

# Expression de la vasopressine et de l'ocytocine au niveau de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire en situation de stress osmotique

O. Benmessaoud-Mesbah<sup>a\*</sup> (Dr), R. Benabdesselam<sup>a</sup> (Dr), H. Hardin-Pouzet<sup>b</sup> (Pr), V. Messent<sup>b</sup> (Pr), L. Dorbani-Mamine<sup>a</sup> (Pr)

<sup>a</sup> Laboratoire de biologie et physiologie des organismes, faculté de sciences biologiques, université des sciences et des technologies Houari-Boumediène (USTHB), Alger, ALGÉRIE ; <sup>b</sup> Université Pierre et Marie Curie, UPMC-Paris VI, INSERM UMRS 952, CNRS UMR 7224, Physiopathologie des maladies du Système Nerveux Central, Paris, FRANCE

\* oubenmesbah1@yahoo.fr

## RÉSUMÉ N°P014

L'arginine-vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT) sont des neuropeptides centraux synthétisés dans les neurones magnocellulaires localisés principalement dans les noyaux supra-optiques (SON) et paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus. Leurs axones traversent l'éminence médiane (ME) et se terminent dans la neurohypophyse, permettant ainsi, la libération de ces neurohormones dans la circulation générale. L'AVP et l'OT jouent un rôle principal dans la régulation de la balance hydrominérale de l'organisme. Pour observer la réponse de ce système en situation de stress osmotique nous avons utilisé deux lots de souris, un lot témoin qui dispose d'eau et de nourriture standard *ad libitum* et un lot expérimental soumis à un stress osmotique par ingestion d'eau salée (*Na Cl* à 2%), *ad libitum*, pendant huit jours. Pour la recherche de l'expression de l'AVP et de l'OT, les cerveaux et les hypophyses de souris sont prélevés, congelés puis débités en coupes épaisses qui seront traitées par la technique d'immunofluorescence, selon la méthode de marquage indirecte. Les immunomarquages de ces deux neuropeptides montrent une surexpression, dans les deux subdivisions: hypothalamique (SON, PVN et ME) et le lobe nerveux de l'hypophyse, en condition de surcharge saline comparativement au témoin. Ainsi, on peut donc, conclure que ces subdivisions du système hypothalamo-neurohypophysaire seraient intrinsèquement sensibles au stress osmotique.

**Mots clés:** vasopressine, ocytocine, noyau supra-optique, noyau para-ventriculaire, neurohypophyse, osmorégulation, neurones magnocellulaires.

## ANIMAUX ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les animaux utilisés sont des souris de souche C57/BL6, de sexe mâle et âgées de huit semaines en moyenne. Elles sont maintenues dans des conditions de température et d'humidité constantes et alimentées *ad-libitum*. Elles sont réparties en deux lots :

-un lot contrôle (conditions normales) recevant de l'eau du robinet *ad-libitum*

-un lot expérimental, soumis à une stimulation osmotique par surcharge saline. Pour cela, les souris reçoivent pendant huit jours, comme seule boisson une solution de Na Cl à 2%,

Les sacrifices des animaux se déroulent le matin et respectent la législation française et européenne sur les conditions d'expérimentation animale (décret 87-848).

Les animaux préalablement anesthésiés au pentobarbital sodique (25mg/kg de poids corporel), sont perfusés avec une solution de lavage isotonique (Na Cl à 0,9%) par voie intracardiaque, à débit constant et régulier grâce à une pompe péristaltique. Cette première perfusion sert à évacuer le sang. Elle est suivie d'une perfusion à base de para formaldéhyde (PF) à 4% dans un tampon phosphate sodique (phosphate buffer sodique ; PBS 0,1M ; pH 7,4), comme fixateur pour l'immunofluorescence

## IMMUNOFLOUORESCENCE

Après cryoprotection dans du saccharose et congélation dans l'isopentane refroidi à -35°C dans de l'azote liquide les cerveaux et les hypophyses sont débités en coupes frontales de 20µm, à l'aide d'un cryomicrotome (cryostat, type Leica CM 300). Les coupes sont ensuite, récupérées sur des lames siliconées (superfrost) et conservées à -20°C. Elles sont incubées, toute une nuit avec une solution tampon (PBS 0,05M, pH 7,4, BSA 1%) contenant des anticorps primaires monoclonaux de souris ; anti-AVP et anti-OT dilués au 1/5000 et 1/2000 respectivement (Sigma, chemicon), à température ambiante. Le deuxième jour, les coupes sont rincées puis incubées dans un mélange contenant les anticorps secondaires ; anti-IgG de souris couplé à la fluorosceine isothiocyanate (FITC). Le FITC est excité par la lumière bleue et émet une fluorescence de couleur verte.

Après rinçage au PBS 0,05M, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans du Mowiol et conservées à 4°C, dans l'obscurité, afin de préserver la fluorescence. Les coupes sont alors observées au microscope confocal (à balayage laser) ou à fluorescence (Zeiss Axioscop 2 plus). Dans ce dernier cas, les images sont capturées avec une caméra (Zeiss AxioCam HRC digital camera and axiovision 4.1 software).

## RÉSULTATS

L'immunomarquage avec les anticorps de la vasopressine (anti-AVP) et de l'ocytocine (anti-OT), nous ont permis d'étudier la distribution topographique et cytoarchitecturale des deux populations de neurones magnocellulaires. En effet, l'immunoréactivité de ces deux anticorps est révélée à la fois, dans les corps cellulaires des NMC, situés dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) et dans les axones de ces neurones, qui parcourent l'éminence médiane et se terminent dans le lobe nerveux de l'hypophyse.

Ainsi, dans les NSO les neurones magnocellulaires à OT prédominent dans la région antérieure des NSO (figure 1A: A et C), alors que les neurones à AVP sont plus nombreux dans la région postérieure (figure 1A: B et D). Sur le plan cytoarchitectural, les neurones à OT sont localisés en général, sur la face ventrale des NSO, alors que les neurones à AVP sont plutôt disposés, sur la face dorsale. Après stimulation osmotique, l'expression du marquage de l'OT et de l'AVP sont plus intenses (figure 1A: E, F, G et H).

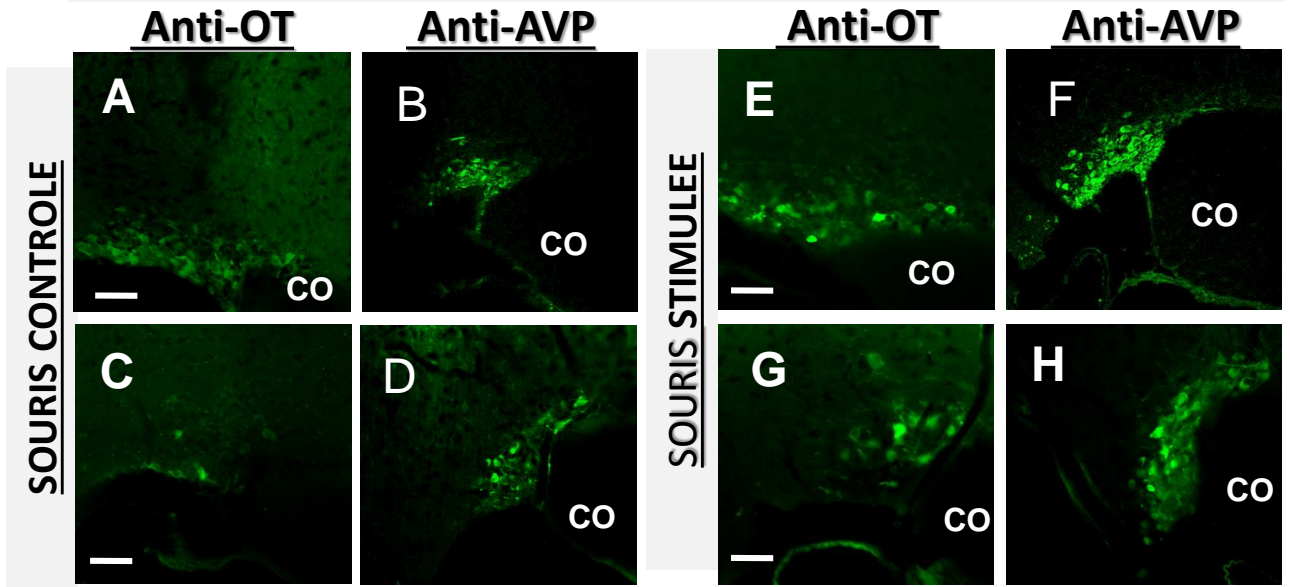
Au niveau des NPV l'immunomarquage de l'OT est plus intense dans la région médiane des NPV (figure 1B: A), alors que celui de l'AVP est plutôt localisé latéralement (figure 1B: B). Après une surcharge saline, les immunomarquages de l'OT et de l'AVP augmentent dans la région médiane et latérale des NPV, respectivement (figure 1B: C et D).

Dans l'éminence médiane (EM), située au niveau du plancher du troisième ventricule, l'expression de l'OT et de l'AVP sont bien visibles dans la couche interne de l'EM. Dans cette région l'immunomarquage de l'OT est diffus, alors que celui de l'AVP est beaucoup plus dense (figure 2A et B). Après stimulation osmotique, les immunomarquages de l'OT et surtout de l'AVP diminuent (figure 2A: C et D).

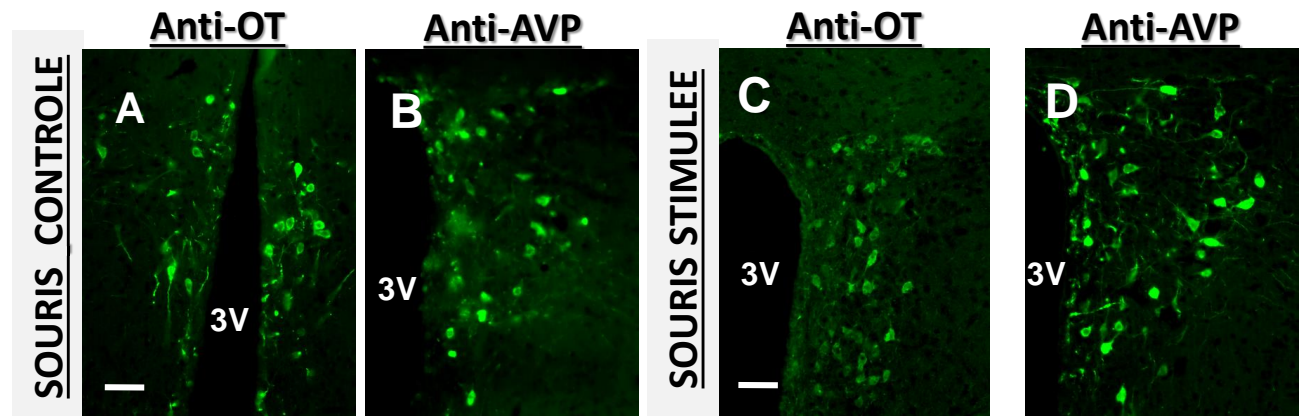
Dans le lobe nerveux, seul région immunoréactive de l'hypophyse, l'expression de l'AVP et de l'OT permet de localiser les projections des axones des neurones magnocellulaires, en provenance des noyaux hypothalamiques (NSO et NPV). Ainsi, pour l'OT le marquage apparaît localisé surtout à la périphérie alors que celui de l'AVP est central et beaucoup plus intense (figure 2B: A et B). Après stimulation osmotique, une surexpression de l'OT et de l'AVP est visible à la périphérie et au centre du lobe nerveux de l'hypophyse, respectivement (figure 2B: C et D).

**FIGURE1: EXPRESSION DE L'AVP ET DE L'OT DANS LES NOYAUX HYPOTHALAMIQUES**

**A- NOYAUX SUPRAOPTIQUES**

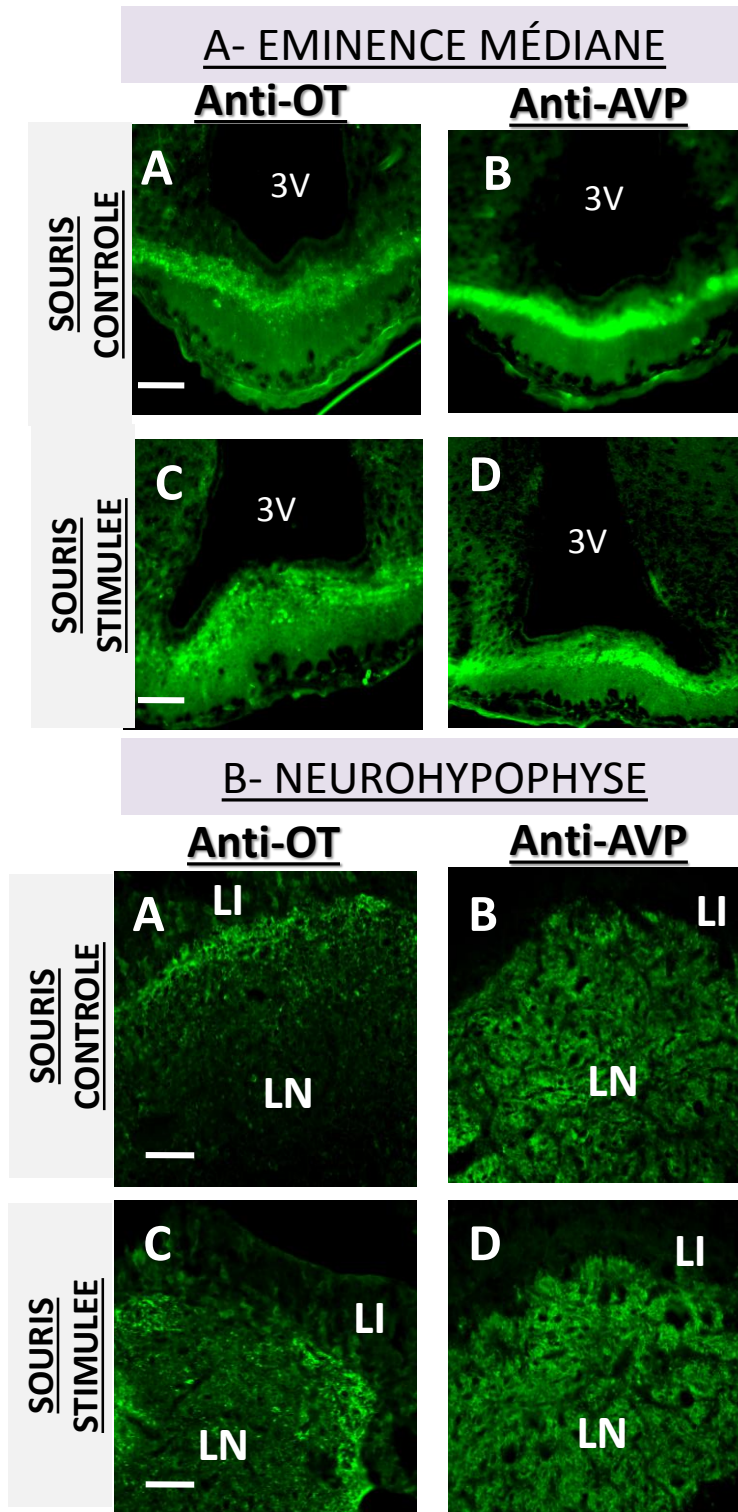


**B- NOYAUX PARAVENTRICULAIRES**



*Abréviations: CO: chiasma optique, 3V: troisième ventricule*

**FIGURE 2: EXPRESSION DE L'AVP ET L'OT DANS L'EMINENCE MÉDIANE ET DANS LA NEUROHYPOPHYSE**



*Abréviations: LN: lobe nerveux, LI: lobe intermédiaire*

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans le présent travail nous avons comparé l'expression de l'AVP et de l'OT dans les noyaux hypothalamiques (NSO et NPV) et dans la neurohypophyse (éminence médiane et lobe nerveux hypophysaire), chez la souris euhydratée et la souris stimulée osmotiquement par une surcharge saline.

Les résultats ont montré une forte prédominance dans la distribution des neurones vasopressinergiques par rapport aux neurones ocytocinergiques dans les NSO. Des résultats similaires sur la distribution de ces deux populations de neurones magnocellulaires, ont été rapportés, chez la même souche de souris (C57/BL) (Sharif-Naeimi *et al.*, 2008). Ces résultats confortent la forte prédominance des neurones à AVP, qui représentent 77% chez cette espèce contre seulement 69% chez le rat wistar (Swaab *et al.*, 1975). L'expression de l'AVP et de l'OT montre une augmentation chez la souris en surcharge de sel, comparativement au témoin. Elle est toute fois plus importante pour l'AVP. Des résultats similaires sur l'expression de ces neuropeptides dans ce système ont été rapportés chez la souris Balb/c, dans les mêmes conditions expérimentales. De plus, la quantification de l'expression de l'AVP augmente significativement après stimulation osmotique ainsi que son taux d'ARNm détecté par hybridation in-situ (Benabdesselam *et al.*, 2010).

Dans les NPV la subdivision des neurones magnocellulaires révèle la prédominance des neurones à AVP dans la région latérale et celle des neurones à OT dans la région médiane. Après stimulation osmotique l'expression de l'AVP et de l'OT augmentent qualitativement dans ces régions.

Dans le lobe nerveux de l'hypophyse, nous avons localisé la prédominance de l'expression de l'AVP dans la région centrale, alors que l'expression de l'OT est plutôt concentrée à la périphérie. Cette distribution a été précédemment décrite chez la souris (Castel and Hochman, 1976; Zhang *et al.*, 2002) et le rat (Van Leeuwen and Swaab, 1977; Van Leeuwen *et al.*, 1979). Après stimulation saline nous avons observé une augmentation de l'expression de l'AVP dans la majeure partie du lobe nerveux de l'hypophyse alors que celle de l'OT est plutôt localisée à la périphérie.

Au niveau de l'éminence médiane, on remarque une diminution du marquage, en particulier pour l'AVP, après stimulation osmotique qui pourrait traduire une mobilisation des hormones en stock et leur sécrétion dans le lobe nerveux de l'hypophyse.

**En conclusion**, le système hypothalamo-neurohypophysaire montre une adaptation physiologique et une sensibilité aux variations de l'osmolarité qui se manifestent dans les subdivisions hypothalamique et neurohypophysaire. En effet, la synthèse et la sécrétion de l'AVP et de l'OT sont principalement contrôlées par l'osmolarité, ainsi que par le volume plasmatique (Robertson, 1995 ; Robertson and Berl, 1996 ; Kakiya *et al.*, 2000).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benabdesselam, R., Sene A., Raison, D., Benmessaoud-Mesbah, O., Ayad, G., Mornet, D., Dorbani-Mamine L., Hardin-Pouzet, H. (2010): A deficit of brain dystrophin impairs hypothalamic osmostat. *Journal of neuroscience research*, 88, 324-334
- Castel, M. et Hochman, J. (1976): Ultrastructural immunohistochemical localization of vasopressin in the hypothalamic-neurohypophysial system of three murids. *Cell and tissue research*, 174, 69-81
- Kakiya, S., Arima, H., Yokoi, H., Murase, T., Yambe, Y. *Et Oiso, Y.* (2000): Effects of acute hypotensive stimuli on arginine gene transcription in the rat hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279, E886-892
- Robertson, G. I. (1995): Posterior pituitary Endocrinology and metabolism, 385-432
- Robertson, G. L., and Berl, T. (1996): Pathophysiology of water metabolism. In: the kidney: disturbances in control of body fluid volume and composition, 873-928
- Sharif-Naeimi, W., Ciura S., Stachniak, T.J., Trudel, E. and Bourque, C.W. (2008): Neurophysiology of supra-optic neurons in C57/BL mice studied in three acute in vitro preparations. *Prog Brain Res*, 170, 6079-61236.
- Swaab, D.R., Nijveldt, F., and Pool, L.W. (1975): Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J Endocrinol*, 67, 461-462
- Van Leeuwen, F. W., and Swaab, D.F. (1977): Specific immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin and oxytocin in the neurohypophysis of the rat. *Cell Tissue Research*, 177, 493-501
- Van Leeuwen, F.W., de Raay, C., Swaab, D.F., and Fisser, B. (1979): The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone in the rat neurohypophysis. *Cell and Tissue Research*, 202, 189-201
- Zhang, B.J., Kusano, K., Zerfas, P., Iacangelo, A., Young, W.S. and Gainer, H. (2002): Targeting of green fluorescent protein to secretory granules in oxytocin magnocellular neurons and its secretion from neurohypophysial nerve terminals in transgenic mice. *Endocrinology*, 143, 1036-1046