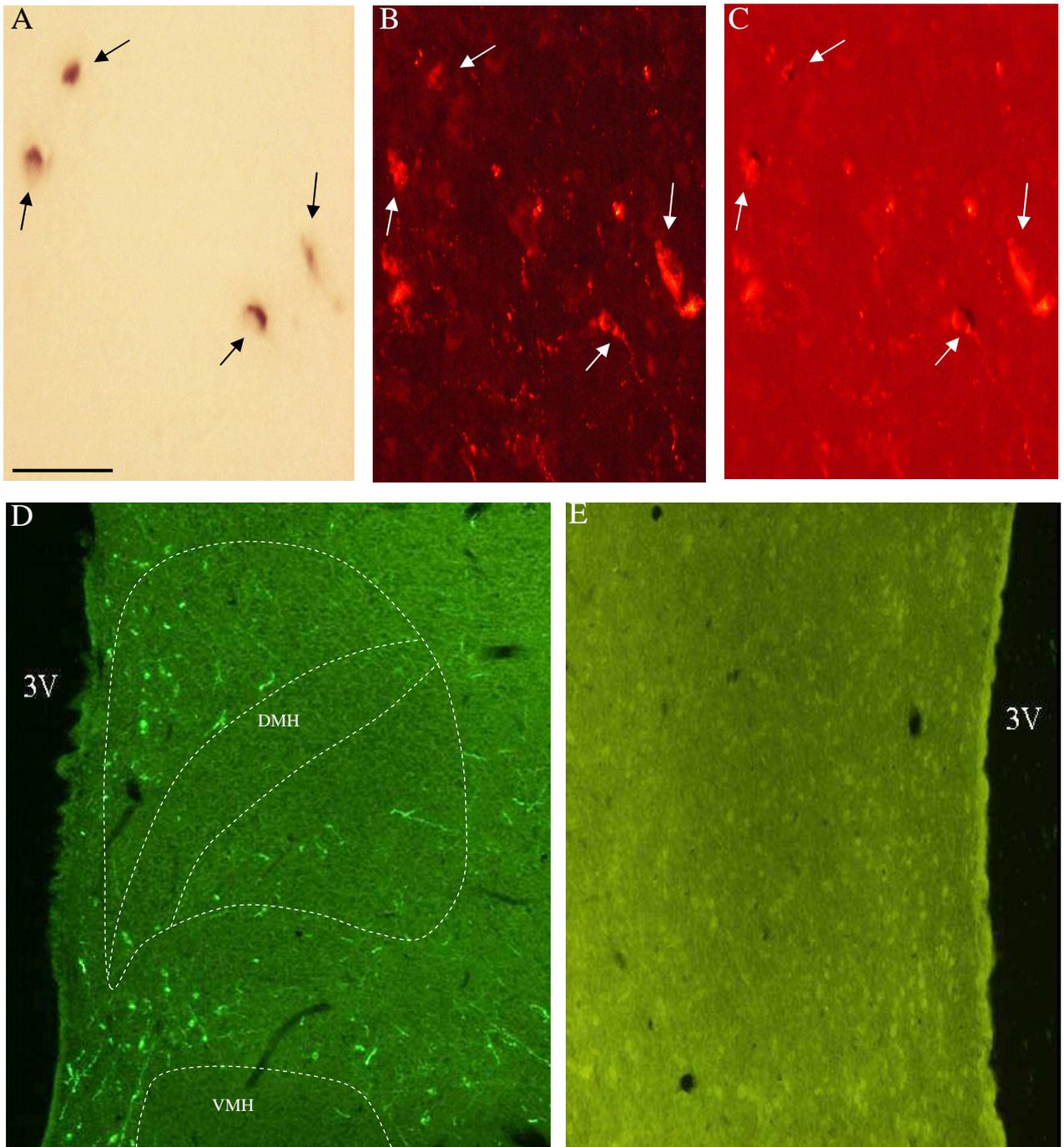
De nombreuses autres populations de neurones sont localisées dans les territoires d'intérêt, dont des périkaryons des populations MCH et Hcrt qui sont étudiées au laboratoire depuis de nombreuses années. Certains neurones de ces populations peuvent exprimer d'autres neuropeptides et être localisés préférentiellement dans certaines structures, par exemple MCH-CART dans la partie rostromédiane de la zona incerta. D'après les aires de distribution de RFRP et MCH/Hcrt, mais aussi d'autres populations neuronales (TH et SRIF), il nous est apparu important de vérifier si RFRP pouvait être exprimé avec ces peptides et enzymes. Enfin, RFRP étant dans la littérature relié -au moins fonctionnellement- à l'axe gonadotrope, nous avons également tenté de vérifier d'éventuels liens anatomiques entre le système gonadotrope (GnRH) et les périkaryons à RFRP. Pour ce faire,

**Fig 23 :**

(A,B,C) Observation microscopique de corps cellulaires contenant l'ARNm RFRP (A) et de ceux exprimant le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet (B). La superposition (C) des deux premières images indique une co-expression dans les mêmes corps cellulaires. À noter que tous les corps cellulaires contenant l'ARNm RFRP expriment également le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet.

(D-E) Photographies de corps cellulaires et de fibres marquées par l'anticorps anti-hMet avant (D) et après incubation(E) de l'anticorps avec 10nM de peptide RFRP-1. Le marquage des corps cellulaires et des fibres épaisses n'est plus présent pour cette concentration de peptide RFRP-1.

Barre d'échelle = 100µm



**Fig 23:** Photographies des neurones contenant l'ARNm RFRP et des neurones exprimant le marquage fourni par l'anticorps anti-hMet par double marquage hybridation *in situ* / immunohistochimie, sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

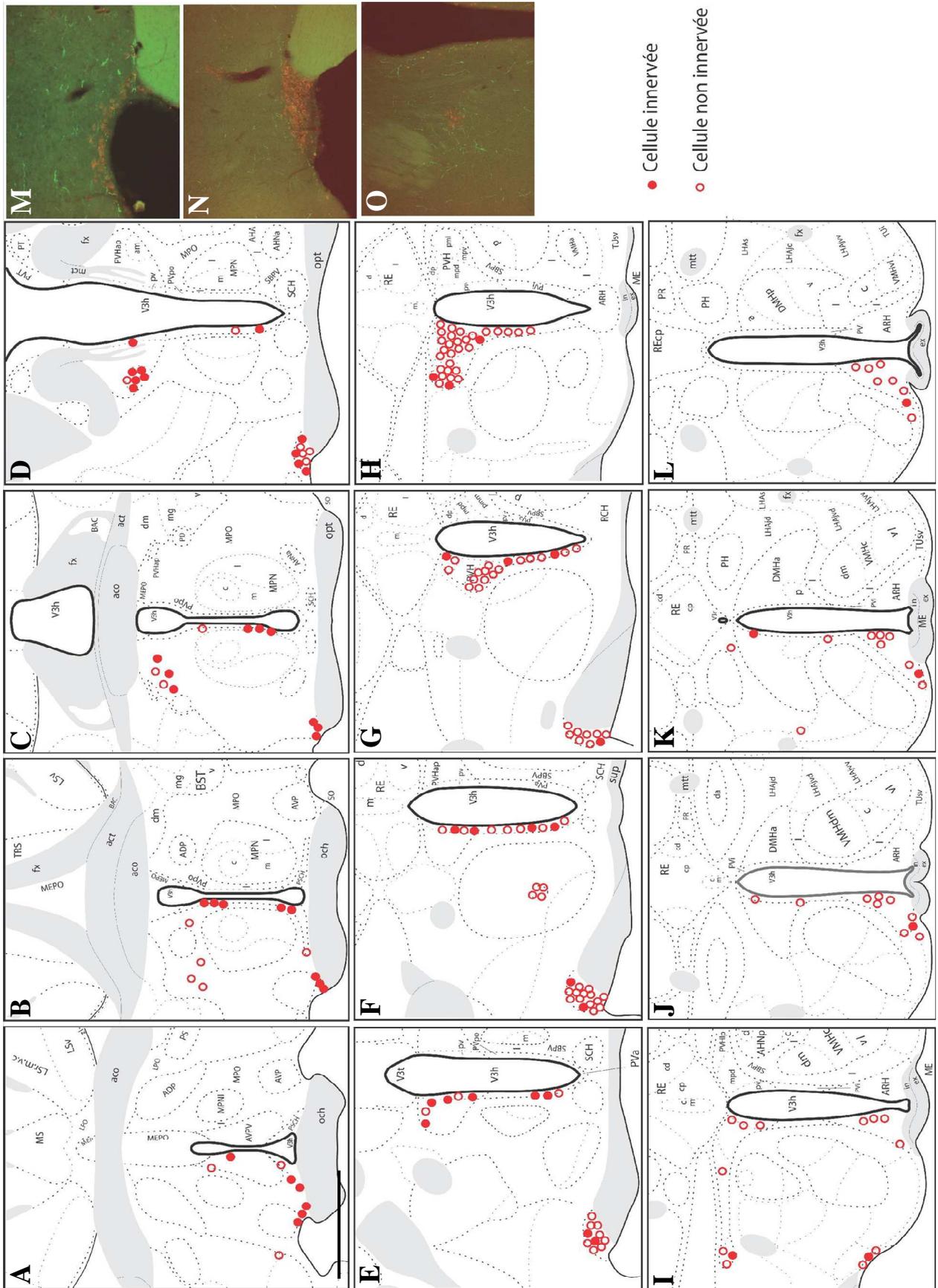
**Fig 24 :**

(A-L) Cartographie détaillée de la distribution des corps cellulaires ayant internalisé le traceur fluorogold (points et cercles rouges) sur des coupes frontales de cerveau de rat. Certains périkaryons FG+ sont innervés (points rouges) par des fibres marqués par l'anticorps anti-hMet.

À noter que les coupes sont arrangées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (L).  
Chaque point l'équivalent d'un corps cellulaire.

(M-O) Photographies de double marquage immunohistochimique FG+ (rouge) et anti-hMet+ (vert) sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte passant par l'hypothalamus.

Barre d'échelle : (A,L) 1mm ; (M-O) 500µm



**Fig 24:** Cartographie de la distribution des neurones neuroendocrines; confrontation avec les neurones marqués par l'anticorps anti-hMet



nous avons combiné les techniques d'hybridation *in situ* pour RFRP aux techniques d'immunohistochimie pour MCH, Hcrt, TH, SRIF et GnRH.

### **1.6.1 COMPARAISON AVEC MCH ET Hcrt**

Les neurones des deux populations MCH et Hcrt sont majoritairement localisés dans l'hypothalamus latéral tubéral. Les premiers sont aussi abondamment observés dans la région rostromédiane de la zona incerta. Cependant, les aires de distribution des deux populations s'étendent dans les territoires hypothalamiques plus périventriculaires, notamment dans la capsule du noyau ventromédian. La comparaison de la distribution des neurones à RFRP avec ceux de ces deux populations peptidergiques montrent que les premiers neurones de chacune d'entre elles sont observés au même niveau de coupes antéropostérieures, et les corps les plus caudaux sont observés au même niveau dans la partie postérieure du noyau périventriculaire (Fig 25). Cependant, par double marquage, aucune co-expression des signaux par hybridation *in situ* pour RFRP et des signaux immunohistochimiques pour MCH et Hcrt n'a été observée. De nombreuses images de périkaryons adjacents suggérant des accollements ont été observées essentiellement dans la capsule du noyau ventromédian et dans le noyau périventriculaire, confirmant la colocalisation –au moins partielle- des populations. Enfin, des fibres marquées par l'anticorps anti-MCH ont souvent été observées au contact de périkaryons RFRP, suggérant une innervation.

### **1.6.2 COMPARAISON AVEC TH ET SRIF**

De façon similaire à la comparaison réalisée avec les populations de neurones à MCH et Hcrt, la combinaison des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie a permis de visualiser d'éventuelles interactions entre les neurones à RFRP et ceux contenant l'enzyme de synthèse de la dopamine (la tyrosine hydroxylase) et la somatostatine.

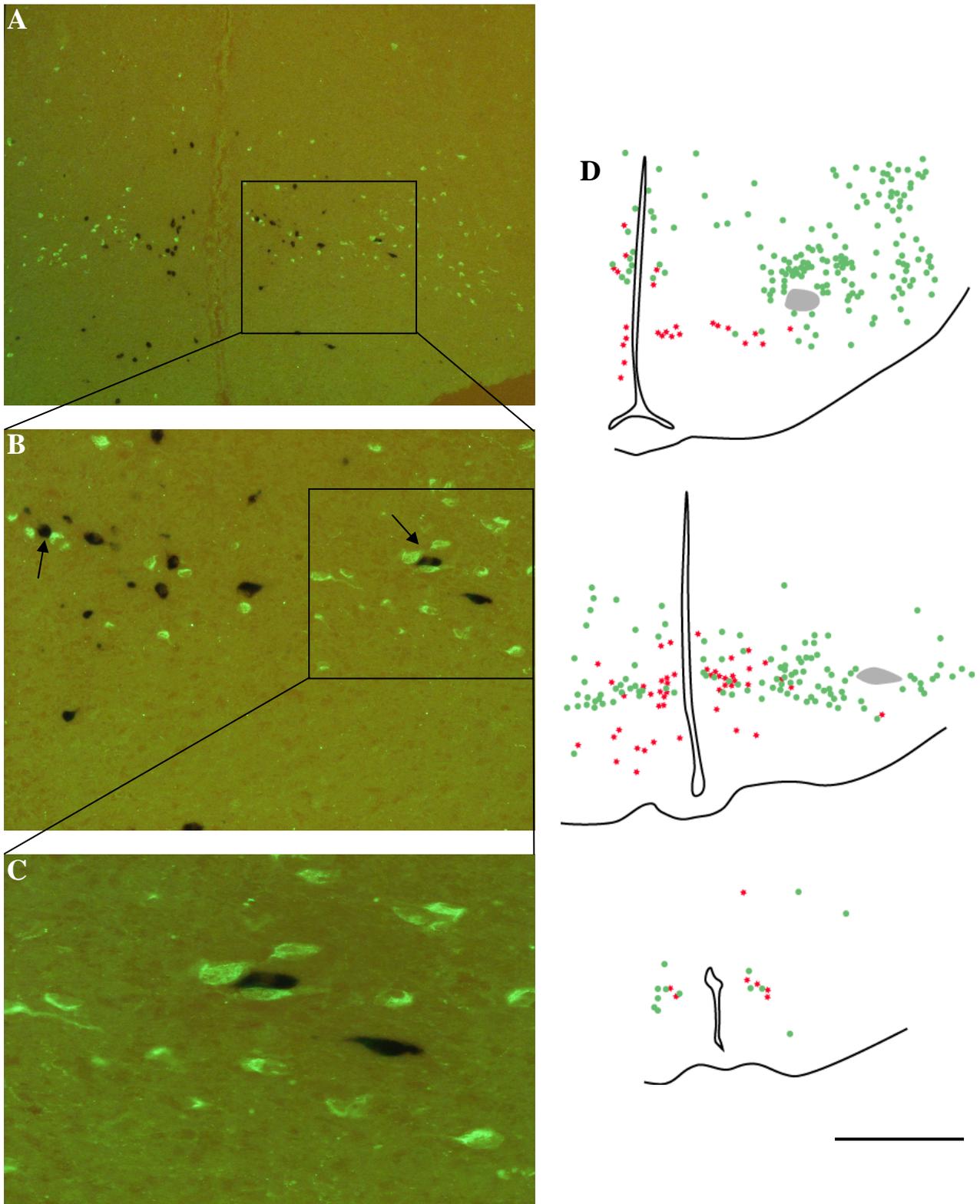
**Fig 25 :**

(A,B,C) Photographies de doubles marquages par immunohistochimie (MCH, vert) et hybridation *in situ* (ARNm RFRP, noir) sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte passant par l'hypothalamus. C est un grossissement de B, lui-même étant un grossissement de A.

Chaque point vert ou noir représente l'équivalent d'un corps cellulaire. Certains corps cellulaires exprimant la MCH (flèches en B) sont localisés en étroite apposition avec les corps cellulaires RFRP-positifs sans co-expression.

(D) Dessins de coupes frontales de cerveau de rat adulte passant par la partie caudale de l'hypothalamus tubéral, et arrangées selon l'axe rostrocaudal. En vert, est représentée la distribution des corps cellulaires MCH-positifs. Les périkaryons RFRP-positifs sont figurés en rouge.

Barre d'échelle : (A,B) 500 $\mu$ m ; (C) 150 $\mu$ m ; (D) 1mm



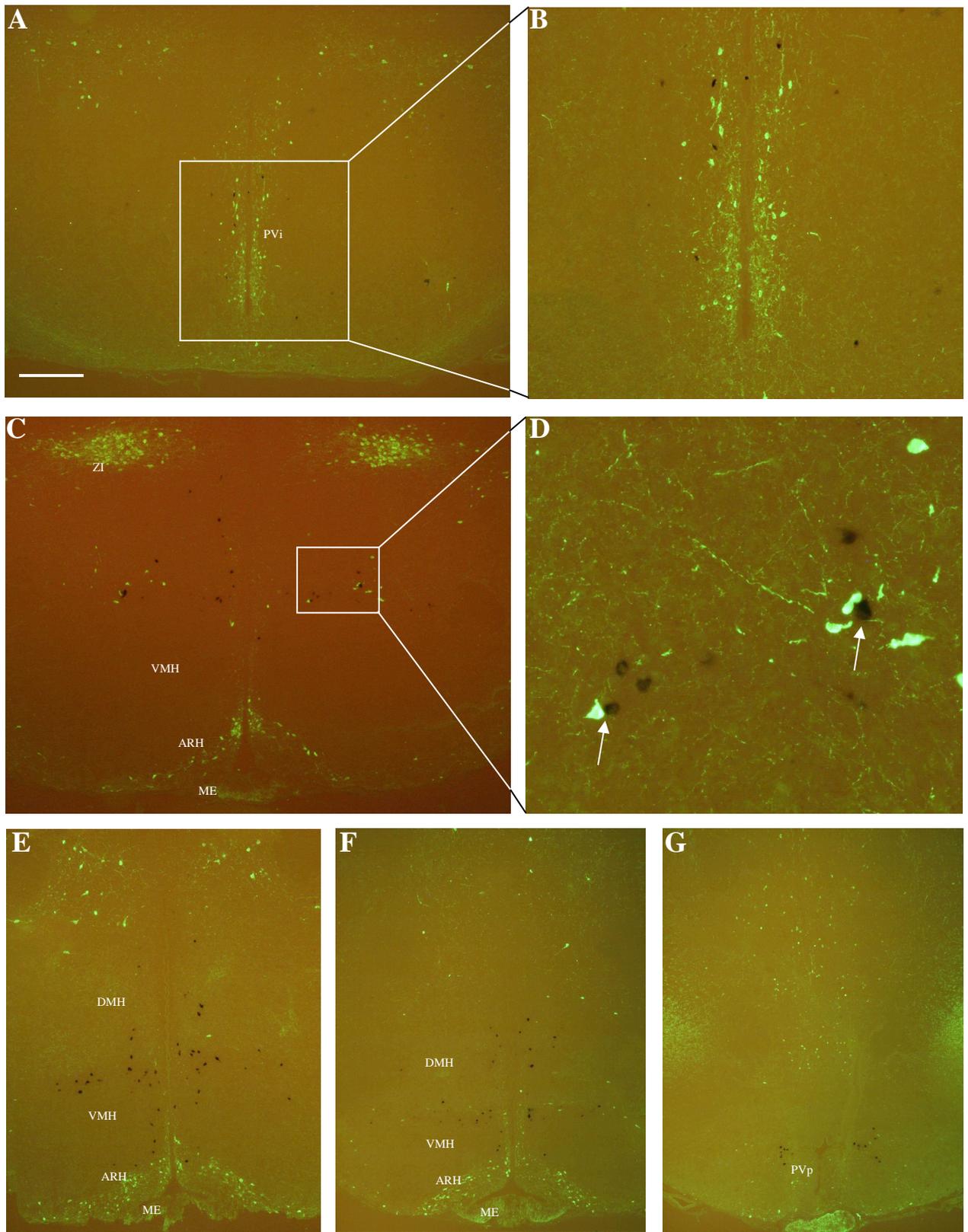
**Fig 25:** Confrontation des distributions des neurones contenant l'ARNm RFRP et des neurones à MCH sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

**Fig 26 :**

Photographies de doubles marquages par immunohistochimie (TH, vert) et hybridation *in situ* (ARNm RFRP, noir) sur des coupes frontales de cerveau de rat adulte passant par l'hypothalamus et arrangées du niveau le plus rostral (A) au niveau le plus caudal (G). B est un fort grossissement de l'encadré en A, et D un fort grossissement de l'encadré en C.

Chaque point vert ou noir représente l'équivalent d'un corps cellulaire. Certains corps cellulaires exprimant la TH (flèches en D) sont localisés en étroite apposition avec les corps cellulaires RFRP-positifs sans co-expression.

Barre d'échelle : (A,C,D,E,F,G) 500 $\mu$ m ; (B) 100 $\mu$ m



**Fig 26:** Confrontation des distributions des neurones contenant l'ARNm RFRP et des neurones à TH sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

La distribution des neurones dopaminergiques est assez complexe. Ils se distribuent en différents groupes selon leur aire de distribution hypothalamique : groupe A11 dans l'hypothalamus postérieur, A12 dans le noyau arqué, A13 dans la partie rostromédiane de la zona incerta, et A14 dans la partie antérieure du noyau périventriculaire (Hökfelt *et al.*, 1984). La comparaison des aires de distribution a montré que les neurones dopaminergiques étaient préférentiellement localisés dans la partie rostrale de l'aire de distribution des neurones RFRP, plus particulièrement dans la partie antérieure du noyau périventriculaire (Fig 26). Des neurones dopaminergiques de la partie caudale du groupe A14 ainsi que des boutons sont observés en étroite apposition avec les corps cellulaires RFRP. En arrière, peu de corps cellulaires dopaminergiques sont observés dans la capsule du noyau ventromédian, où est exprimée la majorité des neurones à RFRP. Aucun contact n'a été observé entre les neurones à RFRP et les neurones des groupes A11, A12 et A13.

Les périkaryons producteurs de la somatostatine (SRIF) sont majoritairement observés dans la partie antérieure du noyau périventriculaire (Fig 27). Dans ce noyau, quelques corps cellulaires RFRP sont observés. Aucun ne présente le marquage immunohistochimique fourni par l'anticorps anti-SRIF. En revanche, des fibres immunoréactives ont été observées au contact des périkaryons RFRP. Ces contacts semblent plus fréquents sur les neurones RFRP des noyaux périventriculaire et arqué. Les projections somatostatinergergiques fournissent une innervation extrêmement abondante du noyau ventromédian, ce qui a aussi permis de clairement vérifier la localisation des périkaryons RFRP dans la capsule de ce noyau.

### **1.6.3 COMPARAISON AVEC GnRH**

Un certain nombre d'études chez les mammifères et les oiseaux suggère l'implication des neurones à RFRP dans le contrôle de l'axe gonadotrope, d'où son autre nom GnIH 'gonadotropin-inhibitory hormone'. L'utilisation d'un anticorps anti-GnRH a permis le marquage de corps cellulaires dans la

région préoptique ventrale et des fibres transitant dans une voie ventrale ou périventriculaire. Par les techniques de double marquage, très peu d'images montrent un rapprochement entre ces fibres et les périkaryons RFRP (Fig 28).

## **1.7 CONCLUSION**

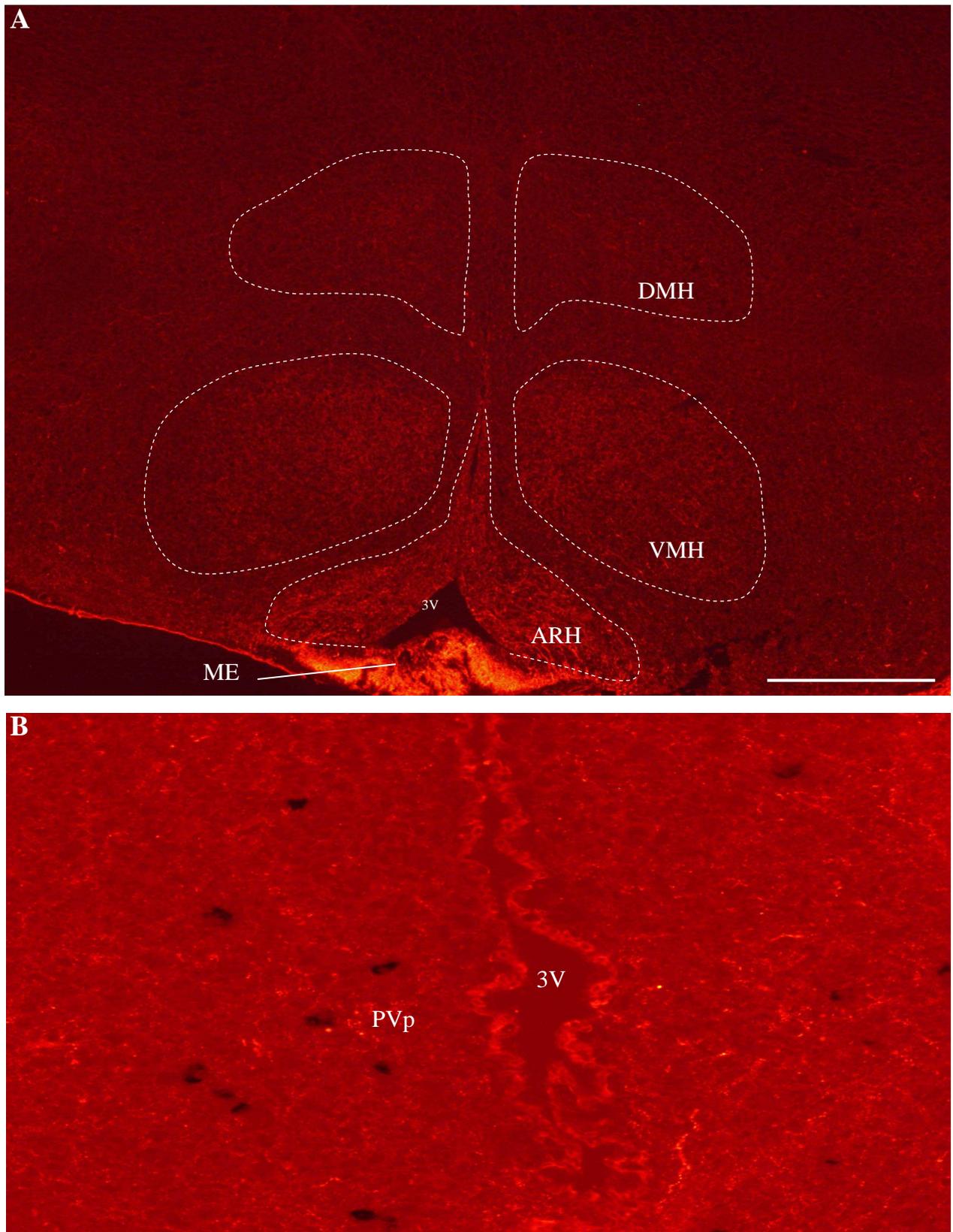
Dans cette première partie, nous avons montré que l'anticorps commercial dirigé contre la métastine humaine n'était pas spécifique de la population de neurones méstastinergiques mais marquait également d'autres populations de neurones, notamment celle productrice du peptide RFRP, dans des régions hypothalamiques d'intérêt au laboratoire depuis de nombreuses années : la 'zone à MCH'. L'étude de la distribution des neurones à RFRP a montré qu'elle était exprimée dans des noyaux exclusivement hypothalamiques, plus particulièrement et massivement dans la capsule du noyau ventromédian. Dans ces noyaux, sont aussi exprimés d'autres populations de neurones productrices de peptides (MCH, Hcrt, SRIF, GnRH) et enzymes (TH) déjà étudiées au laboratoire. Je ne reviendrai pas sur la distribution détaillée de chacune de ces populations. Cependant, nos études de double marquage ont montré que la population de neurones à RFRP forme une condensation cellulaire unique, pouvant interagir avec les neurones à MCH et TH pour lesquels des accolements entre corps cellulaires ont été observés. De plus, les doubles marquages RFRP-GnRH ainsi que les injections de traceur fluorogold ne nous ont pas permis de vérifier un rôle neuroendocrine majeur des neurones à RFRP. Ainsi, nous avons décidé de poursuivre l'étude de la population de neurones à RFRP, avec des approches plus morphofonctionnelles.

**Fig 27 :**

Photographies de doubles marquages par immunohistochimie (SRIF, rouge) et hybridation *in situ* (ARNm RFRP, noir) sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

Chaque point noir représente l'équivalent d'un corps cellulaire. Aucun corps cellulaire contenant l'ARNm RFRP ne présente le marquage de l'anticorps anti-SRIF. Cependant, des fibres immunoréactives somatostatinerigiques sont localisées en contact étroit avec des corps cellulaires RFRP-positifs dans les noyaux hypothalamiques périventriculaire et arqué.

Barre d'échelle : (A) 500 $\mu$ m ; (B) 150 $\mu$ m



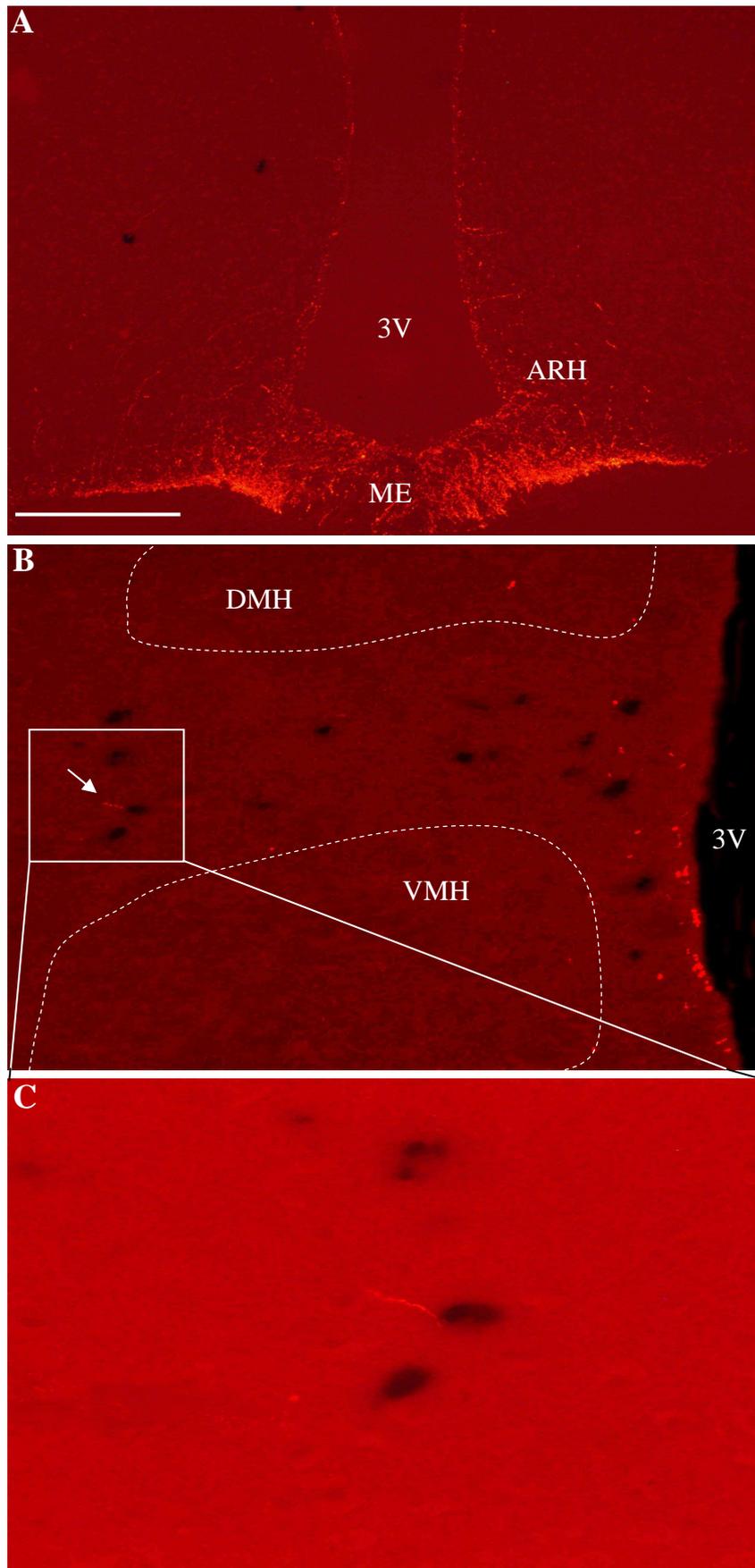
**Fig 27:** Confrontation des distributions des neurones contenant l'ARNm RFRP et des neurones somatostatinerigiques sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.

**Fig 28 :**

Photographies de doubles marquages par immunohistochimie (GnRH, rouge) et hybridation *in situ* (ARNm RFRP, noir) sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte. C est un fort grossissement de l'encadré en B.

Chaque point noir représente l'équivalent d'un corps cellulaire. Aucun corps cellulaire contenant l'ARNm RFRP ne présente le marquage de l'anticorps anti-GnRH. Cependant, de très rares fibres à GnRH sont localisées en contact étroit avec des corps cellulaires RFRP-positifs (flèche en B).

Barre d'échelle : (A) 500 $\mu$ m ; (B) 150 $\mu$ m ; (C) 200 $\mu$ m



**Fig 28:** Confrontation des distributions des neurones contenant l'ARNm RFRP et des neurones à GnRH sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat adulte.



# **2<sup>ème</sup> PARTIE**

## **ÉTUDE DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RFRP**

Nous avons vu précédemment que les neurones producteurs de l'ARNm RFRP sont localisés dans un territoire qui borde médialement la 'zone à MCH'. Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur cette 'zone' et tout naturellement, il nous est apparu indispensable d'entamer des travaux complémentaires de ceux en cours concernant les neurones à MCH et à Hcrt. Certains de ces travaux ont déjà été partiellement reportés dans l'introduction ; brièvement, ils s'orientent autour de trois directions :

-le développement : nous avons vu que les deux sous-populations de neurones à MCH et celle à hypocrépine sont générées en vagues successives (Brischoux *et al.*, 2002 ; Amiot *et al.*, 2005).

-les connexions : des travaux plus anciens ont permis d'identifier certains des circuits impliquant ces neurones (Bayer *et al.*, 1999 ; Cvetkovic *et al.*, 2003).

-les fonctions : nous avons tenté d'identifier des conditions expérimentales modifiant l'expression de MCH ou Hcrt (Griffond *et al.*, 1998, 1999 ; Hervé *et al.*, 1998) notamment en liaison avec le contrôle de la balance énergétique.

Afin de compléter ces données précédentes, nous avons poursuivi nos investigations dans les trois directions correspondantes suivantes : tout d'abord, nous avons analysé le développement de la population à RFRP, en mettant l'accent sur la genèse des neurones contenant ce peptide en utilisant la technique du BrdU. Ensuite, en combinant une technique de traçage antérograde des voies nerveuses avec la détection des neurones à RFRP par hybridation *in situ*, nous avons tenté de mettre en évidence certaines des afférences à ces neurones. Enfin, nous avons recherché des variations de l'expression de l'ARNm RFRP dans diverses conditions expérimentales. Beaucoup des résultats obtenus et présentés ci-après ne sont que préliminaires et nécessitent des études plus approfondies.

## **2 ÉTUDE ONTOGÉNÉTIQUE ET MORPHOFONCTIONNELLE DES NEURONES À RFRP**

Comme indiqué dans le chapitre précédent, parce que les neurones à RFRP sont localisés dans l'hypothalamus tubéral, dans les territoires les plus médians de ce que nous avons appelé la 'zone à MCH', nous avons entamé des études ontogénétiques afin de compléter les études déjà réalisées au laboratoire concernant le développement des populations neuronales de ce territoire, et en particulier les travaux liés à la neurogenèse des populations spécifiques de ce segment hypothalamique (MCH, Hcrt).

### **2.1 ONTOGENÈSE DU SYSTEME À RFRP**

#### **2.1.1 GENÈSE DES NEURONES À RFRP**

Puisque non établie dans la littérature, nous nous sommes donc intéressés à la neurogenèse de la population de neurones à RFRP en combinant les techniques d'hybridation *in situ* (pour RFRP) avec la méthode du BrdU. Les cerveaux de la descendance mâle de femelles injectées à différents temps de gestation, entre le 11<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour (E11 à E16), ont été examinés. Les cerveaux ont été débités en séries de coupes de 10µm d'épaisseur, et seules les coupes passant par l'hypothalamus ont été étudiées. Le BrdU est un analogue de la thymidine endogène, qu'il remplace lors de son incorporation dans l'ADN en cours de synthèse (phase S du cycle cellulaire).

Le marquage obtenu est un marquage exclusivement nucléaire. Il est plus ou moins intense selon le nombre de divisions qu'ont subi les cellules après avoir incorporé le BrdU. Les cellules les plus fortement marquées ont incorporé le BrdU pendant la phase de réplication du dernier cycle cellulaire avant différenciation, alors que les cellules dont le marquage est le plus faible ou fragmenté se sont divisées une ou plusieurs fois après l'incorporation. De fait, nous nous sommes intéressés aux seules cellules dont le marquage nucléaire était le plus intense afin de déterminer la date de naissance des neurones à RFRP (Fig 29).

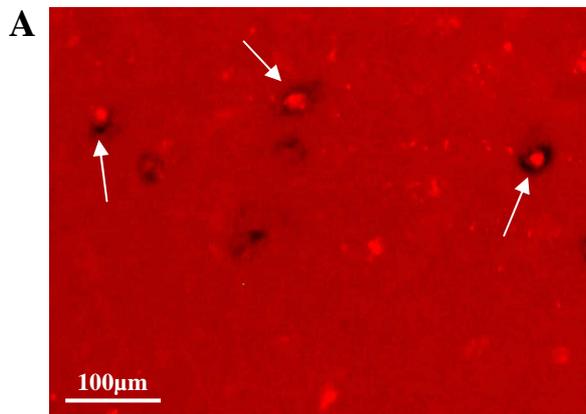
**Fig 29 :**

Cette figure illustre la genèse des neurones à RFRP.

(A) Photographie de corps cellulaires doublement marqués contenant l'ARNm RFRP et le marquage immunohistochimique fourni par l'anticorps anti- BrdU.

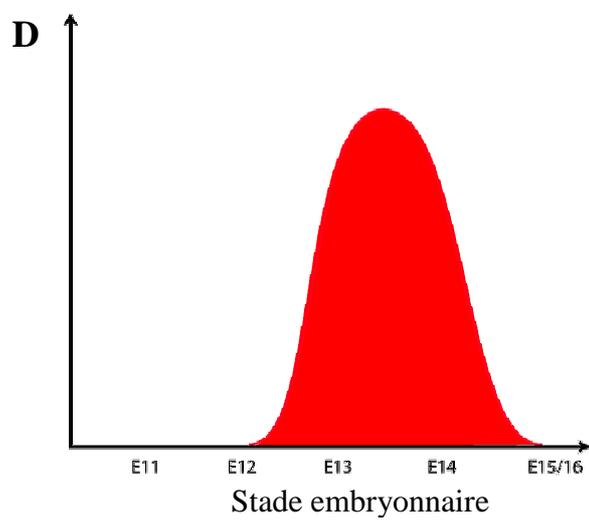
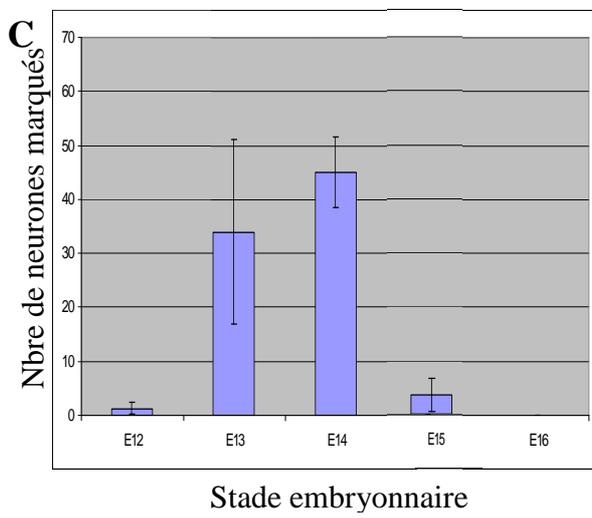
(B) Tableau de comptage du nombre de corps cellulaires doublement marqués RFRP+/BrdU+. À noter que seuls les corps les plus intensément marqués (flèches en A) ont été comptabilisés.

(C) Histogramme de représentation du comptage des corps cellulaires RFRP+/BrdU+, conduisant au pic de genèse des neurones à RFRP (D), centré sur les stades embryonnaires E13-E14.



**B**

Stade embryonnaire	Neurones RFRP+ / BrdU+
E12	1 ( $\pm 1.00$ )
E13	34 ( $\pm 17.08$ )
E14	45 ( $\pm 6.65$ )
E15	3 ( $\pm 3.00$ )
E16	0



**Fig 29:** Genèse des neurones à RFRP.

Les périkaryons doublement marqués (Fig 29, A) sont détectés massivement chez les animaux ayant reçu l'injection aux 13<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours de vie embryonnaire. Quelques rares corps cellulaires doublement marqués sont détectés aux stades E12 et E15. Aucune cellule doublement marquée n'a été détectée aux stades E11 et E16 (Fig 29, B-C).

La neurogenèse des neurones à RFRP s'étale donc entre E12 et E15, avec un pic unique de neurogenèse présentant un maximum de neurones à RFRP générés aux stades E13-E14 (Fig 29, D).

### **2.1.2 ONTOGENÈSE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm RFRP**

Par des techniques d'hybridation *in situ*, les premiers ARNm RFRP ont été détectés au 3<sup>ème</sup> jour de vie post-natale P3. La majorité des corps cellulaires est distribuée à proximité du 3<sup>ème</sup> ventricule. Le nombre de neurones à RFRP augmente avec l'âge des animaux jusqu'à un maximum au 6<sup>ème</sup> jour de vie post-natale. Les neurones sont progressivement distribués dans les structures hypothalamiques de façon similaire à celles observées à l'âge adulte, à savoir le noyau périventriculaire et la capsule du noyau ventromédian.

## **2.2 APPROCHE HODOLOGIQUE ET ÉTUDE MORPHOFONCTIONNELLE DU SYSTÈME RFRP**

### **2.2.1 AFFÉRENCES DES NEURONES À RFRP**

Les données de la littérature concernant les afférences à la capsule du noyau ventromédian sont rares. Cette région est en général associée au noyau lui-même. Les dendrites des corps cellulaires étant aussi observées à l'extérieur des frontières cytoarchitectoniques du noyau, des projections dans la capsule ont souvent été considérées comme des afférences au noyau lui-même (Millhouse, 1978). Cependant, l'existence de neurones dans cette capsule, et n'ayant aucune relation anatomique claire avec le noyau lui-même, suggère que cette structure est une entité neurologique.

D'après la littérature, au moins deux structures innervent la capsule du noyau ventromédian : le noyau latéral du septum (LS) et le noyau antérieur de l'hypothalamus (AHN) (Fig 30).

### **2.2.1.1 LE NOYAU ANTÉRIEUR DE L'HYPOTHALAMUS**

Le noyau antérieur de l'hypothalamus est divisé en trois parties appelées antérieure, centrale et postérieure (Risold *et al.*, 1994). D'un point de vue général, seules des injections dans les parties centrale et postérieure de ce noyau (Fig 30, A) révèlent une innervation massive de la capsule du noyau ventromédian, alors que les projections issues de la partie antérieure et irrigant cette capsule sont peu nombreuses. Ces fibres sont très variqueuses et présentent un grand nombre de boutons. Toutefois, il est à noter que bien qu'extrêmement dense, l'innervation depuis le noyau antérieur n'est pas spécifique de la capsule. En effet, de nombreuses fibres sont également observées dans le noyau ventromédian, et plus particulièrement dans ses parties dorsomédiane et centrale (Fig 30, C). Ainsi, le territoire d'innervation depuis le noyau antérieur implique à la fois la capsule et le noyau ventromédian lui-même, sans marquer la frontière entre ces deux structures.

Les autres projections issues des sites d'injection à partir desquels les projections sur la capsule du noyau ventromédian sont notées, peuvent être résumées brièvement. Dans le télencéphale, les noyaux latéral du septum (LS), de la strie terminale (BST) et médial de l'amygdale (MEA) sont les plus densément innervés avec un grand nombre de boutons de passage observés sur ces fibres. Une innervation modérément dense est observée dans la substance innominée (SI) et l'aire préoptique latérale (LPO). Quelques fibres sont trouvées dans le noyau médian du septum (MS) et le noyau de la bande diagonale (NDB), avec peu de boutons. Plus en arrière, les noyaux latéral et médian du septum laissent progressivement la place au noyau septofimbrial (SF) où quelques fibres sont observées.

Dans les aires préoptiques médiane (MPO) et latérale (LPO), et l'aire hypothalamique antérieure (AHA), un grand nombre de fibres sont aussi observées. En arrière, la zone subparaventriculaire de

l'hypothalamus (SBPV), la partie ventrolatérale de l'aire hypothalamique latérale (LHA) et le noyau antérieur présentent une innervation modérément dense. Quelques fibres sont trouvées dans le noyau paraventriculaire (PVH). La zona incerta (ZI), le noyau dorsomédian (DMH) et l'aire hypothalamique latérale (LHA) présentent une innervation diffuse. Le noyau prémamillaire dorsal (PMd) est fortement innervé. Finalement, le noyau postérieur de l'hypothalamus (PH) présente un grand nombre de fibres de passage, en transit vers la substance grise périaqueducule (PAG).

Le thalamus est un territoire qui présente une innervation modérément dense, et relativement diffuse dans le noyau paraventriculaire (PVT) et la partie ventrolatérale du noyau reuniens (RE). Le noyau parataenial (PT) est faiblement innervé, tout comme la partie ventrale du noyau antéromédian (AMv). Dans le tronc cérébral, on trouve une innervation modérément dense, majoritairement dans la substance grise périaqueducule.

### **2.2.1.2 LE NOYAU LATÉRAL DU SEPTUM**

En 1997, Risold et Swanson ont suggéré que le noyau latéral du septum (LS) peut être divisé en trois parties majeures : la partie rostrale (LSr) connectée essentiellement avec les noyaux de la zone médiane de l'hypothalamus, spécialement le noyau antérieur, et caractérisée par l'expression des ARNm de l'enképhaline et de la neurotensine ; la partie ventrale (LSv) est connectée à la zone périventriculaire de l'hypothalamus, en particulier le noyau préoptique médian, et caractérisée par une abondante expression de l'ARNm du récepteur aux estrogènes ; et une partie caudale (LSc) connectée avec la zone latérale de l'hypothalamus et le noyau supramamillaire latéral et caractérisée par l'expression de l'ARNm de la somatostatine.

Dans ce sens, seuls les travaux expérimentaux pour lesquels une innervation massive de la capsule du noyau ventromédian était observée, ont été réexaminés : ces analyses concernent plus particulièrement des injections de PHA-L dans la région ventrolatérale de la partie rostrale du noyau latéral du septum (Fig 30, B) (niveau 14 de l'atlas de Swanson, 1992). Le réseau de fibres est dense,

compact et limité à la capsule (Fig 30, D). Les fibres sont variqueuses, et de très nombreux boutons sont visualisés (Fig 30, E). À l'inverse des projections issues du noyau antérieur de l'hypothalamus, aucune innervation du noyau ventromédian n'est observée, montrant ainsi une irrigation massive et spécifique de la capsule.

D'autres structures, ici présentées brièvement, reçoivent des projections depuis la partie rostrale de ce noyau. La majorité des neurones ayant incorporé le PHA-L projettent dans l'aire préoptique latérale. Une innervation modérée est observée dans les noyaux préoptiques antéroventral, suprachiasmatique et médian. Plus en arrière, le noyau antérieur de l'hypothalamus est très densément innervé. Ce territoire de terminaison s'étend, avec la même intensité, dans la capsule du noyau ventromédian (Fig 30, D). Quelques fibres sont observées dans l'aire hypothalamique latérale, en transit vers l'hypothalamus postérieur et présentant des boutons de passage. D'autres fibres sont observées dans la partie médiane de la zona incerta, la partie intermédiaire du noyau périventriculaire et le noyau dorsomédian. Enfin au niveau prémamillaire, la partie postérieure du noyau périventriculaire reçoit une irrigation diffuse, tout comme le noyau postérieur de l'hypothalamus. Des fibres sont observées en transit vers la substance grise périaqueducale. Quelques fibres sont distribuées dans la partie ventrale du noyau tubéromamillaire et le noyau paraventriculaire du thalamus.

### **2.2.1.3 INNERVATION DU SYSTÈME RFRP**

L'étude de l'innervation potentielle du système RFRP a été réalisée après injections iontophorétiques stéréotaxiques du traceur antérograde PHA-L dans le noyau latéral du septum. Les techniques de double marquage en combinant l'hybridation *in situ* pour RFRP et l'immunofluorescence pour le PHA-L ont permis de révéler la présence de projections du noyau latéral du septum à proximité immédiate des corps cellulaires RFRP dans la capsule du noyau ventromédian (Fig 31). Ces travaux nécessitent d'être approfondis, notamment afin de vérifier la présence de contacts synaptiques et identifier les neurotransmetteurs et neuropeptides impliqués.

**Fig 30 :**

(A) Photographies de marquages après injection stéréotaxique du traceur antérograde PHA-L dans le noyau antérieur de l'hypothalamus (AHN).

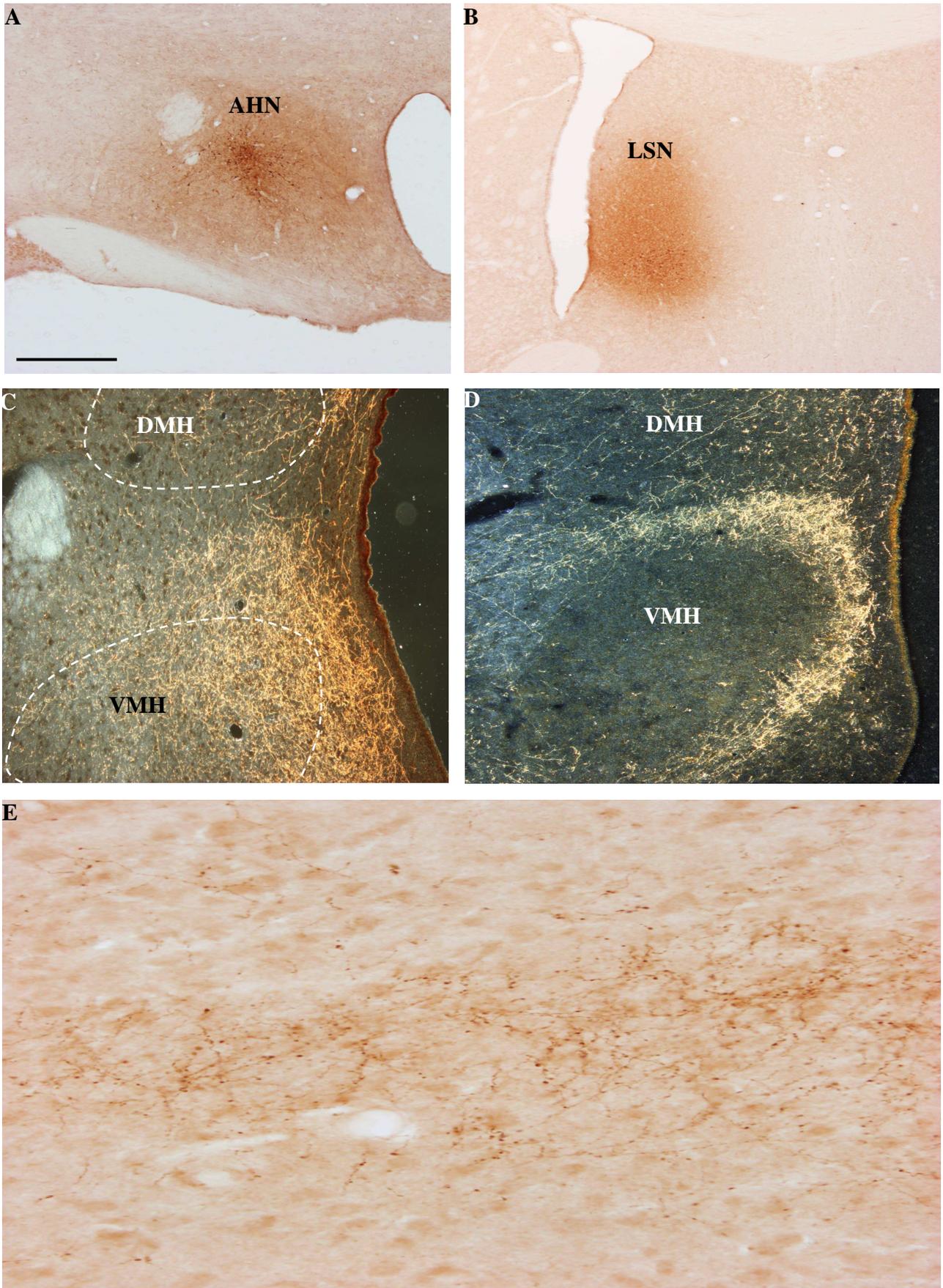
(B) Photographies de marquages après injection stéréotaxique du traceur antérograde PHA-L dans le noyau latéral du septum (LSN).

(C) Les projections issues du AHN sont retrouvées massivement dans la capsule du noyau ventromédian et dans le noyau ventromédian.

(D) Les projections issues du LSN sont retrouvées massivement et spécifiquement dans la capsule du noyau ventromédian.

(E) Fort grossissement indiquant un réseau dense de fibres dans la capsule du noyau ventromédian, et un grand nombre de boutons terminaux.

Barre d'échelle : (A,B) 500 $\mu$ m ; (C,D,E) 200 $\mu$ m



**Fig 30:** Photographies de projections afférentes à la capsule du noyau ventromédian depuis les noyaux latéral du septum (LSN) et antérieur de l'hypothalamus (AHN).

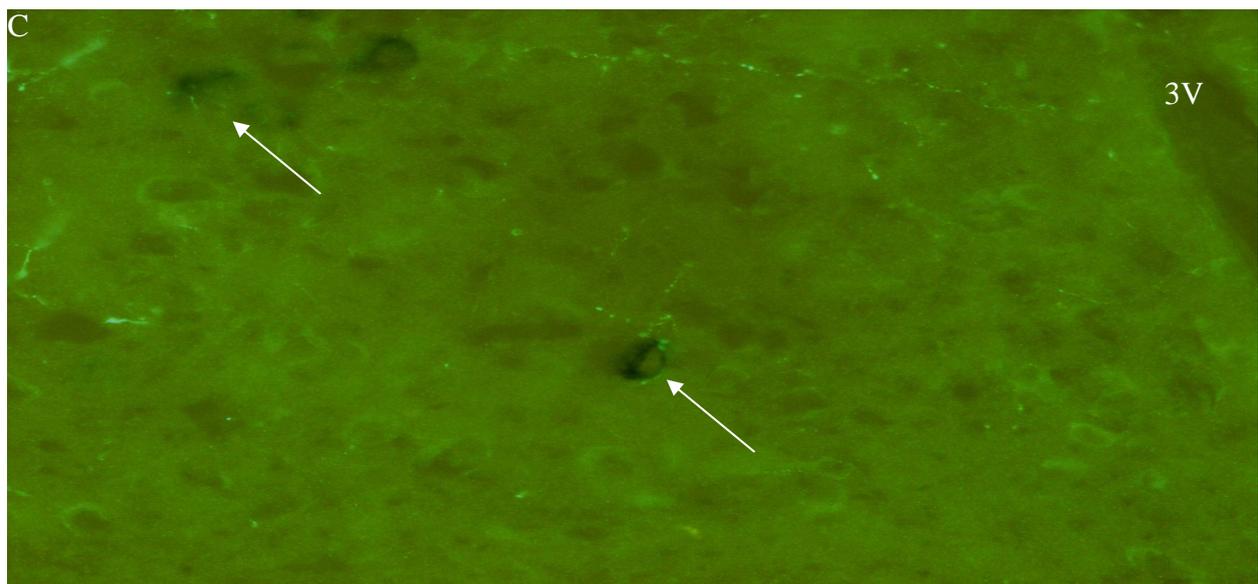
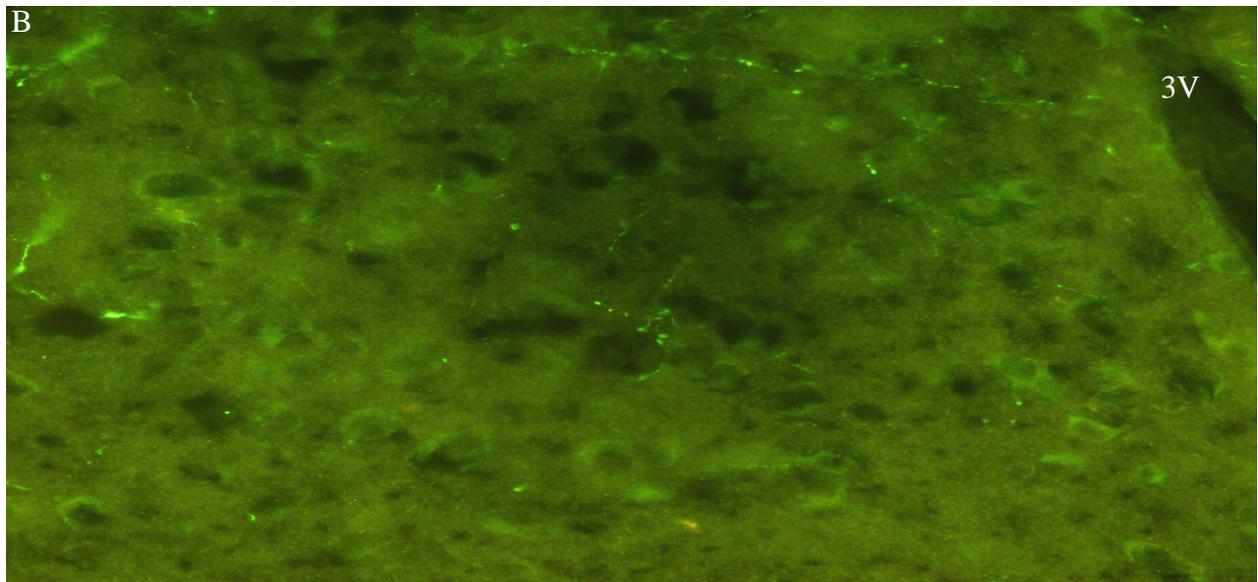
**Fig 31 :**

(A) Photographies de marquages de corps cellulaires contenant l'ARNm RFRP (flèches).

(B) Photographies de marquages de fibres marquées par l'anticorps anti-PHAL, après injection stéréotaxique du traceur antérograde PHA-L dans le noyau latéral du septum (LSN). Ces fibres sont de fort calibre et variqueuses.

(C) La superposition des images A et B indiquent clairement que des projections issues du LSN sont en étroite apposition de corps cellulaires RFRP-positifs (flèches). De nombreux boutons terminaux de ces fibres sont observés au contact des périkaryons RFRP, indiquant une innervation des neurones à RFRP par des projections issues du LSN.

Barre d'échelle = 100µm



**Fig 31:** Innervation de corps cellulaires RFRP par des projections issues du noyau latéral du septum.

### **2.2.2 DONNÉES EXPÉRIMENTALES : RESTRICTION ALIMENTAIRE, RÉALIMENTATION, STRESS.**

Des variations d'expression de l'ARNm RFRP en relation avec le contrôle de la balance énergétique ou avec un stress aigu ont été recherchées. Ces expériences ont malheureusement porté sur un nombre trop réduit d'animaux et nécessiteront d'être complétées notamment par d'autres approches. Ce sont donc des données préliminaires qui sont présentées ici, et qu'il nous a été impossible de compléter par manque des infrastructures adaptées.

L'aire de distribution des neurones RFRP dans la 'zone à MCH', en contact étroit avec les neurones à MCH et à hypocrétine ayant d'après la littérature un rôle orexigène, nous a conduit à vérifier un rôle potentiel de neurones à RFRP dans les mêmes phénomènes. Ainsi, nous avons placé des animaux en conditions de restriction alimentaire totale pendant 48h. Cette restriction alimentaire a été suivie d'une phase de réalimentation pendant 3h pour un lot d'animaux.

Les mesures par RT-PCR semi-quantitative relative ont montré une diminution de 24% des taux d'expression de l'ARNm RFRP chez les animaux ayant subi une restriction alimentaire. Après réalimentation, les taux d'ARNm RFRP sont augmentés à un niveau légèrement supérieur à celui observé chez les animaux en conditions normales d'alimentation (+11,5%). Par comparaison avec les animaux placés uniquement en restriction alimentaire, la réalimentation permet une récupération de +46,7% d'expression de l'ARNm RFRP (Fig 32, A).

Parallèlement, les injections du traceur antérograde PHA-L ont montré que ces neurones reçoivent une innervation massive du noyau antérieur de l'hypothalamus et du noyau latéral du septum. Ces deux noyaux sont impliqués dans des circuits liés aux comportements de stress et de défense. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une implication des neurones RFRP dans les réactions de stress et de défense. Des animaux ont donc été soumis à un stress environnemental par confinement pendant 3h. Les mesures ont montré une augmentation significative des taux d'expression de l'ARNm RFRP de 31,4% par rapport aux animaux placés dans des conditions normales d'hébergement (Fig 32, B).

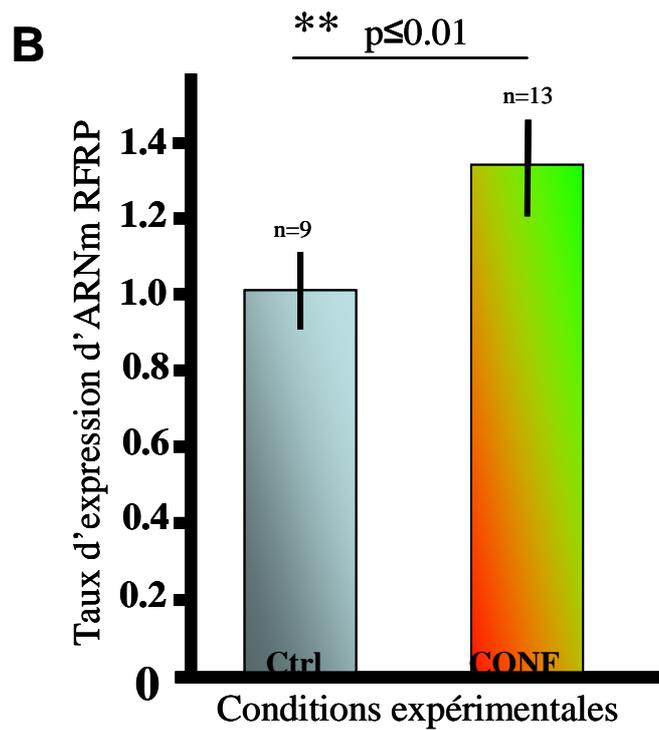
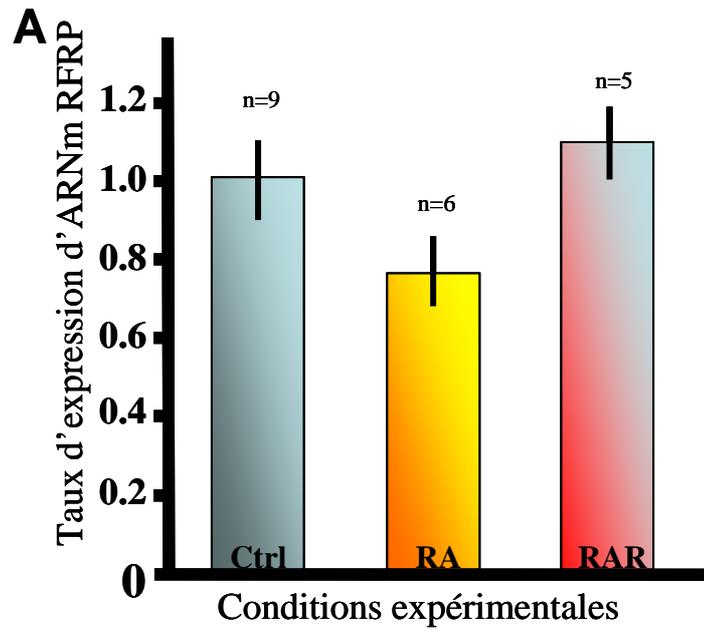
## 2.3 CONCLUSION

Dans cette seconde partie, nous avons montré que la population de neurones à RFRP, distribuée dans la capsule du noyau ventromédian, recevait des innervations par des centres intra- (noyau antérieur de l'hypothalamus) et extra-hypothalamiques (noyau latéral du septum). Nos résultats montrent aussi des variations significatives des taux d'expression de l'ARNm RFRP en conditions de stress environnemental par confinement. Cependant, il est à noter que ces résultats sont trop préliminaires pour qu'une conclusion stricte soit émise.

**Fig 32 :**

(A) Histogramme représentant les variations des taux d'expression de l'ARNm RFRP dans des conditions de restriction (RA) et de restriction alimentaire suivie de réalimentation (RAR). Les variations mesurées ne sont pas significatives, d'après les tests non paramétriques de Mann-Whitney.

(B) Histogramme représentant les variations des taux d'expression de l'ARNm RFRP dans des conditions de stress par confinement (CONF). Les variations mesurées sont significatives ( $p \leq 0,01$ ), d'après les tests non paramétriques de Mann-Whitney.



**Fig 32:** Diagrammes représentant les variations des taux d'expression de l'ARNm RFRP sous restriction alimentaire [RA], restriction alimentaire suivie de réalimentation [RAR], et confinement [CONF].



# **DISCUSSION**



# **1 DISTRIBUTION DE LA MÉTASTINE ET DE RFRP : CARACTÉRISATION DES NEURONES À RFRP**

Les principaux résultats concernaient la mise en évidence d'une nouvelle population de neurones de l'hypothalamus, dont une des caractéristiques essentielles, au même titre que les populations de neurones à MCH et à hypocrélines, est d'être spécifique de la région tubérale.

## **1.1 DISTRIBUTION DES MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET D'HYBRIDATION *IN SITU* POUR MÉTASTINE ET RFRP.**

### **1.1.1 PREMIÈRES OBSERVATIONS ET CONFRONTATIONS AVEC LES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE.**

Comme nous l'avons déjà amplement spécifié dans l'introduction, le projet initial de ce travail, en collaboration avec l'équipe suisse du Pr Pralong, concernait l'étude de la distribution du peptide métagline dans le cerveau de rat, afin de mieux comprendre son implication dans la régulation de l'axe gonadotrope, en particulier chez des animaux invalidés pour le récepteur au NPY et ayant un retard de puberté (Pralong *et al.*, 2002). En 2005, lorsque ce travail a été initié, la distribution du peptide métagline dans le cerveau, bien que confirmée puisque peptide et ARNm étaient retrouvés, n'était pas encore fermement établie et des différences importantes existaient dans les résultats rapportés par différents auteurs. Ces divergences sont particulièrement apparentes dans la synthèse des données bibliographiques présentées dans le tableau ci-dessous (tableau 3). Pendant les années 2005-2006, les corps cellulaires étaient décrits dans de nombreux territoires hypothalamiques et extra-hypothalamiques, mais avec une très grande variabilité suivant les outils et le matériel utilisés, en particulier les anticorps et les espèces. Les résultats obtenus au laboratoire avec l'anticorps anti-hMet étaient tout à fait concordants aux premiers décrits dans la littérature avec ce même anticorps commercial

(Brailoiu *et al.*, 2005). Notamment, les nombreux corps cellulaires observés dans la capsule du noyau ventromédian sur des coupes d'hypothalamus de rats mâles étaient aussi décrits par d'autres études. Par ailleurs, nos observations sur des animaux femelles en proestrus confirmaient l'expression du peptide de manière plus abondante dans le noyau arqué et les régions préoptiques (dans les noyaux antéroventral périventriculaire et périventriculaire), ce qui correspondait aussi avec des études concernant l'implication de métastine dans le contrôle de l'axe gonadotrope (voir introduction).

REFERENCES	OUTILS	LOCALISATION CERVEAU	ESPECES
Muir <i>et al.</i> , 2001	RT-PCR	CPu, ACB, striatum, AMY, cervelet, hypothalamus	homme
Gottsch <i>et al.</i> , 2004a	HISradio (sMet)	AVPV, PV, ARH, AMYm, ADP	souris mâle
<b>Brailoiu <i>et al.</i>, 2005</b>	<b>WB IM (hMet)</b>	<b>hypothalamus, moelle, tronc ACB, CPu, DMH, PVHpv, VMH, ARH, PVT, NTS</b>	<b>rat</b>
Kinoshita <i>et al.</i> , 2005	RT-PCR IM (rMet #156-254)	ARH-ME, POA, hypophyse ARH	rat femelle
Smith <i>et al.</i> , 2005a/b	HISradio (sMet)	ARH, AVPV, PV	souris
Shahab <i>et al.</i> , 2005	HIS	ARH	singe mâle
Franceschini <i>et al.</i> , 2006	IM (kp10 #566)	ARH, DMH, MEPO	brebis
Clarkson et herbison., 2006	IM (kp10 #566)	AVPV-PV, DMH-AHN, ARH	souris
Smith <i>et al.</i> , 2006b	HISradio (rMet)	AVPV, ARH	rat femelle
<b>Pompolo <i>et al.</i>, 2006</b>	<b>IM (hMet)</b>	<b>ARH, BDB, POA</b>	<b>brebis</b>
<b>Sun <i>et al.</i>, 2007</b>	<b>IM (hMet)</b>	<b>ARH, PV, POA</b>	<b>rat femelle</b>
<b>Maeda <i>et al.</i>, 2007</b>	<b>IM (hMet) et HIS</b>	<b>ARH-ME, AVPV</b>	<b>rat femelle</b>
Kauffman <i>et al.</i> , 2007	HISradio (rMet)	AVPV, ARH	rat
Adachi <i>et al.</i> , 2007	IM (rMet #156-254) HIS	ARH, AVPV ARH, AVPV	rat femelle
Yamada <i>et al.</i> , 2007	RT-PCR, rMet HIS	ARH-ME, AVPV, POA ARH	rat femelle
Greives <i>et al.</i> , 2007	IM (hMet #T4771)	AVPV, ARH	hamster mâle

Tableau 3 : Comparaison de la distribution des neurones à métastine, obtenue lors de différentes études.

Cependant, de nombreuses divergences étaient évidentes, essentiellement avec les travaux effectués par hybridation *in situ*, lesquels ne décrivaient pas de marquages dans des territoires plus dorsaux au noyau arqué dans l'hypothalamus tubéral.

En 2006, une équipe (Kriegsfeld *et al.*, 2006) a publié une cartographie de la distribution du peptide RFRP, un membre de la même famille de peptides que la métastine mais appartenant à

un embranchement différent (classification de peptides RFamide par Osugi *et al.*, 2006). Cette cartographie a été réalisée sur des cerveaux de hamsters en utilisant un anticorps dirigé contre le peptide GnIH d'oiseau. Cette cartographie de la distribution hypothalamique de GnIH/RFRP ressemblait à la cartographie que nous avons réalisée chez le rat mâle avec l'anticorps anti-hMet. La sonde fournie par l'équipe suisse (Gottsch *et al.*, 2004a), ne donnant aucun résultat sur notre matériel rat, des sondes métastine et RFRP ont alors été réalisées. Nous avons obtenu également les anticorps utilisés par Kinoshita *et al.*, et par Franceschini *et al.*, et pratiqué des tests d'inhibition en phase liquide de l'anticorps anti-hMet avec le peptide RFRP-1.

### **1.1.2 DISCRIMINATION DES SYSTÈMES MÉTASTINERGIQUE ET RFRP CHEZ LE RAT.**

Sans vouloir revenir dans le détail, l'utilisation de ces différents outils nous a permis de comprendre l'organisation anatomique des systèmes RFRP et métastinergique. Parallèlement à nos efforts dans ce sens, des travaux -que nos observations confirmaient- étaient publiés. Chez le rat, l'anatomie des systèmes à RFRP et à métastine peuvent être résumés de la manière suivante : Par hybridation *in situ* avec des sondes complémentaires des ARNm RFRP et métastine, les marquages sont observés dans des noyaux hypothalamiques différents. L'ARNm de la métastine est exprimé majoritairement dans des neurones de l'AVPV et du noyau arqué. Quelques cellules du noyau médian de l'amygdale ont aussi été décrites comme exprimant un faible marquage. Nous avons retrouvé ces cellules, mais nous avons aussi observé quelques neurones dans les parties parvicellulaires antérieures du noyau paraventriculaire hypothalamique. L'ARNm de RFRP est quant à lui majoritairement décrit dans la capsule du noyau ventromédian. La distribution de ce système sera détaillée plus bas.

Seul l'anticorps anti-Met de Franceschini *et al.* a fourni un marquage comparable dans l'AVPV et l'ARH. Cependant, cet anticorps donne aussi un marquage de corps neuronaux dans la capsule

du VMH, tout comme l'anticorps anti-hMet commercialisé par Phoenix Pharmaceuticals ; ce dernier ne marquant l'AVPV ou intensément le noyau arqué que chez les femelles en proestrus. Enfin, l'anticorps de Kinoshita *et al.* ne donne qu'un marquage du noyau arqué chez le mâle. Ainsi il devenait clair qu'aucun des anticorps n'était spécifique des neurones métastinergiques marqués par hybridation *in situ*, mais ces observations évoquaient au moins que l'anticorps anti-hMet ainsi que l'anticorps de Franceschini *et al.* reconnaissent le peptide RFRP dans la capsule du noyau ventromédian.

Des inhibitions en phase liquide de l'anticorps commercialisé (anti-hMet) avec des concentrations croissantes du peptide RFRP se sont donc montrées indispensables afin de spécifier le marquage immunohistochimique que nous avons obtenu. Une inhibition totale du marquage fourni par l'anticorps anti-hMet dans la capsule du noyau ventromédian et le noyau dorsomédian, a été obtenue pour une concentration de peptide RFRP égale à 10nM. Pour d'autres noyaux, comme le NTS, le marquage était toujours observé, suggérant la reconnaissance d'un autre système peptidergique non identifié marqué par cet anticorps. Ceci nous a donc amené à nous rendre à l'évidence que l'anticorps commercial n'était pas spécifique de la métastine mais marquait d'autres systèmes peptidergiques comme par exemple RFRP. En fait, cet anticorps est dirigé contre les dix derniers acides aminés situés à l'extrémité C-terminale. Par comparaison avec les séquences aminoacidiques des autres peptides de la famille RFamide, il s'est avéré que l'extrémité C-terminale (Arg[**R**]-Phe[**F**]-NH<sub>2</sub>) est relativement bien conservée entre les peptides des différentes espèces. Cependant, chez le rongeur, la métastine possède une extrémité C-terminale ne différant que par un acide aminé : une tyrosine [**Y**] remplace la phénylalanine [**F**]. La métastine de rongeur n'est pas un peptide RFamide au sens strict : il s'agit en fait d'un peptide **RY**amide, de la même façon que le peptide NPY en est un. De fait, des interactions croisées avec d'autres peptides de la famille RFamide sont envisageables (tableau 4). Des réactions de double marquage par hybridation *in situ* pour RFRP et immunohistochimie pour la métastine ont montré que tous les corps cellulaires RFRP-positifs contenaient également le

Peptide RFamide	Espèce	Séquence C-terminale
RFRP-1	rat	...ankvphsaan <b>LPLRF</b> -NH2
	souris	...ankvphsaan <b>LPLRF</b> -NH2
	homme	...ankvphsaan <b>LPLRF</b> -NH2
GnIH-RP1	oiseau	kvpnsvan <b>LPLRF</b> -NH2
RFRP-2	rat	∅
	souris	∅
	homme	sagatan <b>LPLRS</b> -NH2
GnIH	oiseau	sikpsay <b>LPLRF</b> -NH2
RFRP-3	rat	...eagtmshfps <b>LPQRF</b> -NH2
	souris	...eagtrshfps <b>LPQRF</b> -NH2
	homme	vpn <b>LPQRF</b> -NH2
GnIH-RP2	oiseau	ssiqslIn <b>LSQRF</b> -NH2
Métastine	rat	...kdmsaynwns <b>FGLR<sup>Y</sup></b> -NH2
	souris	...kdlstynwns <b>FGLR<sup>Y</sup></b> -NH2
	homme	...kdlpnynwns <b>FGLR<sup>F</sup></b> -NH2
	oiseau	Non identifié
NPFF-1 (NPFF)	rat	flfq <b>PQRF</b> -NH2
	souris	flfq <b>PQRF</b> -NH2
	homme	rsqaflfq <b>PQRF</b> -NH2
	oiseau	Non identifié
NPFF-2 (NPSF)	rat	slaa <b>PQRF</b> -NH2
	souris	slaa <b>PQRF</b> -NH2
NPFF-2 (NPAF)	homme	...glnsqfwslaa <b>PQRF</b> -NH2
	oiseau	Non identifié
PrRP	rat	...pawytgrgirpv <b>GRF</b> -NH2
	souris	...pawytgrgirpv <b>GRF</b> -NH2
	homme	...pawyasrgirpv <b>GRF</b> -NH2
	oiseau	...pswytrgirpv <b>GRF</b> -NH2

**Tableau 4:** Comparaison des séquences de 7 peptides RFamide (RFRP/GnIH, métastine, NPFF et PrRP) chez le rat, la souris, l'homme et les oiseaux.

marquage fourni par l'anticorps dirigé contre la métastine humaine. Cette donnée a confirmé nos résultats obtenus par incubation en phase liquide de l'anticorps anti-hMet avec des concentrations croissantes du peptide RFRP.

À la date à laquelle ce texte a été écrit, il n'existe donc aucun anticorps anti-métastine spécifique de ce peptide chez le rongeur. En effet, les anticorps 'artisanaux' actuellement utilisés nécessitent une pré-adsorption avec le peptide RFRP-GnIH, préalable à toute immunohistochimie, afin de visualiser le marquage métastinergique (Greives *et al.*, 2007).

### **1.1.3 ANATOMIE DU SYSTÈME RFRP CHEZ LE RAT ; DONNÉES CHEZ L'HOMME.**

Initialement, pensant analyser la distribution du système métastinergique, il s'est avéré, contrôle fait, que notre travail contribuait à caractériser dans l'hypothalamus, le système RFRP dont l'action supposée sur l'axe gonadotrope est opposée à celle de la métastine. L'absence d'outil immunologique spécifique de la métastine conjuguée aux difficultés rencontrées par l'équipe suisse de confirmer sur le modèle murin, le retard de puberté engendré par l'inactivation du gène du récepteur NPY5 (certainement dû à une dérive génétique de la souche), nous avons donc décidé de réorienter nos travaux sur l'analyse détaillée du système à RFRP. Notre intérêt pour ce système était renforcé par le fait que les neurones de cette population sont exclusivement localisés dans l'hypothalamus tubéral, caractéristique partagée par des neurones déjà étudiés depuis de nombreuses années au laboratoire (voir ci-après).

Nous avons indiqué que la majorité des périkaryons RFRP est localisée dans la capsule du noyau ventromédian. Cependant, l'analyse fine pointe vers une distribution beaucoup plus complexe (Legagneux *et al.*, 2009). En fait, des périkaryons ont été observés dans sept structures hypothalamiques par hybridation *in situ* avec la sonde préparée au laboratoire. Il est délicat de fournir une interprétation définitive à cette observation. Elle pourrait être l'indication que ces

neurones appartiennent à des populations différentes suivant leur localisation. Cependant, l'homogénéité de leur aspect morphologique ainsi que les résultats obtenus concernant leur genèse ne plaident pas en faveur de cette hypothèse. Leur localisation dans des structures adjacentes les rend susceptibles de recevoir des afférences d'origines différentes et donc d'être impliqués dans des circuits et des processus fonctionnels distincts. Ces points seront approfondis dans le troisième paragraphe de cette discussion.

Certains périkaryons à RFRP sont dans des structures neuroendocrines (partie antérieure du noyau périventriculaire et noyau arqué). Le peptide étant lui-même expérimentalement impliqué dans des fonctions neuroendocriniennes telles que le contrôle de l'axe gonadotrope, nous avons recherché si certains des neurones le synthétisant pouvaient libérer leur produit de sécrétion directement dans le sang. Des injections intra-vasculaires du traceur rétrograde fluorogold ont donc été effectuées. La distribution des neurones neuroendocriniens dans l'hypothalamus, ayant concentré dans leur cytoplasme le traceur, correspondait en tout point à ce qui était attendu et décrit dans la littérature. Cette distribution ne sera donc pas commentée ici. Pour cette étude, nous avons utilisé l'anticorps anti-métastine humaine afin de détecter les neurones à RFRP, mais en limitant nos observations à l'hypothalamus tubéral. En effet, cette étude a été effectuée chez le rat mâle, et nous avons vu dans le paragraphe précédent que tous les neurones de l'hypothalamus tubéral marqués par l'anticorps anti-métastine sur ce matériel étaient également marqués par hybridation *in situ* avec la sonde RFRP, et le marquage fourni par l'anticorps était inhibé par l'incubation de l'IS avec du peptide RFRP. Cependant, aucun neurone hMet-positif n'était rétrogradement marqué, et donc les neurones à RFRP ne semblent pas neuroendocriniens. Cette donnée a été confirmée très récemment par une autre équipe : aucun neurone RFRP-immunoréactif n'a incorporé le traceur fluorogold et aucune projection des neurones à RFRP n'a été observé avec les neurones neuroendocrines (Rizwan *et al.*, 2009).

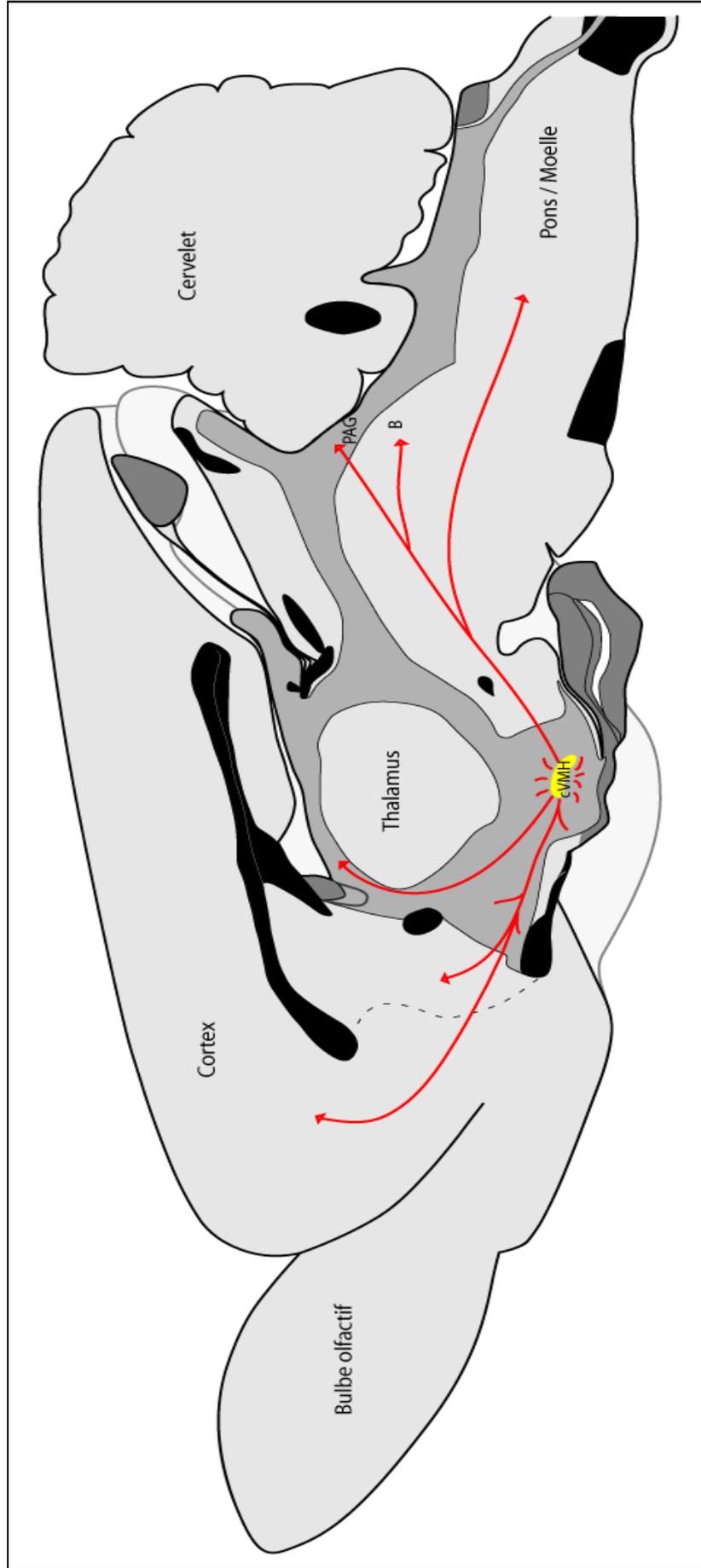
L'incubation de l'anticorps anti-hMet avec le peptide RFRP a totalement inhibé le marquage des périkaryons hypothalamiques, mais aussi de la très grande majorité des fibres que nous avons

caractérisées en tant que ‘fibres épaisses’. La description que nous avons faite de ces fibres est très proche de la cartographie établie par Kriegsfeld *et al.* chez le cobaye avec l’anticorps anti-GnIH de moineau. Cet anticorps et ceux de Fukusumi *et al.* et Yoshida *et al.* étaient les seuls spécifiques de ces neurones, et malgré nos efforts nous n’avons pu en obtenir. Nous devons donc nous contenter d’une synthèse des observations de ces auteurs avec celles que nous avons effectuées avec l’anticorps anti-hMet. Néanmoins, une certaine représentation des projections RFRP peut ainsi se dégager. Le télencéphale basal et l’hypothalamus semblent les principales cibles des projections RFRP. En particulier, la région septale et notamment les noyaux médian et latéral du septum qui sont les plus innervés. Juste quelques fibres atteignent les régions corticales. Dans l’hypothalamus, les projections RFRP sont diffuses. Kriegsfeld *et al.* insistent sur l’innervation des neurones à GnRH dans les aires préoptiques ventrales (Kriegsfeld *et al.*, 2006). Il est vrai que nous avons observé des fibres plus nombreuses dans ces territoires. Cependant, après injections vasculaires de fluorogold, peu de projections hMet-positives ont été observées au contact des neurones ayant internalisés le traceur. Entre outre, les neurones de la région préoptique rétrogradement marqués ne nous ont pas semblé particulièrement innervés. Il nous faudra reprendre ce travail avec un anticorps spécifique, mais les données préliminaires ne plaident pas pour une action directe importante du système RFRP sur l’axe gonadotrope chez le rat mâle. Par ailleurs, aucun dimorphisme sexuel n’a été reporté dans la distribution de RFRP. Les autres systèmes neuroendocriniens ne semblent pas plus innervés, notamment dans les noyaux paraventriculaire, arqué ou périvertriculaire. Mais encore une fois, cette étude nécessite l’utilisation d’un anticorps spécifique afin d’être complétée. Les travaux récents de Rizwan *et al.* ont confirmé nos résultats, à savoir qu’aucune fibre RFRP-immunoréactive n’est retrouvée dans l’émittance médiane (Rizwan *et al.*, 2009). Cette observation a été réalisée grâce à un anticorps produit par l’équipe elle-même et dirigé contre le précurseur prépro-RFRP-3. Les projections descendantes ont été décrites chez le cobaye essentiellement dans la substance grise périaqueducule (Rizwan *et al.*, 2009). Nos observations tendent à confirmer que ce territoire est

effectivement innervé par des projections RFRP. Cependant, nous avons aussi noté d'autres noyaux, et notamment le noyau de Barrington, qui sont la cible de projections modérées. Les données de la littérature sont compatibles avec cette observation, et la région du noyau dorsomédian est connue comme étant une source d'afférence au noyau de Barrington (Thompson *et al.*, 1996) (fig 33).

Parallèlement au projet initial de la distribution détaillée du peptide métastinergique dans le cerveau de rat, nous avons initié une étude de la distribution de ce peptide dans l'hypothalamus humain. En effet, du matériel issu de la collection de tissus humains obtenus par Brischoux en 2002, était disponible en quantité réduite. À l'époque, aucune donnée concernant la distribution de la métastine dans le cerveau humain n'était disponible dans la littérature, ce qui est toujours le cas à l'heure actuelle. Les seules données disponibles chez l'homme concernaient la physiopathologie du système métastinergique, peptide et récepteur (De Roux *et al.*, 2003 ; Seminara *et al.*, 2003). Les auteurs s'intéressaient principalement à l'implication physiologique de la métastine et de son récepteur GPR54 dans des troubles de l'axe gonadotrope, en particulier l'hypogonadisme hypogonadotrope isolé. Cette pathologie se manifeste par un défaut de la sécrétion hypophysaire d'hormones FSH 'follicle-stimulating hormone' et LH 'luteinizing hormone' qui se traduit par un développement pubertaire retardé, voire une stérilité. Elle peut également se manifester par des troubles de la sécrétion de GnRH 'gonadotropin-releasing hormone' au niveau hypothalamique. Les auteurs des deux études ont montré que l'hypogonadisme hypogonadotrope isolé est dû à une perte de fonction du récepteur GPR54, incapable de lier le peptide actif, la métastine.

Dans ce cadre, des études par immunohistochimie avec l'anticorps anti-hMet ont été réalisées sur des coupes d'hypothalami humains. L'anticorps a fourni un marquage de quelques corps cellulaires dans deux noyaux hypothalamiques (AVPV et PVi), et des fibres très abondantes de façon diffuse dans l'hypothalamus. Aussi, basé sur nos résultats obtenus chez le rat, il a été



**Fig 33:** Représentation schématique des projections du système à RFRP sur une coupe sagittale de cerveau de rat, à partir de la confrontation des données de la littérature et de nos observations.

suspecté une aspécificité de l'anticorps également chez l'homme. En effet, le marquage fourni par l'anticorps dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) pourrait être le marquage métaginergique. Mais, celui observé dans l'hypothalamus tubéral (notamment le PVi) semblerait être celui de la population de neurones à RFRP. Ce travail est un préliminaire à une étude plus détaillée : par préciosité du matériel humain disponible et surtout par manque de spécificité de l'anticorps dirigé contre la métagine humaine, une incubation en phase liquide de l'anticorps avec le peptide RFRP n'a pas été réalisée sur ce matériel.

## **1.2 LES NEURONES À RFRP : UNE POPULATION NEURONALE À PART ENTIÈRE.**

Comme il l'a été présenté dans les résultats, la population de neurones à RFRP est unique. Elle est exprimée dans sept noyaux exclusivement hypothalamiques, incluant la partie postérieure du noyau antérieur, les parties antérieure, intermédiaire et postérieure du noyau périventriculaire, les noyaux dorsomédian et arqué, et pour beaucoup dans la capsule du noyau ventromédian (Legagneux *et al.*, 2009). Ces structures appartiennent majoritairement à l'hypothalamus tubéral et sont localisés à proximité chacune des autres. Les neurones à RFRP forment donc une 'condensation cellulaire' ne respectant pas les limites cytoarchitectoniques définies.

L'hypothalamus tubéral est le siège de ce qui est appelé au laboratoire, la 'zone à MCH'. Cette zone correspond à l'aire de distribution des neurones à MCH dont la localisation hypothalamique est aussi limitée à l'hypothalamus tubéral. En fait, comparés aux neurones à RFRP, les neurones à MCH les plus antérieurs sont observés au niveau postérieur du noyau paraventriculaire et les plus postérieurs voisins du recessus prémamillaire. Les neurones à RFRP les plus antérieurs et postérieurs sont observés aux mêmes niveaux de coupe. Les neurones à MCH ne forment pas une population homogène et nous avons rappelé dans l'introduction qu'au moins deux sous-populations peuvent être différenciées ; l'une étant formée par des neurones à MCH exprimant

un autre neuropeptide appelé CART (Broberger, 1999 ; Vrang *et al.*, 1999 ; Cvetkovic *et al.*, 2004). Cette population occupe des territoires sensiblement plus médians (région périfornicale, rostromédiane de la zona incerta) que les autres (restreints aux aires latérales de l'hypothalamus voisines du pédoncule cérébral). En 2001, Brischoux *et al.* avaient envisagé l'existence d'une troisième sous-population occupant les aires les plus médianes de la 'zone à MCH', c'est-à-dire la capsule du noyau ventromédian, la partie antérieure du noyau dorsomédian et la partie postérieure du noyau périventriculaire. Ces structures sont occupées également par des périkaryons à RFRP. L'hypothèse que RFRP soit exprimé dans les périkaryons d'une éventuelle troisième sous-population de neurones à MCH nous a alors semblé plausible. Par ailleurs, la 'zone à MCH' contient d'autres populations de neurones, notamment ceux à hypocréatine dont les limites antérieures et postérieures sont semblables, et sont aussi observés dans des territoires hypothalamiques médians et périventriculaires. En combinant hybridation *in situ* pour RFRP et immunohistochimie pour MCH ou Hcrt, nous avons tenté de vérifier la co-expression de ces peptides au sein des mêmes cellules. Nous n'avons jamais observé de co-expression (Fig 34). Il pourrait être envisagé que le précipité correspondant au signal d'hybridation inhibe le marquage immunohistochimique. Cette hypothèse a été rejetée, puisque la co-expression des signaux RFRP (hybridation *in situ*) et hMet (immunohistochimie) a été obtenue, et a donc permis de vérifier la coexistence des deux signaux dans les mêmes neurones. La seule conclusion qui s'impose est donc que l'ARNm RFRP est exprimé dans des cellules voisines de celles à MCH et Hcrt (Legagneux *et al.*, 2009). En revanche de nombreuses images d'accolement de neurones ont été observées, confirmant la co-localisation des corps cellulaires. Enfin, de nombreux boutons immunoréactifs ont été observés à proximité immédiate des somas RFRP suggérant une innervation ; ce point particulier sera évoqué plus loin.

D'autres populations de neurones sont présentes dans les territoires à RFRP, il s'agit par exemple de neurones dopaminergiques (exprimant la tyrosine-hydroxylase, l'enzyme de synthèse de la dopamine) et de neurones somatostatinerigiques. De façon similaire aux deux premières études de

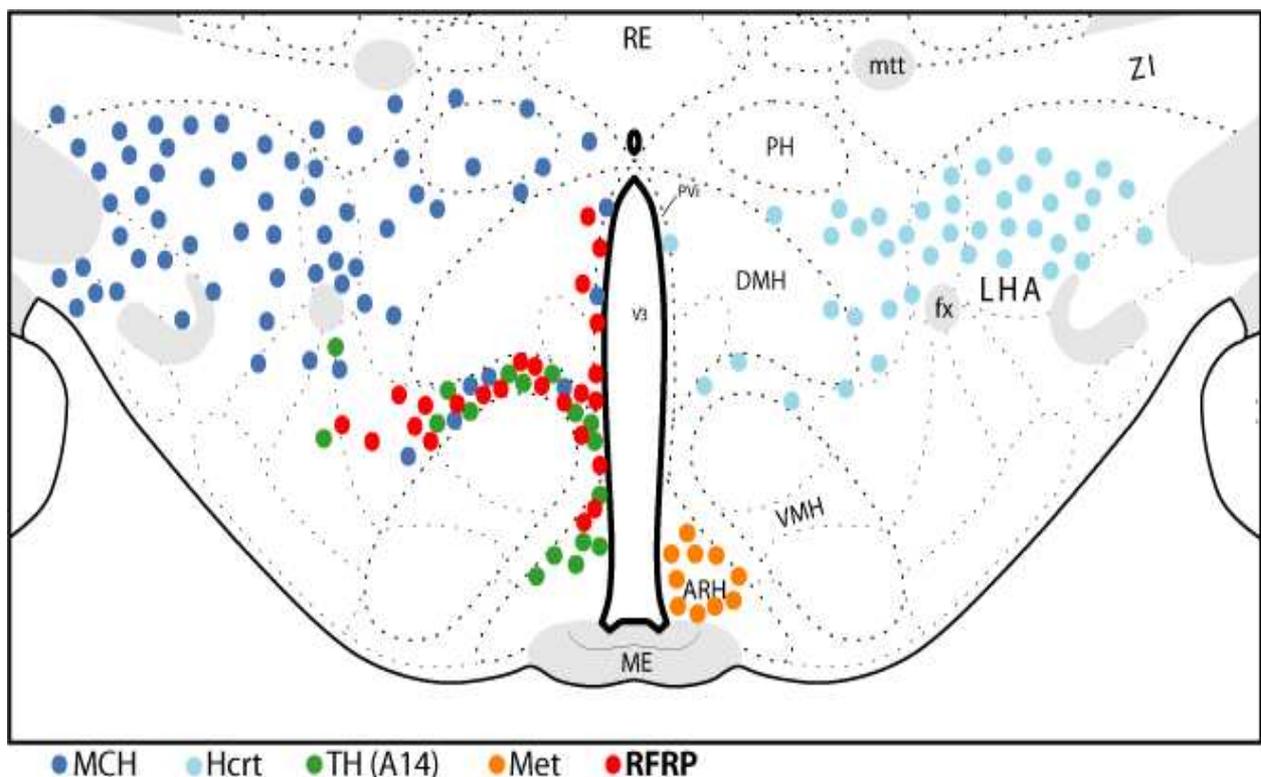
co-expression, une recherche de co-localisation entre les neurones à RFRP et les neurones TH- et /ou somatostatine-positifs a été initiée. La distribution des neurones dopaminergiques est assez complexe. Les travaux d'Hökfelt ont permis de décrire la population de neurones dopaminergiques en différents groupes cellulaires A11 à A14 (Hökfelt *et al.*, 1984). Chacun des quatre groupes est localisé de façon spécifique dans un noyau particulier : A11 dans l'hypothalamus postérieur, A12 dans le noyau arqué, A13 dans la partie rostromédiane de la zona incerta et A14 dans la partie antérieure du noyau périventriculaire. Par les techniques de double marquage, seul le groupe A14 présente des corps cellulaires en contact étroit avec des corps cellulaires à RFRP, suggérant une co-localisation partielle dans les mêmes territoires mais aucun double marquage n'a été observé. Les neurones somatostatinerigiques sont retrouvés de façon abondante dans la partie antérieure du noyau périventriculaire et projettent massivement dans le noyau ventromédian, ce qui a permis de confirmer la localisation des neurones à RFRP dans la capsule du noyau ventromédian, à la limite du territoire d'innervation par les fibres somatostatinerigiques. Aucune cellule somatostatinerigique n'exprime l'ARNm RFRP. Cependant, quelques corps cellulaires localisés dans la partie intermédiaire du noyau périventriculaire et dans le noyau arqué semblent recevoir une innervation par des projections somatostatinerigiques.

Enfin, de nombreuses études ont suggéré une implication des neurones à RFRP/GnIH dans le contrôle de l'axe gonadotrope chez les oiseaux (Tsutsui *et al.*, 2000). L'axe gonadotrope est gouverné par la sécrétion de la GnRH dans le système porte hypophysaire. Les neurones à GnRH sont localisés dans les territoires préoptiques ventraux chez le rat, à l'extérieur des territoires d'expression de l'ARNm RFRP. Nous avons tenté d'identifier d'éventuels contacts entre des fibres GnRH et des cellules RFRP, ces projections transitant par des voies ventrales ou périventriculaires. Quasiment aucun rapprochement n'a été observé. Avec les premiers résultats concernant l'innervation par des fibres hMet-positives/probablement à RFRP de périkaryons

neuroendocriniens dans les régions préoptiques ventrales, il semble qu'il y ait peu de relation anatomique directe entre système à RFRP et système à GnRH.

En conclusion pour cette partie, nos données actuelles plaident pour une indépendance de la population RFRP, au moins par rapport aux neurones à MCH, Hcrt, TH et somatostatinergique.

Il est bien évident que cette liste n'est pas exhaustive, et d'autres neuropeptides sont présents dans les territoires RFRP. En fait, parmi ceux-ci, il est important de signaler ici que le peptide NPF, qui est un peptide de la même famille que RFRP, est exprimé dans des cellules voisines de celles à RFRP (Liu *et al.*, 2001). Nous avons tenté de vérifier cette information en préparant une sonde complémentaire de l'ARNm NPF. Malheureusement, cette sonde ne nous a donné aucun résultat, mais des travaux rapportant la co-distribution NPF/RFRP indiquaient clairement que les deux peptides sont dans des neurones différents (Liu *et al.*, 2001 ; Yano *et al.*, 2003 ; Yoshida *et al.*, 2003).



**Fig 34 :** Représentation schématique de la distribution comparée des différentes populations neuronales (MCH, HCrt, TH, Met et RFRP) dans l'hypothalamus tubéral de rat.

## 2 ONTOGENÈSE ET DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RFRP

### 2.1 GENÈSE DES NEURONES À RFRP

Nos résultats ont été basés essentiellement sur la technique d'injection intrapéritonéale du BrdU couplée à la technique d'hybridation *in situ* afin de déterminer la date de naissance des neurones à RFRP. L'utilisation du 5-Bromo-2'-désoxyUridine comme marqueur de prolifération a été permise grâce à la production d'un anticorps monoclonal anti-BrdU initialement développé par l'équipe de Gratzner mais largement commercialisé maintenant, et grâce au développement d'une technique immunohistochimique pour la détection du BrdU incorporé à l'ADN (Gratzner, 1982). Initialement, le BrdU était largement étudié pour son activité tératogène. Injecté quotidiennement à des femelles en gestation, il provoque des malformations fœtales dans la totalité de l'organisme en formation (Ruffolo et Ferm, 1965 ; Skalko *et al.*, 1971 ; Webster *et al.*, 1973 ; Scott, 1981 ; Nagao *et al.*, 1998 ; Kolb *et al.*, 1999). Nous avons nous-mêmes également constaté des modifications du pelage (apparition de taches supplémentaires) (Kolb *et al.*, 1999) et une légère déviation de la queue de la progéniture issue de femelles injectées une seule fois à un temps donné de la gestation. Néanmoins, cette technique est très largement utilisée pour étudier la prolifération cellulaire *in vitro* ou *in vivo*. Elle a déjà été utilisée avec succès par notre équipe pour l'analyse de la genèse des neurones à MCH et à Hcr (Brischoux *et al.*, 2001 ; Amiot *et al.*, 2005). Le protocole mis en œuvre consiste en une injection unique aux femelles en gestation, limitant ainsi l'apparition d'effets secondaires. Le BrdU serait incorporé dans les cellules en phase S durant les deux heures suivant l'injection, et l'excès éliminé par le foie.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les neurones à RFRP naissent en un pic étroit aux 13<sup>ème</sup>-14<sup>ème</sup> jours de vie embryonnaire (Legagneux *et al.*, 2009). Cette donnée concorde avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que de nombreuses populations de neurones localisés dans des structures proches du troisième ventricule dans l'hypothalamus tubéral et antérieur naissent pendant cette période. D'après Markakis et Swanson, les neurones

parvocellulaires neuroendocrines et non neuroendocrines des noyaux paraventriculaire, périventriculaire et arqué naissent durant cette même période (Markakis et Swanson, 1997). Au plus haut du pic, un peu moins de 20% des neurones à RFRP contiennent le signal BrdU. Cette observation est compatible avec une fenêtre d'incorporation du BrdU de 2 h après l'injection, et notre protocole qui consistait en une injection unique pour chaque stade.

Deux points d'intérêt pour nous sont à souligner : tout d'abord, le fait que les neurones à RFRP soient générés en un pic étroit suggère qu'ils forment une population relativement homogène malgré leur localisation dans des structures cytoarchitectoniques hypothalamiques voisines mais distinctes. Par ailleurs, les neurones à RFRP bordent médialement la 'zone à MCH' ; c'est-à-dire qu'ils sont localisés dans une zone de l'hypothalamus tubéral avec les mêmes frontières antéropostérieures que les neurones à MCH, mais ne sont co-localisés qu'avec les plus médians de ces derniers. Les travaux effectués au laboratoire et déjà exposés dans l'introduction, ont montré que les sous-populations de neurones à MCH sont générées à des temps différents : grossièrement, les plus latéraux naissent avant les plus médians. Il est intéressant de constater que le pic de genèse des neurones à RFRP est légèrement plus tardif que les neurones à MCH à projections corticales (E12-E13), par contre les neurones à MCH co-localisés avec ceux à RFRP naissent de E14 à E16. Enfin, les neurones à hypocrélines sont générés en un pic étroit à E12.

Ainsi, nos résultats associés à ceux précédemment obtenus permettent une meilleure compréhension de l'ontogenèse de la région tubérale de l'hypothalamus. Diverses populations de neurones sont générées par vagues successives, avec alternativement les neurones à MCH à projection spinale (type A à E11) puis les neurones à hypocrélines (E12), les neurones à MCH à projection corticale (type B à E12-E13), les neurones à RFRP (E13-E14) et enfin les neurones à MCH plus périventriculaires (peut-être un type C d'après Brischoux *et al.*, 2001, à E14-E16). Ces neurones se mettant en place suivant un schéma grossièrement de latéral à médian (Fig 35), cette hypothèse attire trois commentaires :

- dans le télencéphale, et notamment dans le cortex, les divers types neuronaux qui s'établissent suivant un gradient 'inside-out' sont générés suivant le même schéma de vagues successives (Molyneaux *et al.*, 2007) : il pourrait donc s'agir d'un phénomène général de production des différents territoires cérébraux, et pas seulement réservé aux structures d'organisation laminaire.
- Il est évident que les pics de production des neurones les plus précoces sont plus étroits que ceux produits plus tardivement (par exemple, Hcrt à E12 et RFRP à E13-E14) ; cette observation est compatible avec l'allongement de la durée du cycle cellulaire (notamment G1) avec le stade embryonnaire. Le cycle cellulaire étant plus long, les neurones sont générés sur une période de temps plus importante.
- il est vraiment tentant de comparer ces vagues de genèse de neurones à projection descendante très longues, puis à des projections descendantes plus courtes et à des projections ascendantes, et enfin à projection plutôt intra-hypothalamique à la différenciation des zones latérale, médiane et périventriculaire de l'hypothalamus.

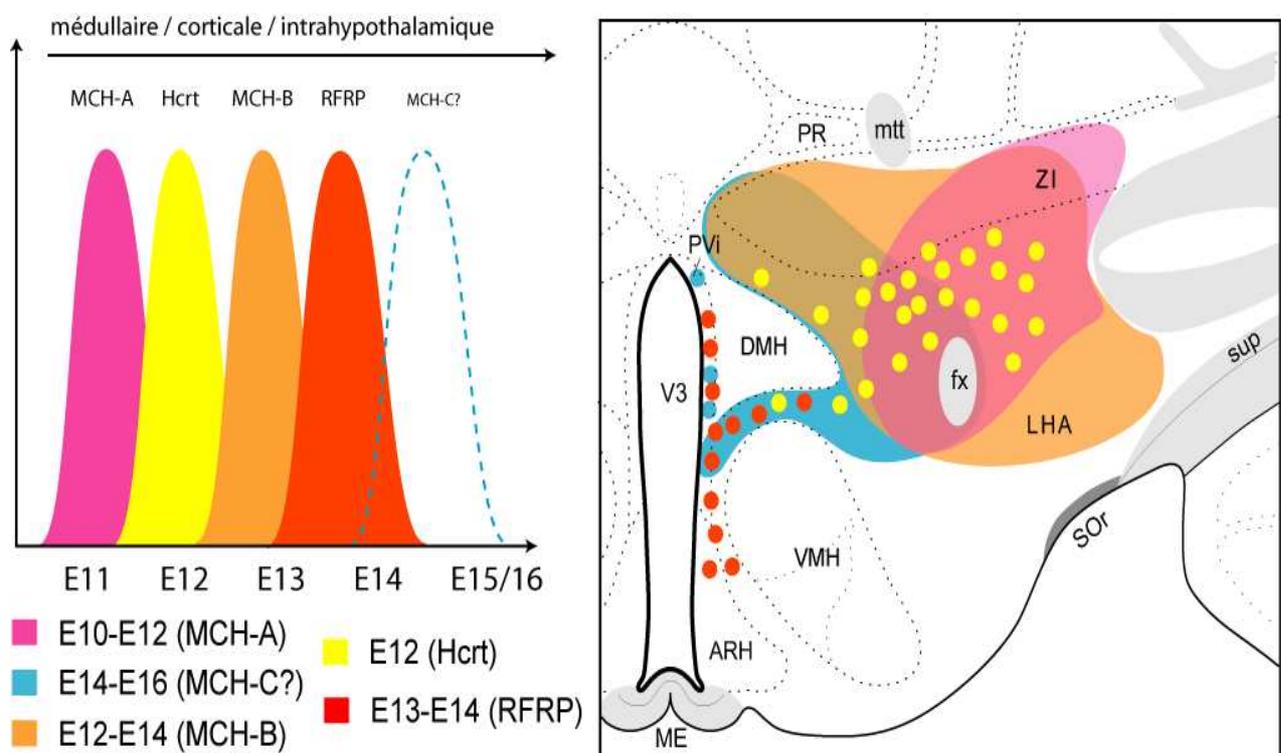


Fig 35 : Diagramme schématique des vagues successives de neurogenèse dans l'hypothalamus tubéral des neurones MCH-A, Hcrt, MCH-B, RFRP (et MCH-C ?), et leur localisation schématique (voir texte pour détails) sur une coupe frontale d'hypothalamus de rat (niveau 28 de l'atlas de Swanson, 1992).

## 2.2 DIFFÉRENTIATION DES NEURONES À RFRP

Les observations obtenues sur notre matériel tendraient à indiquer que les neurones à RFRP appartiennent aux populations de neurones qui acquièrent leur phénotype chimique tardivement. Les premiers corps cellulaires détectés par hybridation *in situ* n'ont été révélés qu'au 3<sup>ème</sup> jour de vie postnatale (P3) majoritairement en position périventriculaire. Le nombre de corps cellulaires RFRP-positifs est en petite quantité au 3<sup>ème</sup> jour de vie postnatale. Ces péricaryons continuent de se différencier jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de vie postnatale (P6) vers des aires plus latérales de la capsule du noyau ventromédian, de façon très similaire à la distribution observée dans le cerveau adulte de rongeur. De plus, contrairement aux travaux de Yano (2004), nous n'avons pas observé de neurones à RFRP en-dehors des sept noyaux hypothalamiques précédemment cités. Très peu d'informations ont été publiées concernant l'évolution de l'organisation du système à RFRP pendant l'ontogénèse. En fait, seule une étude concernait des dosages des taux d'expression et de détection de l'ARNm RFRP, ou la détection des peptides (Yano *et al.*, 2004). Les auteurs rapportaient différentes dates de détection de l'ARNm RFRP ou des peptides, RFRP-1 et RFRP-3, issus du précurseur. Ils ont montré par des techniques de RT-PCR, que l'ARNm RFRP était exprimé dans le cerveau de rongeur à partir du 15<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire (E15). Une analyse par hybridation *in situ* avec une sonde radiomarquée, a révélé la présence de l'expression de l'ARNm RFRP au 16<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire (E16) dans la partie caudale de l'hypothalamus. Par l'utilisation d'anticorps non commerciaux dirigés contre les peptides RFRP-1 et RFRP-3, les auteurs ont montré que les corps cellulaires contenant ces peptides étaient respectivement détectés aux 16<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> jours de vie embryonnaire (E16 et E17), alors que les premières fibres immunoréactives sont observées dès le 18<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire (E18). D'autres territoires -télencéphale, thalamus, mésencéphale, tronc cérébral et moelle- sont aussi concernés par l'expression de ces peptides RFRP-1 et RFRP-3, dans les derniers jours de vie embryonnaire (E20-E21). Yano *et al.*, ont montré également que la population de neurones à RFRP exprimée dans l'hypothalamus avait acquis définitivement son phénotype chimique dès la

naissance (P0). Les différences obtenues entre notre équipe et celle de Yano *et al.* pourraient être dues à des différences inter-souche, ces auteurs ayant travaillé sur la souche ‘Sprague-Dawley’. Cependant, elles reflètent peut-être ainsi des différences de sensibilité des techniques utilisées (RT-PCR et hybridation *in situ* ‘sondes chaudes’ pour Yano *et al.* ; hybridation *in situ* ‘sonde digoxygénine’ en ce qui nous concerne). Nous n’avons pas poursuivi nos investigations dans ce domaine parce que, d’une part nous étions plus intéressés par l’aspect neurogenèse du développement de ces neurones, et par ailleurs, toujours parce que nous étions limités dans nos investigations, dû à des infrastructures défectueuses (capacité d’accueil d’animalerie, absence de salle chaude opérationnelle). Ainsi, nous n’avons pas pu tenter de vérifier nos observations chez des animaux de la souche ‘Sprague-Dawley’.

### **3 APPROCHE MORPHOFONCTIONNELLE DU SYSTÈME RFRP**

Les résultats concernant les fonctions potentielles et les afférences au système à RFRP seront discutés dans un paragraphe unique pour deux raisons essentielles : tout d’abord, certains des résultats que nous avons obtenus sont trop préliminaires pour que des conclusions définitives puissent être effectuées. Par ailleurs, il existe un lien évident direct entre les fonctions de ces neurones et les circuits dans lesquels ils sont impliqués.

Comme nous l’avons indiqué dans le rappel bibliographique, la majorité des travaux concernant les fonctions des peptides issus du prépro-RFRP, a concerné leur implication dans le contrôle de l’axe gonadotrope, et donc dans la reproduction ou les comportements reproducteurs au sens large. Ces travaux ont surtout été menés chez l’oiseau où un peptide GnIH (RFRP-2) est identifié. Chez les mammifères, le RFRP-2 (GnIH) n’est pas systématiquement présent dans le précurseur. Par exemple, il n’existe pas chez le rat ou la souris, ce qui ne présage en rien du rôle des neurones. Nous ne reviendrons pas ici sur les arguments en faveur de l’intervention des neurones à RFRP dans la reproduction chez les oiseaux et les mammifères (voir l’introduction

sur les peptides RFRP). Néanmoins, comparé à l'analyse des projections RFRP telles que nous les avons décrites avec l'anticorps anti-hMet, ou telles que rapportées par d'autres auteurs avec des anticorps plus spécifiques, un lien direct avec l'axe gonadotrope semble assez ténu. Des projections dans les territoires ventraux des aires préoptiques où sont localisés les périkaryons à GnRH sont effectivement observées, et des boutons sur des neurones à GnRH ont été décrits dans la littérature chez le cobaye (Kriegsfeld *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007). Nous avons également observé des contacts sur des neurones neuroendocrines préoptiques qui correspondent probablement à des neurones à GnRH. Cependant, ces projections ne nous ont pas semblé abondantes. Mais bien évidemment, nos observations sont à prendre avec prudence dans le sens où notre anticorps n'était pas spécifique, et nous ne nous étendrons pas davantage sur ce point. Un autre argument, plus convaincant à nos yeux, plaide en faveur, non pas de l'absence de l'implication du système à RFRP dans le contrôle de l'axe gonadotrope, mais plutôt de sa participation dans d'autres fonctions : la localisation de nombreux corps cellulaires dans la capsule du VMH et certains territoires adjacents tels que le noyau dorsomédian. Peu de choses sont connues sur cette capsule du VMH. Le noyau ventromédian lui-même, tout du moins sa partie ventrolatérale qui ne contient aucun neurone à RFRP, est impliquée dans le phénomène de lordose, exprime abondamment les récepteurs aux stéroïdes sexuels (estrogène et progestérone). La partie dorsomédiane du noyau n'exprime que le récepteur aux androgènes, et la capsule du noyau ne semble pas particulièrement marquée pour les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Simerly *et al.*, 1990). Le noyau dorsomédian qui contient quelques corps cellulaires à RFRP n'est par ailleurs pas connu non plus comme un acteur essentiel du contrôle de l'axe gonadotrope. Ce noyau est impliqué dans d'autres fonctions telles que le contrôle des rythmes circadiens grâce à ces connexions avec le noyau suprachiasmatique et la région subparaventriculaire (Chou *et al.*, 2003). De manière intéressante, un travail récent a montré que les neurones à RFRP chez le hamster sont modulés par la photopériode via un processus dépendant de la mélatonine, mais indépendant des stéroïdes sexuels (Revel *et al.*, 2008).

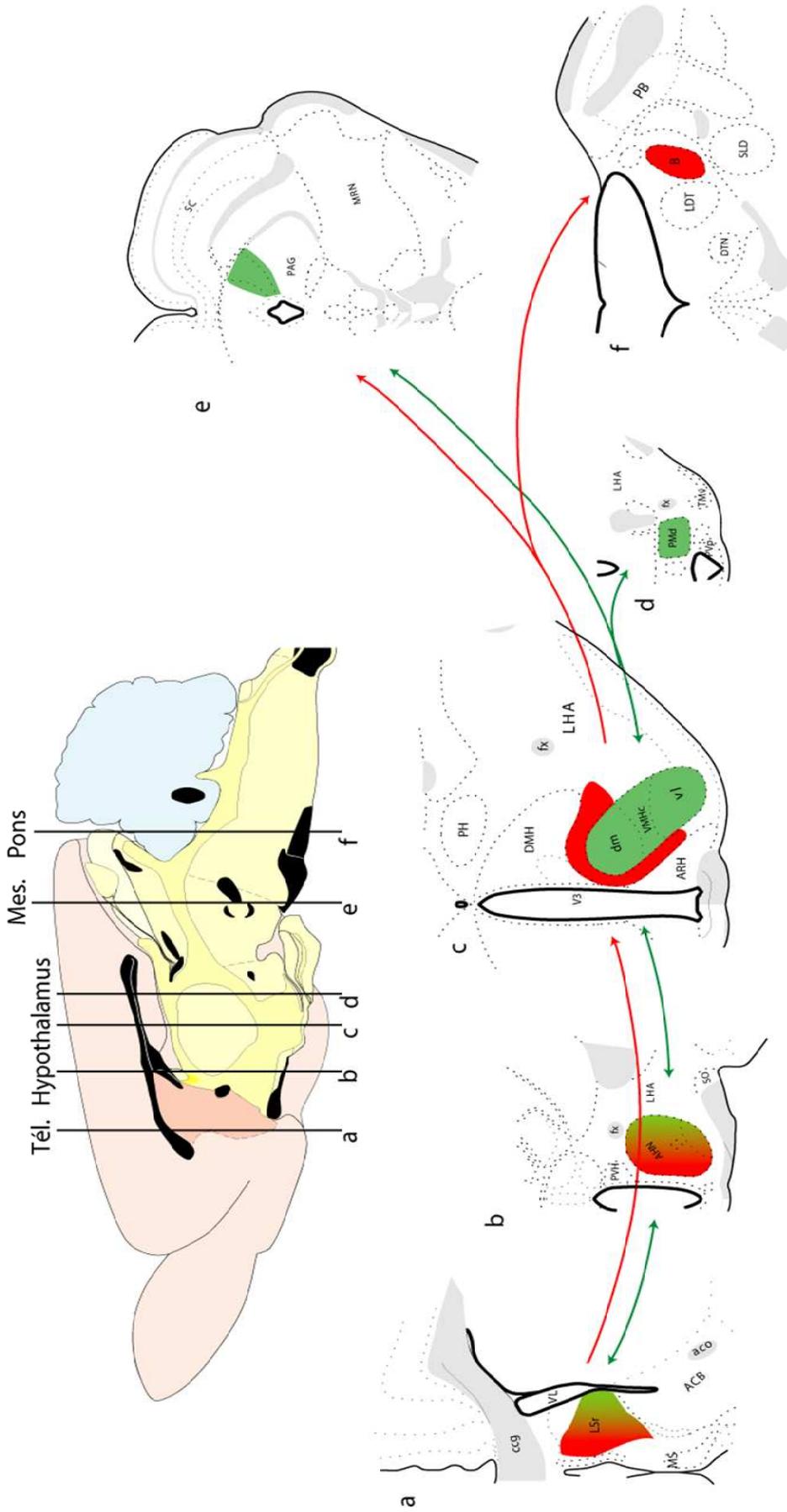
Cependant, aucune évidence de contrôle de l'expression de RFRP par la photopériode n'a été observée chez le rat.

En revanche, la capsule du VMH, qui contient une majorité de neurones à RFRP, reçoit des afférences extrêmement abondantes de structures associées aux comportements de défense. En effet, il est signalé dans la littérature que le noyau antérieur de l'hypothalamus et certaines divisions du noyau latéral du septum projettent sur la partie dorsomédiane du VMH, ainsi que sur la capsule. À l'époque, ces projections furent assimilées à des afférences au VMH lui-même et les résultats interprétés uniquement dans ce sens. En effet, l'organisation cytoarchitectonique de la région était basée sur les travaux de Millhouse des années 1960-80, qui montraient par la technique de Golgi que des dendrites de neurones du VMH s'étendaient en-dehors du noyau dans une 'cell poor zone' ou 'zone pauvre en cellule' aussi appelée capsule. Les fibres dans la capsule étaient donc supposées innover ces dendrites. Avec l'identification de neurones spécifiquement localisés dans cette capsule, et pas dans le VMH lui-même, il était nécessaire de réévaluer ces observations. L'analyse des projections ayant internalisé le PHA-L après injection dans le noyau antérieur, montre que ce noyau, mais surtout ces parties centrale et postérieure, innerve autant le VMH que la capsule. Ces projections qui se divisent en de nombreuses courtes collatérales ne marquent pas la frontière du noyau, donnant le sentiment d'innervation d'un territoire homogène. En revanche, les fibres issues du noyau latéral du septum se terminent spécifiquement dans la capsule du VMH, où sont localisés de nombreux corps cellulaires à RFRP. Par double marquage, nous avons confirmé que des projections issues de ces territoires innervent des péricaryons à RFRP marqués par hybridation *in situ*. Ces fibres respectent parfaitement la partie dorsomédiane de la capsule du VMH, ne pénétrant que peu les structures nucléaires voisines. Un autre point intéressant est que ces fibres sont issues d'une division spécifique du LSN appelée LSNr.dl (Risold et Swanson, 1997). Il est hors de propos de revenir ici en détail sur les divisions anatomiques de ce noyau télencéphalique. Plus d'une vingtaine ont été identifiées. Le point intéressant est que cette partie du LSN projette également de manière

très massive sur le AHN, aussi bien la partie antérieure que centrale et postérieure (Risold *et al.*, 1994). Les noyaux antérieur et ventromédian (partie dorsomédiane) sont impliqués dans l'intégration et la réalisation des réponses comportementales liées aux réactions de stress et de défense. En effet, comme nous l'avons vu, le noyau ventromédian reçoit des projections du noyau antérieur de l'hypothalamus, lui-même innervé massivement par des projections issues du noyau latéral du septum. Ceci forme la partie du circuit lié aux comportements de défense, située en amont du noyau ventromédian. A partir de ce dernier, la partie avale du circuit implique le noyau prémamillaire dorsal et la substance grise périaqueducale (Risold *et al.*, 1994 ; Risold et Swanson, 1997). Ainsi, il nous est apparu essentiel de vérifier si les neurones à RFRP sont susceptibles d'être impliqués dans les réactions de stress et de défense. Des expérimentations ont donc été réalisées sur des rats mâles placés pendant 3 heures dans des conditions d'immobilisation totale afin de doser d'éventuelles variations des taux d'expression des ARNm RFRP. Seul ce paradigme a pu être mis en œuvre, et nous sommes conscients qu'il est nécessaire de compléter cette expérience par d'autres faisant appel à d'autres conditions expérimentales (exposer les animaux à un prédateur ou son odeur, par exemple). Néanmoins, nos résultats ont montré une augmentation significative de ces taux, de l'ordre de 30%. Cette donnée semble confirmer notre hypothèse concernant la participation de la population de neurones dans des fonctions associées au stress ou aux réactions de défense. Il est intéressant de replacer dans ce contexte l'innervation du noyau de Barrington qui a été observée lors de l'étude de la distribution du marquage fourni par l'anticorps anti-hMet. Comme nous l'avons rappelé à plusieurs reprises, nous avons montré que cet anticorps était aspécifique et marquait en autres la population de neurones à RFRP : nous reformulons ici nos remarques de prudence. Le noyau de Barrington semble être impliqué dans les circuits liés au stress (Sved *et al.*, 2002), et en particulier la miction (Sato *et al.*, 1978 ; Mallory *et al.*, 1991 ; Blok, 2002). Il serait donc possible que les neurones à RFRP par l'intermédiaire de ces projections interviennent dans les phénomènes de

miction fréquemment observés chez les rongeurs en situation de stress et en tant que réaction de défense (Fig 36).

Enfin, des données de la littérature indiquent que l'homologue du peptide RFRP stimule la prise alimentaire chez le poulet après avoir été injecté dans les ventricules latéraux (Tachibana *et al.*, 2005). Cette étude a été réalisée en utilisant des peptides synthétiques. Chez les oiseaux, à partir du précurseur des peptides GnIH, trois peptides sont synthétisés : GnIH, GnIH-RP1 'gonadotropin-inhibitory hormone-related peptide 1' et GnIH-RP2 'gonadotropin-inhibitory hormone-related peptide 2'. Ces peptides possèdent la même extrémité C-terminale. Cependant, ils possèdent chacun une extrémité N-terminale spécifique. Cette dernière est la plus importante dans les fonctions orexigènes de cette famille GnIH. En effet, des injections de l'extrémité C-terminale tronquée ne permettent pas la stimulation de la prise alimentaire chez les poulets. Très récemment, l'hypothèse de l'implication de la famille des peptides RFRP dans la prise alimentaire a été émise chez les mammifères (Bechtold et Luckman, 2007). Parce que co-localisés avec des périkaryons à MCH et Hcrt, la question de la participation de ces neurones au contrôle de la balance énergétique s'est tout naturellement posée. Des études préliminaires ont été effectuées. Les résultats obtenus montre une tendance à une diminution de l'expression de l'ARNm RFRP dans des conditions de jeûne et un retour à la normale ou légèrement plus que la normale après réalimentation. Nous nous contenterons ici d'acter ces observations qui semblent montrer des variations d'expression inférieures à celle constatées après stress d'immobilisation.



**Fig. 36:** Représentation schématique des circuits physiologiques liés aux réactions de stress et de défense. Le circuit indiqué en vert correspond au circuit déjà connu, impliquant le noyau ventromédian. En rouge est représenté le circuit nouvellement identifié, impliquant les neurones à RFRP distribués dans la capsule du noyau ventromédian.

# CONCLUSION



Nous avons déjà insisté dans ce manuscrit sur les raisons qui nous ont conduits à réorienter nos travaux par rapport à nos objectifs initiaux, et nous ne reviendrons pas sur ce point ici. Concrètement, nos travaux ont concerné pour l'essentiel une population de neurones producteurs des peptides RFRP. Par hybridation *in situ*, nous en avons analysé la distribution détaillée des corps cellulaires. Ces neurones sont spécifiques de l'hypothalamus tubéral. Ils bordent un territoire appelé 'zone à MCH' et caractérisé par des neurones producteurs des peptides MCH ou HcrT étudiés au laboratoire. L'analyse de la genèse des neurones à RFRP montre qu'ils naissent en un pic aux 13-14<sup>èmes</sup> jours de vie embryonnaire. Ces résultats complètent les données précédemment obtenues concernant la genèse des neurones à MCH et HcrT et fournissent des informations essentielles afin de mieux comprendre la différenciation médiolatérale de l'hypothalamus.

D'un point de vue morpho-fonctionnel, les neurones à RFRP reçoivent des afférences d'origines hypothalamiques et extrahypothalamiques. Certaines de ces afférences ciblent spécifiquement leur territoire de distribution dans l'hypothalamus tubéral, notamment celles issues d'une division du noyau latéral du septum. En revanche, les projections RFRP innervent prioritairement des structures hypothalamiques ou proches de l'hypothalamus (télencéphale basal), où elles sont distribuées de manière assez diffuse. Cette population a été impliquée expérimentalement dans le contrôle de l'axe gonadotrope et est sensible à la photopériode. Nos travaux suggèrent par ailleurs sa participation dans d'autres comportements sociaux (défense) ou liés au stress, ainsi que peut-être dans le contrôle de la balance énergétique. Cette variété de réponse plaide en faveur de son intégration dans le 'réseau générateur de schéma viscéromoteur' ('visceromotor pattern generator network') avancé par Thompson et Swanson (2003) et impliqué dans la coordination des réponses neuroendocrines et viscérales caractéristiques de l'expression des comportements motivés. Cependant, il est clair que beaucoup de nos travaux sont encore trop préliminaires, et nécessitent d'être complétés et poursuivis afin de mieux comprendre les fonctions de ces neurones et les circuits dans lesquels ils sont impliqués.



# **BIBLIOGRAPHIE**



**AARNISALO AA, TUOMINEN RK, NIEMINEN M, VAINIO P, PANULA P.**

Evidence for prolactin releasing activity of neuropeptide FF in rats.

Neuroendocrinol Lett 1997 ; 18(4): 191-6.

**ADACHI S, YAMADA S, TAKATSU Y, MATSUI H, KINOSHITA M, TAKASE K, et al.**

Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats.

J Reprod Dev 2007 ; 53(2) : 367-78.

**AMIOT C, BRISCHOUX F, COLARD C, LA ROCHE A, FELLMANN D, RISOLD PY.**

Hypocretin/orexine-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon.

Eur J Neurosci 2005 ; 22(2) : 531-4.

**ANDERSON GM, STEYN FJ, TSUTSUI K, UKENA K, BENTLEY GE, HERBISON AE.**

Is there a gonadotropin-inhibitory hormone system in mammals?

Soc Neurosci. 2005 ; HH12.

**BAYER L.**

Phénotype chimique, organisation et fonctions des neurones à MCH (hormone de mélanocortine) chez le rat: études *in vitro* et en cultures de tranches hypothalamiques.

Th : Sci : Besançon ; 2000. 25-00-05.

**BAYER L, RISOLD PY, GRIFFOND B, FELLMANN D.**

Rat diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by ascending cholinergic projections.

Neuroscience 1999 ; 91(3) : 1087-101.

**BECHTOLD DA, LUCKMAN SM.**

The role of RFamide peptides in feeding.

J endocrinol 2007 ; 192(1) : 3-15.

**BENTLEY GE, JENSEN JP, KAUR GJ, WACKER DW, TSUTSUI K, WINGFIELD JC.**

Rapid inhibition of female sexual behaviour by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH).

Horm Behav 2006a ; 49(4) : 550-5.

**BENTLEY GE, KRIEGSFELD LJ, OSUGI T, UKENA K, O'BRIEN S, PERFITO N, *et al.***

Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals.

J Exp Zool A Comp Exp Biol 2006b ; 305(9) : 807-14.

**BENTLEY GE, UBUKA T, MCGUIRE NL, CHOWDHURY VS, MORITA Y, YANO T, *et al.***

Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system.

Gen Comp Endocrinol 2008 ; 156(1) : 34-43.

**BILBAN M, GHAFFARI-TABRIZI N, HINTERMANN E, BAUER S, MOLZER S, ZORATTI C, *et al.***

Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts.

J Cell Sci 2004 ; 117(Pt8) : 1319-28.

**BITTENCOURT JC, ELIAS CF.**

Diencephalic origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive projections to medial septum/diagonal band complex and spinal cord using two retrograde fluorescent tracers.

Ann N Y Acad Sci 1993 ; 680 : 462-5.

**BITTENCOURT JC, ELIAS CF.**

Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers.

Brain Res 1998 ; 805(1-2) : 1-19.

**BITTENCOURT JC, PRESSE F, ARIAS C, PETO C, VAUGHAN J, NAHON JL, *et al.***

The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization.

J Comp Neurol 1992 ; 319(2) : 218-45.

**BLOCK BF.**

Brain control of the lower urinary tract.

Scand J Urol Nephrol Suppl 2002 ; (210) : 11-5.

**BOER HH, SCHOT LP, VEENSTRA JA, REICHEL D.**

Immunocytochemical identification of neural elements in the central nervous systems of a snail, some insects, a fish, and a mammal with an antiserum to the molluscan cardio-excitatory tetrapeptide FMRF-amide.

Cell Tissue Res 1980 ; 213(1) : 21-7.

**BRAILOIU GC, DUN SL, OHSAWA M, YIN D, YANG J, CHANG JK, *et al.***

KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain.

J Comp Neurol 2005 ; 481(3) : 314-29.

**BRETON C, FELLMANN D, BUGNON C.**

Clonage et séquençage d'ADNc du précurseur commun de trois neuropeptide hypothalamiques immunologiquement apparentés à la somatocrinine humaine 1-37, à l' $\alpha$ -mélanotropine et à l'hormone de mélanocortine du saumon.

C R Acad Sci Paris 1989 ; 309(20) :749-54.

**BRISCHOUX F.**

Étude ontogénétique du système à hormone de mélanocortine (MCH) et régionalisation de l'hypothalamus.

Th : Sci. Vie Santé : Besançon ; 2002. 25-02-06.

**BRISCHOUX F, FELLMANN D, RISOLD PY.**

Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis.

Eur J Neurosci 2001 ; 13(9) : 1733-44.

**BRISCHOUX F, CVETKOVIC V, GRIFFOND B, FELLMANN D, RISOLD PY.**

Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone.

Eur J Neurosci 2002 ; 16(9) : 1672-80.

**BROBERGER C.**

Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexine/hypocretin and neuropeptide Y.

Brain Res 1999 ; 848(1-2) : 101-13.

**BUGNON C, BLOCH B, FELLMANN D, GOUGET A.**

Comparative study in the guinea pig, cat and dog of hypothalamo-infundibular nervous fibers immunoréactives to an anti-LH-RH immune serum.

C R Seances Soc Biol Fil 1976 ; 170(1) : 83-7.

**CALISI RM, RIZZO NO, BENTLEY GE.**

Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*).

Gen Comp Endocrinol 2008 ; 157(3) : 283-7.

**CASATTI CA, ELIAS CF, SITA LV, FRIGO L, FURLANI VC, BAUER JA, et al.**

Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus.

Neuroscience 2002 ; 115(3) : 899-915.

**CASTELLANO JM, NAVARRO VM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, CASTAÑO JP, MALAGÓN MM, AGUILAR E, *et al.***

Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat.

Mol Cell Endocrinol 2006a ; 257-258 : 75-83.

**CASTELLANO JM, NAVARRO VM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, ROA J, VIGO E, PINEDA R, *et al.***

Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats.

Diabetes 2006b ; 55(9) : 2602-10.

**CASTELLANO JM, GAYTAN M, ROA J, VIGO E, NAVARRO VM, BELLIDO C, *et al.***

Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?

Endocrinology 2006c ; 147(10) : 4852-62.

**CHOU TC, SCAMMELL TE, GOOLEY JJ, GAUS SE, SAPER CB, LU J.**

Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms.

J Neurosci 2003 ; 23(33) : 10691-702.

**CLARKSON J, HERBISON AE.**

Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons.

Endocrinology 2006 ; 147(12) : 5817-25.

**CVETKOVIC V, BRISCHOUX F, JACQUEMARD C, FELLMANN D, GRIFFOND B, RISOLD PY.**

Characterization of subpopulations of neurons producing melanin-concentrating hormone in the rat ventral diencephalon.

J Neurochem 2004 ; 91(4) : 911-9.

**CVETKOVIC V, PONCET F, FELLMANN D, GRIFFOND B, RISOLD PY.**

Diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by local and multiple extra-hypothalamic tachykininergic projections through the neurokinin 3 receptor.

Neuroscience 2003 ; 119(4) :1113-45.

**DAIKOKU S, OKAMURA Y, KAWANO H, TSURUO Y, MAEGAWA M, SHIBASAKI T.**

CRF-containing neurons of the rat hypothalamus.

Cell Tissue Res 1985 ; 240(3) : 575-84.

**DE LECEA L, KILDUFF TS, PEYRON C, GAO XB, FOYE PE, DANIELSON PE, *et al.***

The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity.

Proc Natl Acad Sci USA 1998 ; 95(1) : 322-7.

**DE ROUX N, GENIN E, CAREL JC, MATSUDA F, CHAUSSAIN JL, MILGROM E.**

Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54.

Proc Natl Acad Sci USA 2003 ; 100(19) : 10972-6.

**DOCKRAY GJ, REEVE JR JR, SHIVELY J, GAYTON RJ, BARNARD CS.**

A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide.

Nature 1983 ; 305(5932) : 328-30.

**DUNGAN HM, CLIFTON DK, STEINER RA.**

Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion.

Endocrinology 2006 ; 147(3) : 1154-8.

**ELIAS CF, BITTENCOURT JC.**

Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter.

Brain Res 1997 ; 755(2) : 255-71.

**FELLMANN D.**

Contribution à l'étude du système peptidergique hypothalamique à somatostatine. Étude cyto-immunologique comparative chez le fœtus, le rat et le renard.

Ann Sci Univ Franche-Comté : 1978 ; 7.

**FELLMANN D, BUGNON C, RISOLD PY.**

Unrelated peptide immunoreactivities coexist in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus: human growth hormone-releasing factor 1-37-, salmon melanin-concentrating hormone- and alpha-melanotropin-like substances.

Neurosci Lett 1987 ; 74(3) : 275-80.

**FELLMANN D, BUGNON C, VERSTEGEN J, LAVRY GN.**

Coexpression of human growth hormone-releasing factor 1-37-like and  $\alpha$ -melanotropin-like immunoreactivities in neurons of the rat lateral dorsal hypothalamus.

Neurosci Lett 1986 ; 68(1) : 122-6.

**FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, MARTINI AC, NAVARRO VM, CASTELLANO JM, DIEGUEZ C, AGUILAR E, *et al.***

Novel signals for the integration of energy balance and reproduction.

Mol Cell Endocrinol 2006 ; 254-255 : 127-32.

**FRANCESCHINI I, LOMET D, CATEAU M, DELSOL G, TILLET Y, CARATY A.**

Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha.

Neurosci Lett 2006 ; 401(3) : 225-30.

**FUKUSUMI S, HABATA Y, YOSHIDA H, IJIMA N, KAWAMATA Y, HOSOYA M, *et al.***

Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1.

Biochim Biophys Acta 2001 ; 1540(3) : 221-32.

**FUNES S, HEDRICK JA, VASSILEVA G, MARKOWITZ L, ABBONDANZO S, GOLOVKO A, *et al.***

The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system.

Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 312(4) : 1357-63.

**GIBSON EM, HUMBER SA, JAIN S, WILLIAMS III WP, ZHAO S, BENTLEY GE, *et al.***

Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge.

Endocrinology 2008 ; 149(10) : 4958-69.

**GOTTSCH ML, CUNNINGHAM MJ, SMITH JT, POPA SM, ACOHIDO BV, CROWLEY WF, *et al.***

A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse.

Endocrinology 2004a ; 145(9) : 4073-7.

**GOTTSCH ML, CLIFTON DK, STEINER RA.**

Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction.

Trends Endocrinol Metab 2004b ; 15(5) : 215-21.

**GOTTSCH ML, CLIFTON DK, STEINER RA.**

Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis.

Mol Cell Endocrinol 2006 ; 254-255 : 91-6.

**GRATZNER HG.**

Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication.

Science 1982 ; 218(4571) : 474-5.

**GREIVES TJ, MASON AO, SCOTTI MAL, LEVINE J, KETTERSON ED, KRIEGSFELD LJ, *et al.***

Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction.

Endocrinology 2007 ; 148(3) : 1158-66.

**GRIFFOND B, CIOFI P, BAYER L, JACQUEMARD C, FELLMANN D.**

Immunocytochemical detection of the neurokinin B receptor (NK3) on melanin-concentrating hormone (MCH) neurons in rat brain.

J Chem Neuroanat 1997 ; 12(3) : 183-9.

**GRIFFOND B, GRILLON S, DUVAL J, COLARD C, JACQUEMARD C, DERAY A, *et al.***

Occurrence of secretogonin II in the prolactin-immunoreactive neurons of the rat lateral hypothalamus: an in situ hybridization and immunocytochemical study.

J Chem Neuroanat 1995 ; 9(2) :113-9.

**GRIFFOND B, GRILLON S, HERVE C, DERAY A, FELLMANN D.**

Morphofunctional changes in melanin-concentrating hormone-producing neurons in relation to the control of food and water intake.

Ann N Y Acad Sci 1998 ; 839 : 219-22.

**GRIFFOND B, RISOLD P-Y, JACQUEMARD C, COLARD C, FELLMANN D.**

Insulin-induced hypoglycaemia increases preprohypocretin (orexine) mRNA in the rat lateral hypothalamic area.

Neurosci Lett 1999 ; 262(2) : 77-80.

**GRILLON S, COLARD C, RISOLD PY, FELLMANN D, GRIFFOND B.**

Ontogenic development of prolactin immunoréactives neurons in the rat lateral hypothalamus.

Neuropeptides 1998 ; 32(4) :327-32.

**HARMS JF, WELCH DR, MIELE ME.**

Kiss1 metastasis suppression and emergent pathways.

Clin Exp Metastasis 2003 ; 20(1) : 11-8.

**HAUGE-EVANS AC, RICHARDSON CC, MILNE HM, CHRISTIE MR, PERSAUD SJ,  
JONES PM.**

A role for kisspeptin in islet function.

Diabetologia 2006 ; 49(9) : 2131-5.

**HERVE C, COLARD C, GRILLON S, FELMANN D, GRIFFOND B.**

Polyethylene glycol-induced hypovolemia affects the expression of MCH mRNA, but not dynorphin or secretogranin II mRNAs, in the rat lateral hypothalamus.

Neurosci Lett 1998 ; 248(2) : 133-7.

**HINUMA S, HABATA Y, FUJI R, KAWAMATA Y, HOSOYA M, FUKUSUMI S, *et al.***

A prolactin-releasing peptide in the brain.

Nature 1998 ; 393(6682) : 272-6.

**HINUMA S, SHINTANI Y, FUKUSUMI S, IJIMA N, MATSUMOTO Y, HOSOYA M, *et al.***

New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals.

Nat Cell Biol 2000 ; 2(10) : 703-8.

**HÖKFELT T, MÅRTENSSON R, BJÖRKLUND A, KLEINAU S, GOLDSTEIN M.**

Distributional maps of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat brain.

In: BJÖRKLUND A, HÖKFELT T, Eds

Handbook of chemical neuroanatomy, vol 2: Classical transmitters in the CNS, Part I.

Amsterdam : Elsevier, 1984. p277-379.

**IRWIG MS, FRALEY GS, SMITH JT, ACOHIDO BV, POPA SM, CUNNINGHAM MJ,  
*et al.***

Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat.

Neuroendocrinology 2004 ; 80(4) : 264-72.

**JANNEAU JL, MALDONADO-ESTRADA J, TACHDJIAN G, MIRAN I, MOTTÉ N,  
SAULNIER P, *et al.***

Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblasts cells.

J Clin Endocrinol Metab 2002 ; 87(11) : 5336-9.

**JOHNSON MA, TSUTSUI K, FRALEY GS.**

Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behaviour in the adult male rat.

Horm Behav 2007 ; 51(1) : 171-80.

**KALRA SP, HORVATH TL.**

Neuroendocrine interactions between galanin, opioid and neuropeptide Y in the control of reproduction and appetite.

Ann N Y Acad Sci 1998 ; 863 : 236-40.

**KAUFFMAN AS, GOTTSCH ML, ROA J, BYQUIST AC, CROWN A, CLIFTON DK, *et al.***

Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat.

Endocrinology 2007 ; 148(4) : 1774-83.

**KAVALIERS M, HIRST M, MATHERS A.**

Inhibitory influences of FMRFamide on morphine- and deprivation-induced feeding.

Neuroendocrinology 1985 ; 40(6) : 533-5.

**KINOSHITA T, IMAMURA J, NAGAI H, SHIMOTOHNO K.**

Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction.

Anal Biochem 1992 ; 206(2) : 231-5.

**KINOSHITA M, TSUKAMURA H, ADACHI S, MATSUI H, UENOYAMA Y, IWATA K, *et al.***

Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats.

Endocrinology 2005 ; 146(10) : 4431-6.

**KNOLLEMA S, BROWN ER, VALE W, SAWCHENKO PE.**

Novel hypothalamic and preoptic sites of prepromelanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid and peptide expression in lactating rats.

J Neuroendocrinol 1992 ; 4 : 709-17.

**KODA A, UKENA K, TERANISHI H, OHTA S, YAMAMOTO K, KIKUYAMA S, *et al.***

A novel amphibian hypothalamic neuropeptide: isolation, localization, and biological activity.

Endocrinology 2002 ; 143(2) : 411-9.

**KOLB B, PEDERSEN B, BALLERMANN M, GIBB R, WHISHAW IQ.**

Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioural abnormalities.

J Neurosci 1999 ; 19(6) : 2337-46.

**KOTANI M, DETHEUX M, VANDENBOGAERDE A, COMMUNI D,  
VANDERWINDEN JM, LE POUL E, *et al.***

The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54.

J Biol Chem 2001 ; 276(37) : 34631-36.

**KRIEGSFELD LJ.**

Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel.

Horm Behav 2006 ; 50(5) : 655-66.

**KRIEGSFELD LJ, MEI DF, BENTLEY GE, UBUKA T, MASON AO, INOUE K, *et al.***

Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals.

Proc Natl Acad Sci USA 2006 ; 103(7) : 2410-5.

**LABATUT R, RICHARD F, MILNE B, QUINTIN L, LECESTRE D, PUJOL JF.**

Long-term effects of RU24722 on tyrosine hydroxylase of the rat brain.

J Neurochem 1988 ; 51(5) : 1367-74.

**LEE DK, NGUYEN T, O'NEILL GP, CHENG R, LIU Y, HOWARD AD, *et al.***

Discovery of a receptor related to the galanin receptors.

FEBS Lett 1999 ; 446(1) : 103-7.

**LEE JH, WELCH DR.**

Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1.

Cancer Res 1997 ; 57(12) : 2384-7.

**LEE JH, MIELE ME, HICKS DJ, PHILLIPS KK, TRENT JM, WEISSMAN BE, *et al.***

KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene.

J Natl Cancer Inst 1996 ; 88(23) : 1731-7.

**LEGAGNEUX K, BERNARD-FRANCHI G, PONCET F, LA ROCHE A, COLARD C, FELLMANN D, *et al.***

Distribution and genesis of the RFRP-producing neurons in the rat brain: comparison with melanin-concentrating hormone- and hypocretin-containing neurons.

Neuropeptides 2009 ; 43(1) : 13-9.

**LESKA A, DUSZA L.**

Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in birds.

Reprod Biol 2007 ; 7(2) : 99-126.

**LI C, KIM K, NELSON LS.**

FMRamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*.

Brain Res 1999 ; 848(1-2) : 26-34.

**LIU Q, GUAN XM, MARTIN WJ, MCDONALD TP, CLEMENTS MK, JIANG Q, *et al.***

Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception.

J Biol Chem 2001 ; 276(40) : 36961-9.

**MADDINENI S, OCÓN-GROVE OM, KRZYSIK-WALKER SM, HENDRICKS III GL, PROUDMAN JA, RAMACHANDRAN R.**

Gonadotropin-inhibitory hormone receptor expression in the chicken pituitary gland: potential influence of sexual maturation and ovarian steroids.

J Neuroendocrinol 2008 ; 20(9) : 1078-88.

**MAEDA KI, ADACHI S, INOUE K, OHKURA S, TSUKAMURA H.**

Metastin/kisspeptin and control of the estrous cycle in rats.

Rev Endocri Metab Disord 2007 ; 8(1) : 21-9.

**MALLORY BS, ROPPOLO JR, DE GROAT WC.**

Pharmacological modulation of the pontine micturition center.

Brain Res 1991 ; 546(2) : 310-20.

**MARKAKIS EA, SWANSON LW.**

Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system.

Brain Res Brain Res Rev 1997 ; 24(2-3) : 255-91.

**MARTOJA R, MARTOJA-PIERSON M.**

Confection des préparations : coupes à la paraffine.

In : MARTOJA R, MARTOJA-PIERSON M.

Initiation aux techniques de l'histologie animale.

Paris : Masson et Cie ; 1967. p 39-60.

**MESSAGER S.**

Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty.

J Neuroendocrinol 2005 ; 17(10) : 687-8.

**MESSAGER S, CHATZIDAKI EE, MA D, HENDRICK AG, ZAHN D, DIXON J, *et al.***

Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54.

Proc Natl Acad Sci USA 2005 ; 102(5) : 1761-6.

**MILLHOUSE OE.**

Cytological observations on the ventromedial hypothalamic nucleus.

Cell Tissue Res 1978 ; 191(3) : 473-91.

**MOLYNEAUX BJ, ARLOTTA P, MENEZES JRL, MACKLIS JD.**

Neuronal subtype specification in the cerebral cortex.

Nat Rev Neurosci 2007 ; 8(6) : 427-37.

**MUIR AI, CHAMBERLAIN L, ELSOURBAGY NA, MICHALOVICH D, MOORE DJ, CALAMARI A, *et al.***

AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1.

J Biol Chem 2001 ; 276(31) : 28969-75.

**MURAKAMI M, MATSUZAKI T, IWASA T, YASUI T, IRAHARA M, OSUGI T, *et al.***

Hypophysiotopic role of RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) in the inhibition of LH secretion in female rats.

J Endocrinol 2008 ; 199(1) : 105-12.

**MURRAY JF, BAKER BI, LEVY A, WILSON CA.**

The influence of gonadal steroids on pre-pro melanin-concentrating hormone mRNA in female rats.

J Neuroendocrinol 2000 ; 12(1) : 53-9.

**NAGAO T, KUWAGATA M, SAITO Y.**

Effects of prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on the developing brain and reproductive function in male mouse offspring.

Reprod Toxicol 1998 ; 12(4) : 477-87.

**NAHON JL, PRESSE F, BITTENCOURT JC, SAWCHENKO PE, VALE W.**

The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus.

Endocrinology 1989 ; 125(4) : 2056-65.

**NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, BARREIRO ML, ROA J, SANCHEZ-CRIADO JE, *et al.***

Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide.

Endocrinology 2004 ; 145(10) : 4565-74.

**NAZIAN SJ.**

Role of metastin in the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat.

J Androl 2006 ; 27(3) : 444-9.

**OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S, MATSUMOTO H, HORI A, KANEHASHI K, *et al.***

Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor.

Nature 2001 ; 411(6837) : 613-7.

**OSUGI T, UKENA K, BENTLEY GE, O'BRIEN S, MOORE IT, WINGFIELD JC, *et al.***

Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments.

J Endocrinol 2004 ; 182(1) : 33-42.

**OSUGI T, UKENA K, SOWER SA, KAWAUCHI H, TSUTSUI K.**

Evolutionary origin and divergence of PQRFamide peptides and LPXRFamide peptides in the RFamide peptide family.

FEBS J 2006 ; 273(8) : 1731-43.

**PANULA P, AARNISALO AA, WASOWICZ K.**

Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions.

Prog Neurobiol 1996 ; 48(4-5) : 461-87.

**PAPANICOLAOU GN.**

A new procedure for staining vaginal smears.

Science 1942 ; 95(2469) : 438-9.

**PAXINOS G, WATSON C.**

The rat brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>e</sup> ed.

San Diego: Academic press, 1986.

**PERTOVAARA A, ÖSTERGÅRD M, ÄNKÖ ML, LEHTI-KOIVUNEN S, BRANDT A,  
HONG W, *et al.***

RFamide-related peptides signal through the neuropeptide FF receptor and regulate pain-regulated responses in the rat.

Neuroscience 2005 ; 134(3) : 1023-32.

**PEYRON C, TIGHE DK, VAN DEN POL AN, DE LECEA L, HELLER HC, SUTCLIFFE  
JG, *et al.***

Neurons containing hypocretin (orexine) project to multiple neuronal systems.

J Neurosci 1998 ; 18(23) : 9996-10015.

**POMPOLO S, PEREIRA A, ESTRADA KM, CLARKE IJ.**

Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain.

Endocrinology 2006 ; 147(2) : 804-10.

**POPA SM, CLIFTON DK, STEINER RA.**

A KiSS to remember.

Trends Endocrinol Metab 2005 ; 16(6) : 249-50.

**PRALONG FP, GONZALES C, VOIROL MJ, PALMITER RD, BRUNNER HR, GAILLARD RC, *et al.***

The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions.

FASEB J 2002 ; 16(7) : 712-4.

**PRESSE F, NAHON JL.**

Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat.

Neuroscience 1993 ; 55(3) : 709-20.

**PRESSE F, HERVIEU G, IMAKI T, SAWCHENKO PE, VALE W, NAHON JL.**

Rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid expression: marked changes during development and after stress and glucocorticoid stimuli.

Endocrinology 1992 ; 131(3) : 1241-50.

**PRICE DA, GREENBERG MJ.**

Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc.

Prep Biochem 1977 ; 7(3-4) : 261-81.

**REVEL FG, SABOUREAU M, PÉVET P, SIMONNEAUX V, MIKKELSEN JD.**

RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene.

Endocrinology 2008 ; 149(3) : 902-12.

**RISOLD PY, SWANSON LW.**

Connections of the rat lateral septal complex.

Brain Res Rev 1997 ; 24 : 115-95.

**RISOLD PY, CANTERAS NS, SWANSON LW.**

Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a *Phaseolus vulgaris*-Leucoagglutinin study in the rat.

J Comp neurol 1994 ; 348 : 1-40.

**RISOLD PY, FELLMANN D, LENYS D, BUGNON C.**

Coexistence of acetylcholinesterase-, human growth hormone-releasing factor (1-37)-, alpha-melanotropin- and melanin-concentrating hormone-like immunoreactivities in neurons of the rat hypothalamus: a light and electron microscope study.

Neurosci lett 1989 ; 100(1-3) : 23-8.

**RISOLD PY, GRIFFOND B, KILDUFF TS, SUTCLIFFE JG, FELLMANN D.**

Preprohypocretin (orexin) and prolactin-like immunoreactivity are co-expressed by neurons of the rat lateral hypothalamic area.

Neurosci Lett 1999 ; 259(3) : 153-6.

**RIZWAN MZ, PORTEOUS R, HERBISON AE, ANDERSON GM.**

Cells expressing RFRP-1/3, the mammalian GnIH orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat.

Endocrinology 2009 ; 150(3) : 1413-20.

**ROA J, VIGO E, CASTELLANO JM, NAVARRO VM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, CASANUEVA FF, *et al.***

Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat.

Endocrinology 2006 ; 147(6) : 2864-78.

**RUFFOLO PR, FERM WH.**

The embryocidal and teratogenic effects of 5-bromoeoxyuridine in the pregnant hamster.

Lab Invest 1965 ; 14(8) : 1547-53.

**SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, MATSUZAKI I, CHEMELLI RM, TANAKA H, *et al.***

Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour.

Cell 1998 ; 92(5) : 573-85.

**SAMSON WK, KEOWN C, SAMSON CK, SAMSON HW, LANE B, BAKER JR, *et al.***

Prolactin releasing peptide (PrRP) and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion.

Endocrine 2003 ; 20(1-2) : 59-66.

**SATAKE H, HISADA M, KAWADA T, MINAKATA H, UKENA K, TSUTSUI K.**

Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release.

Biochem J 2001 ; 354(Pt2) : 379-85.

**SATO N, SHIMIZU N, TOHYAMA M, MAEDA T**

Localization of the micturition reflex center at dorsolateral pontine tegmentum of the rat.

Neurosci Lett 1978 ; 8 : 27-33.

**SCOTT WJ.**

Pathogenesis of bromodeoxyuridine-induced polydactyly.

Teratology 1981 ; 23(3) : 383-9.

**SEMINARA SB.**

Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: critical pathway modulating GnRH secretion.

Front Neuroendocrinol 2005 ; 26(3-4) : 131-8.

**SEMINARA SB.**

Mechanisms of disease: the first kiss—a crucial role for kisspeptin-1 and its receptor, G-protein-coupled receptor 54, in puberty and reproduction.

Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2006 ; 2(6) : 328-34.

**SEMINARA SB, KAISER UB.**

New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1.

Endocrinology 2005 ; 146(4) : 1686-8.

**SEMINARA SB, MESSENGER S, CHATZIDAKI EE, THRESHER RR, ACIERNO JS, SHAGOURY JK, *et al.***

The GPR54 gene as a regulator of puberty.

N Engl J Med 2003 ; 349(17) : 1614-27.

**SHAHAB M, MASTRONARDI C, SEMINARA SB, CROWLEY WF, OJEDA SR, PLANT TM.**

Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates.

Proc Natl Acad Sci USA 2005 ; 102(6) : 2129-34.

**SHORR E.**

A new technic for staining vaginal smears : III, a single differential stain.

Science 1941 ; 94(2449) : 545-6.

**SIMERLY RB, CHANG C, MURAMATSU M, SWANSON LW.**

Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study.

J Comp Neurol 1990 ; 294(1) : 76-95.

**SKALKO RG, PACKARD DSJR, SCHWENDIMANN RN, RAGGIO JF.**

The teratogenic response of mouse embryos to 5-bromodeoxyuridine.

Teratology 1971 ; 4(1) : 87-93.

**SKOFITSCH G, JACOBOWITZ DM, ZAMIR N.**

Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain.

Brain Res Bull 1985 ; 15(6) : 635-49.

**SMITH JT, CLARKE IJ.**

Kisspeptin expression in the rat brain: catalyst for the initiation of puberty.

Rev Endocrinol Metab Disord 2007 ; 8(1) : 1-9.

**SMITH JT, CLIFTON DK, STEINER RA.**

Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling.

Reproduction 2006a ; 131(4) : 623-30.

**SMITH JT, COOLEN LM, KRIEGSFELD LJ, SARI IP, JAAFARZADEHSHIRAZI MR,  
MALTBY M, *et al.***

Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep.

Endocrinology 2008 ; 149(11) :5770-82.

**SMITH JT, CUNNINGHAM MJ, RISSMAN EF, CLIFTON DK, STEINER RA.**

Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse.

Endocrinology 2005b ; 146(9) : 3686-92.

**SMITH JT, DUNGAN HM, STOLL EA, GOTTSCH ML, BRAUN RE, EACKER SM, *et al.***

Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse.

Endocrinology 2005a ; 146(7) : 2976-84.

**SMITH JT, POPA SM, CLIFTON DK, HOFFMAN GE, STEINER RA.**

Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge.

J Neurosci 2006b ; 26(25) : 6687-94.

**STAFFORD LJ, XIA C, MA W, CAI Y, LIU M.**

Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor.

Cancer Res 2002 ; 62(19) : 5399-404.

**SUN Y, TIAN Z, ZHAO H, WONG STC, CHEN B.**

Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats.

Neurosci Lett 2007 ; 420(1) : 12-7.

**SVED AF, CANO G, PASSERIN AM, RABIN BS.**

The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress.

Physiol Behav 2002 ; 77(4-5) : 737-42.

**SWANSON LW.**

Brain maps: structure of the rat brain.

Amsterdam: Elsevier, 1992.

**TACHIBANA T, MASUDA N, TSUTSUI K, UKENA K, UEDA H.**

The orexigenic effect of GnIH is mediated by central opioid receptors in chicks.

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2008 ; 150(1) : 21-5.

**TACHIBANA T, SAITO S, TOMONAGA S, TAKAGI T, SAITO ES, TAKANISHI T, *et al.***

Effect of central administration of prolactin-releasing peptide on feeding in chicks.

Physiol Behav 2004 ; 80(5) : 713-9.

**TACHIBANA T, SATO M, TAKAHASHI H, UKENA K, TSUTSUI K, FURUSE M.**

Gonadotropin-inhibitory hormone stimulates feeding behaviour in chicks.

Brain Res 2005 ; 1050(1-2) : 94-100.

**TENA-SEMPERE M.**

GPR54 and kisspeptin in reproduction.

Hum Reprod Update 2006a ; 12(5) : 631-9.

**TENA-SEMPERE M.**

KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility.

Neuroendocrinol 2006b ; 83(5-6) : 275-81.

**TERAO Y, KUMANO S, TAKATSU Y, HATTORI M, NISHIMURA A, OHTAKI T, *et al.***

Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta.

Biochem Biophys Acta 2004 ; 1678(2-3) : 102-10.

**THOMPSON RH, CANTERAS NS, SWANSON LW.**

Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat.

J Comp Neurol 1996 ; 376 (1) :143-73.

**THOMPSON RH, SWANSON LW.**

Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network.

Brain Res Rev 2003 ; 41(2-3) : 153-202.

**TOUZANI K, TRAMU G, NAHON JL, VELLELY L.**

Hypothalamic melanin-concentrating hormone and alpha-neoendorphin-immunoreactive neurons project to the medial part of the rat parabrachial area.

Neuroscience 1993 ; 53(3) : 865-76.

**TSUTSUI K, BENTLEY GE, UBUKA T, SAIGOH E, YIN H, OSUGI T, *et al.***

The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH).

Gen Comp Endocrinol 2007 ; 153(1-3) : 365-70.

**TSUTSUI K, SAIGOH E, UKENA K, TERANISHI H, FUJISAWA Y, KIKUCHI M, *et al.***

A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release.

Biochem Biophys Res Commun 2000 ; 275(2) : 661-7.

**UBUKA T, BENTLEY GE, UKENA K, WINGFIELD JC, TSUTSUI K.**

Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain.

Proc Natl Acad Sci USA 2005 ; 102(8) : 3052-7.

**UBUKA T, KIM S, HUANG YC, REID J, JIANG J, OSUGI T, *et al.***

Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain.

Endocrinology 2008a ; 149(1) : 268-78.

**UBUKA T, MCGUIRE NL, CALISI RM, PERFITO N, BENTLEY GE.**

The control of reproductive physiology and behaviour by gonadotropin-inhibitory hormone.

Int Comp Biol 2008b ; 48(5) : 560-569.

**UBUKA T, UENO M, UKEN K, TSUTSUI K.**

Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the japanese quail (*coturnix japonica*) hypothalamo-hypophysial system.

J Endocrinol 2003 ; 178(2) : 311-8.

**UBUKA T, UKENA K, SHARP PJ, BENTLEY GE, TSUTSUI K.**

Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail.

Endocrinology 2006 ; 147(3) : 1187-94.

**UKENA K, TSUTSUI K.**

Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system.

Neurosci Lett 2001 ; 300(3) : 153-6.

**UKENA K, UBUKA T, TSUTSUI K.**

Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain.

Cell Tissue Res 2003 ; 312(1) : 73-9.

**UKENA K, IWAKOSHI E, MINAKATA H, TSUTSUI K.**

A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry.

FEBS Lett 2002 ; 512(1-3) : 255-8.

**VRANG N, LARSEN PJ, CLAUSEN JT, KRISTENSEN P.**

Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons.

J Neurosci 1999 ; 19(10) : RC5(1-8).

**WATSON SJ, AKIL H.**

The presence of two  $\alpha$ -MSH positive cell groups in rat hypothalamus

Eur J Pharmacol 1979 ; 58(1) : 101-3.

**WEBER E, EVANS CJ, SAMUELSSON SJ, BARCHAS JD.**

Novel peptide neuronal system in rat brain and pituitary.

Science 1981 ; 214(4526) : 1248-51.

**WEBSTER W, SHIMADA M, LANGMAN J.**

Effect of fluorodeoxyuridine, colcemid, and bromodeoxyuridine on developing neocortex of the mouse.

Am J Anat 1973 ; 137(1) : 67-85.

**YAMADA S, UENOYAMA Y, KINOSHITA M, IWATA K, TAKASE K, MATSUI H, *et al.***

Inhibition of metastin (kisspeptin)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats.

Endocrinology 2007 ; 148(5) : 2226-32.

**YANG HY, FRATTA W, MAJANE EA, COSTA E.**

Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine.

Proc Natl Acad Sci USA 1985a ; 82(22) : 7757-61.

**YANG HY, TANG J, IADAROLA M, PANULA P, COSTA E.**

Are Phe-Met-Arg-Phe NH<sub>2</sub> immunoreactive peptides endocoids modulating opiate antinociception?

Prog Clin Biol Res 1985b ; 192 : 313-22.

**YANO T, IJIMA N, HINUMA S, TANAKA M, IBATA Y.**

Developmental expression of RFamide-related peptides in the rat central nervous system.

Brain Res Dev Brain Res 2004 ; 152(2) : 109-20.

**YANO T, IJIMA N, KAKIHARA K, HINUMA S, TANAKA M, IBATA Y.**

Localization and neuronal response of RFamide-related peptides in the rat central nervous system.

Brain Res 2003 ; 982(2) : 156-67.

**YOSHIDA H, HABATA Y, HOSOYA M, KAWAMATA Y, KITADA C, HINUMA S.**

Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors.

Biochim Biophys Acta 2003 ; 1593(2-3) : 151-7.

**ZAMIR N, SKOFITSCH G, JACOBOWITZ DM.**

Distribution of immunoreactive melanin-concentrating hormone in the central nervous system of the rat.

Brain Res 1986 ; 373(1-3) : 240-5.

**ZAMORANO PL, MAHESH VB, BRANN DW.**

Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview.

Neuroendocrinology 1996 ; 63(5) : 397-407.