

CO-DISTRIBUTION DES DYSTROPHINES ET DE LA CAVÉOLINE-1 AU NIVEAU DE L'AXE HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAIRE DU RAT

DJAZOULI-ALIM Fatma
Zohra^{1,2} et DORBANI-
MAMINE L³

1. Département de Biologie
des populations et des
Organismes, Faculté des
Sciences de la Nature et de
la Vie, Université de Blida
1, B.P. 270, route de
Soumaa Blida, Algérie.
Email :
zahralim@yahoo.com

2. Laboratoire d'Éco-
Biologie Animale (L.E.B.A.);
École Normale Supérieure
de Kouba Bachir El
Ibrahimi, B.P. 92, Alger
6050, Algérie

3. Université Houari
Boumediene (USTHB),
Faculté des Sciences
Biologiques (FSB),
laboratoire de Biologie des
Populations et des
Organismes (LBPO), BP 32
El Alia 16111, Bab Ezzouar
16111, Algérie

Reçu le 17 mai 2015,
accepté le 22 juillet 2015

Résumé

Dans le but de comprendre le rôle de certaines molécules du cytosquelette sub-cortical comme la dystrophine et leur interaction avec les protéines membranaires, dans le processus de sécrétion des neuropeptides, nous avons essayé dans cette étude, de rechercher une possible liaison de la cavéoline-1 et les dystrophines dans le système hypothalamo-neurohypophysaire du rat. Les résultats immunohistochimiques que nous avons obtenus indiquent que la dystrophine est retrouvée au niveau des zones perimembranaires des corps cellulaires des neurones magnocellulaires et au niveau des zones perivasculaires aussi bien dans les noyaux supraoptiques que les noyaux paraventriculaires et le lobe nerveux de l'hypophyse. La cavéoline-1, elle présente la même distribution que cette dernière sauf que dans les corps cellulaires des neurones magnocellulaires, le marquage est d'aspect granuleux et s'étend de la partie membranaire à la partie nucléaire. Dans les fractions hypophysaires, les résultats du western-blot montrent la présence de bandes protéiques révélées par le DYS2 de 427, de 116 et de 71 kDa. De plus, une bande de 22 KDa est révélée par l'anti-CAV-1. Les résultats par ligand-blotting indiquent l'existence d'une liaison entre les dystrophines et de la cavéoline-1 dans le LN, ceci par la détection de la cavéoline-1 dans des bandes protéiques qui semblent être des dystrophines de hauts et de faibles poids moléculaires. Il est suggéré que les dystrophines pourrait avoir une relation structural et fonctionnelle avec et la cavéoline-1 dans le système hypothalamo-neurohypophysaire.

Mots clés: Cavéoline-1, Dystrophine, Neurosécrétion, Rat, Système Hypothalamo-neurohypophysaire

INTRODUCTION

Le système hypothalamo-neurohypophysaire (SHN) est un système neurosécrétoire, constitué essentiellement de neurones magnocellulaires (NMC), les corps cellulaires de ces neurones sont regroupés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires hypothalamiques et la majorité de leurs axones se termine près de la lame basale des capillaires fenêtrés du lobe

nerveux (LN) de l'hypophyse. Les deux neuropeptides l'ocytocine (OT) et la vasopressine (VP) sont synthétisées au niveau des corps cellulaires des NMC et stockés ou libérés dans la circulation générale à partir du LN. Les taux de la synthèse et de la libération de ces peptides sont en fonction du statut physiologique (parturition ou lactation) et l'état d'hydratation (balance hydrique) de l'animale.

L'organisation anatomique du SHN et sa fonction neurosécrétoire qui peut être reproduite expérimentalement sous différents stimuli, a fait de ce système un modèle de choix pour l'étude de ce processus complexe. Dans cette étude nous avons essayé de rechercher une possible liaison de la cavéoline-1 avec les dystrophines dans le SHN du rat, afin de déduire une possible implication fonctionnelle dans la neurosécrétion des neuropeptides de cet axe. La libération du produit de sécrétion ainsi que la récupération membranaire sont en grande relation avec la membrane plasmique et le cytosquelette de la cellule sécrétrice. Spécifiquement, le cytosquelette sub-cortical ou membranaire intervient dans la liaison des filaments d'actine à la membrane plasmique. Parmi les molécules qui lient l'actine, on retrouve la fodrine dans les cellules nerveuses et neuroendocrines. Dans les autres systèmes on retrouve la spectrine dans le globule rouge, la dystrophine et l'utrophine dans les cellules musculaires striées [1]. Dans le cas de la dystrophine, cette protéine se lie avec une variété de protéines membranaires et sub-membranaires, formant un complexe appelé le complexe protéique associé à la dystrophine DAPC (Dystrophin-Associated-Protein-Complex). Ce complexe ainsi que certains aspects de sa physiologie sont établis dans la cellule musculaire, il semble qu'il est impliqué dans la liaison des milieux intra et extracellulaires notamment dans l'ancrage du cytosquelette à la matrice extracellulaire. Par ailleurs, ce complexe intervient dans le processus de la signalisation cellulaire [2, 3]. Durant ces dernières années, la dystrophine

ainsi que certains éléments du complexe qui lui sont associés, ont été rapportés dans les différents types cellulaires du système nerveux central [4] et dans le système hypothalamo-neurohypophysaire [5]. Parmi les composants du complexe associé à la dystrophine, il a été mentionné la présence de cavéoline. Cette dernière est une protéine de 21-24 kDa, qui s'attache à des domaines spécialisés de la membrane plasmique. Elle crée à ce niveau, des invaginations en forme de cavités appelées cavéolae. Ces vésicules très tôt décrites sont indépendantes de la clathrine [6]. La cavéoline constitue le composant protéique structural principal des cavéolae [7]. Elles sont très abondantes dans les cellules musculaires striées et lisses, les adipocytes, les pneumocytes, les cellules endothéliales [6, 8] et ont été mises en évidence dans le cerveau [9]. Les cavéolae sont impliquées dans la compartimentalisation des lipides et des protéines qui participent dans les événements de la signalisation transmembranaire [10], dans le transport du cholestérol [11] et du matériel de biosynthèse (endocytose, transcytose, pinocytose, internalisation et recyclage membranaire) [9]. La localisation intracellulaire des cavéolines et des dystrophines par rapport à la membrane plasmique et les rôles biologiques qu'elles peuvent apporter dans les différentes cellules, nous a poussés à rechercher une possible co-distribution de ces deux protéines, et une probable relation fonctionnelle liée au mécanisme de neuro-sécrétion dans le système hypothalamo-neurohypophysaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des rats mâles adultes (200-290 g), recevant des aliments secs et de l'eau ad libitum sont anesthésiés à l'uréthane à travers la voie intrapéritonéale. Lorsque les animaux rentrent en narcose, avant qu'ils perdent leur activité autonome et dans le but de réaliser une fixation momentanée des tissus recherchés (hypothalamus et lobes nerveux), ils sont perfusés à travers l'aorte ascendante par le tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4 suivi par 250 ml de paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,4.

1. Etude immunohistochimique

Des coupes au vibratome de 50 µm sont traitées par une succession d'étapes d'incubations et de lavages sous agitation douce et à une température de 20 à 25°C. Les coupes sont perméabilisées par une incubation dans une solution de Triton X-100 à 0,5 % dans du tampon PBS. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par l'incubation des coupes dans l'hydrogène peroxyde (0,3%/TP PBS). Les liaisons aspécifiques sont bloquées par le sérum de cheval (5%/PBS). Après ces pré-traitements, les tissus sont incubés avec l'anticorps primaire anti-dystrophine (DYS2), dilué à 1/20 dans le PBS pendant 15 heures (ou une nuit) à +4°C. L'étape de révélation débute par l'incubation des coupes pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire anti-souris biotinylé, dilué dans le PBS.

Par la suite, l'incubation se déroule dans une solution streptavidine peroxydase pendant 1 heure.

Le chromogène utilisé pour révéler la peroxydase est soit le diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB) (DAKO® LIQUID DAB+) qui donne une coloration marron, soit le 3-amine 9-éthyle carbazole (AEC) (DAKO® AEC+ substrate-chromogen) qui donne une coloration rouge brique. Le temps d'incubation du chromogène est de 10-30 min à l'obscurité. La réaction est bloquée par des lavages à l'eau distillée. Le même procédé est suivi pour la mise en évidence de la cavéoline, excepté que la cavéoline a nécessité un prétraitement avec la protéinase (DAKO® Ready-to-Use PROTEINASE K) dans le but d'un démasquage des sites antigéniques. L'anticorps anti-cavéoline est polyclonal, il est dilué à 1/100/PBS. La révélation consiste en une incubation pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire anti-lapin.

2. Etude biochimique

Les lobes nerveux sont prélevés par microdissection après décapitation des rats. L'homogénéisation des LN est effectuée dans du tampon MOPS 20 mM- 150mM NaCl- 0.1mM EDTA, pH6.8 à +4°C avec un mélange d'inhibiteur de protéase (IP) à 1% final. Trois fractions différentes sont isolées à partir du lobe nerveux selon la méthode décrite par Nordmann *et al* [12]. Le culot (P₁) obtenu est récupéré dans 100 µl de tampon MOPS/IP et représente la fraction riche en pituicytes. Le surnageant est remis à centrifuger pour obtenir un culot (P₂) qui est resuspendue dans 100 µl de tampon MOPS/IP et un deuxième surnageant (S). Le S représente la fraction riche en granules de sécrétions et le P₂ représente la fraction enrichie en

neurosecretosomes. Les protéines de chaque fraction sont dosées selon la méthode de Bradford [13] en utilisant de la BSA comme standard à raison de 0.25%. Les protéines des fractions sont par la suite diluées à concentration finale de 1µg/µl avec du tampon de dénaturation de Laemmli [14] composé de Tris-HCl, pH 6.8, Dodecyl Sulfate de Sodium, Glycérol, Bleu de bromophenol. Les échantillons sont chauffés au bain -Marie à 100°C. Le -mércaptoethanol est rajouté après refroidissement.

3. Western-blotting

Pour la séparation des protéines par électrophorèse mono dimensionnelle sur gèle de polyacrylamide -SDS, deux gels différents sont préparés selon la méthode de Laemmli [14]. Après séparation, les protéines sont électro-transférées sur membrane de nitrocellulose. Le transfert se déroule à température ambiante dans un tampon de migration composé de Tris base, glycine, SDS, méthanol PH, 8.3, sous une intensité de 100 mA pendant 1 heure et demi (générateur: Scientifique compagny, USA). La détection immunologique des protéines sur les membranes de transfert est réalisée après blocage pendant 1 heure à température ambiante des sites aspécifiques avec une solution de PBS-T (phosphate buffered saline-tween) contenant de BSA (p/v)/lait écrémé (p/v). Les membranes sont ensuite lavées et incubées pendant 15 heures à 4°C avec les anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines à détecter. La révélation est réalisée par l'utilisation du kit DAKO LSAB®+, peroxydase. Un second anticorps biotinylé dilué avec le

tampon PBS-T est incubé avec la membrane pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C. L'anticorps secondaire doit être produit chez le lapin s'il s'agit d'un anticorps primaire polyclonal ou produit chez la souris s'il s'agit d'un anticorps primaire monoclonal. Des lavages sont nécessaires avant l'incubation de la membrane pendant 1 heure entre 20 à 25°C avec une solution streptavidine -peroxydase-PBS-T. Elles sont incubées à l'obscurité avec la solution DAB de 10 à 30 min. La réaction est stoppée par lavage des membranes à l'eau distillée.

4. Ligand Blotting

Cette technique et dans le but de rechercher une liaison structurale pouvant exister entre la cavéoline-1 et la dystrophine, comme il est mentionné plus haut, les protéines des trois fractions (P₁, P₂, S) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS puis électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après coloration au rouge ponceau suivie d'une décoloration totale, la membrane est incubée 15 heures à 4°C sous agitation dans une solution 3% lait écrémé (p/v) / BSA 1% (p/v), dans du tampon PBS-T. La membrane est équilibrée pendant 10 min dans le tampon d'overlay composé de l' Hepes pH: 7.0, EDTA, EGTA, glycérol, Na₃, MgSO₄, Tween-20 et la BSA, puis incubée 15 heures à +4°C sous agitation avec les cavéolines dans le tampon overlay. Elle est par la suite mise à sécher à température ambiante. Puis réhydratée avec le tampon PBS-T et incubée avec l'anticorps anti-CAV₁ dilué à 1/5000 pendant 15 heures sous agitation à +4°C.

L'interaction est mise en évidence par la révélation de la cavéoline grâce au kit DAKO LSAB®+, peroxydase. Un second anticorps anti-lapin biotinylé dilué avec le tampon PBS-T est incubé avec la membrane pendant 1 heure à une température de 20 à 25°C. Cette étape est suivie par l'incubation de la membrane avec une solution streptavidine–peroxydase-PBS-T à 20 à 25°C pendant 1 heure. La membrane est incubée à l'obscurité avec la solution DAB.

RÉSULTATS

1. Immunomarquages de la dystrophine et de la cavéoline-1 au niveau des noyaux supraoptiques (NSO)

La figure 1 présente le marquage des deux antigènes cités en haut, Pour la dystrophine, le substrat utilisé pour la révélation du second anticorps combiné à la peroxydase est le 3-amine 9-éthyle carbazole (AEC), ce dernier donne une coloration rouge en présence de la peroxydase. Pour la cavéoline-1, le substrat utilisé pour la révélation du second anticorps combiné à la peroxydase; est le diaminobenzidine

tetrachloride (DAB) qui donne une coloration marron en sa présence.

1.1. Immunomarquage de la dystrophine (Dp)

Une immuno-réaction positive est observé au niveau du NSO dans les neurones magnocellulaires (NMC) et au niveau de la limitante gliale ventrale (LGV) (Figure 1.1). Les NMG sont marqués au niveau des régions périmembranaires sous jacente à la membranaire plasmique de façon discontinu (Figure 1.2). De plus, des structures qui semblent être des coupes transversales de vaisseaux sanguins sont immunopositives (Figure 1.2).

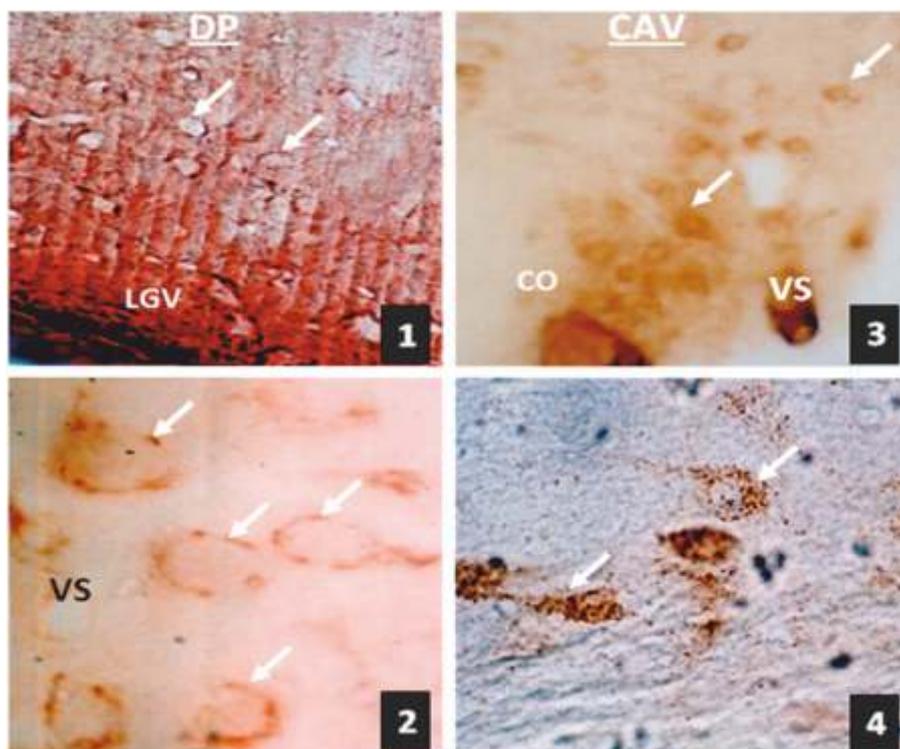


Figure 1 : Immunomarquage de la dystrophine (DP) et de la cavéoline-1 (CAV) du noyau supraoptique

(1, 2). Localisation par immuno-peroxydase/AEC de la dystrophine. Noter en (1) le marquage des neurones par le Dys_2 (flèches) qui est peri-membranaire et discontinu en 2 (flèches); 1 (x100), 2 (x1000).

(3, 4). Localisation par immuno-peroxydase/DAB de la cavéoline. Noter le marquage des neurones par l'anticorps anti-cav1 (flèches) qui est granulaire à localisation cytoplasmique en (4) immuno-

marqués (flèches), les vaisseaux sont également marqués en (1); 3(x100), 4(x400). CO: Chiasma Optique; VS: Vaisseau Sanguin; LGV: Limitante Gliale Ventrale.

1.2. Immunomarquage de la cavéoline (CAV)

Un amas de neurones magnocellulaires du NSO, situés sur le côté du chiasma optique sont immunomarqués. Leurs axones quittant le noyau dans sa partie dorso-médiane et longeant le chiasma optique, sont aussi tracés par l'anti-cav1 sous forme de structures filamenteuses; le marquage est également présent aux parois des vaisseaux (Figure 1.3). Au plus fort grossissement, les NMC présentent un marquage cytoplasmique, ayant un aspect granulaire (Figure 1.4) qui s'étend de la partie périnucléaire à la région périphérique du corps cellulaire, certaines granulations sont plus denses que d'autres. Cet aspect ponctué s'étend aux prolongements cytoplasmiques de ces neurones.

1. Immunomarquages des dystrophines et de la cavéoline-1 au niveau des noyaux paraventriculaires (NPV)

La figure 2 présente le marquage de la dystrophine par le Dys₂ / peroxydase/AEC et la cavéoline-1 par l'anti-cav1/ peroxydase/DAB.

2.1. Immunomarquage de la dystrophine

Une immunoréaction positive est observée pour la dystrophine par la présentation de structures arrondies tracées en rouge brique par l'AEC et qui sont bien limitées au NPV, la paroi du troisième ventricule constituée de cellules épendymaires, réagit fortement à l'anticorps dirigé contre la dystrophine (Fig. 2.1). Ces structures représentent en fort grossissement les NMC (Figure 2.2), ils prennent le marquage dans les régions perimembranaires. Au

fort grossissement, le marquage apparaît sous-jacent à la membrane plasmique avec quelquefois une discontinuité de son intensité. Des structures filamenteuses abutant les parois vasculaires sont également immunomarquées (Figure 2.3).

2.2. Immunomarquage de la cavéoline

Une immunoréaction positive est observée par la répartition du chromogène sur toute la surface du noyau paraventriculaire avec une plus grande intensité dans sa région latérale qui semble être riche en NMC (Figure 2.4). Au fort grossissement, Il est remarqué que

l'intensité de ce marquage est plus importante au niveau cytoplasmique qu'au niveau membranaire. Les vaisseaux sanguins portent un immunomarquage positif au niveau de leurs parois (Figure 2.5). Ce marquage pourrait être localisé soit au niveau des membranes des cellules gliales (astrocytes) qui forment généralement des manchons autour des capillaires soit au niveau des cellules endothéliales. Au plus fort grossissement le marquage occupe toute la surface cytoplasmique et présente un aspect granuleux hétérogène (Figure 2.6).

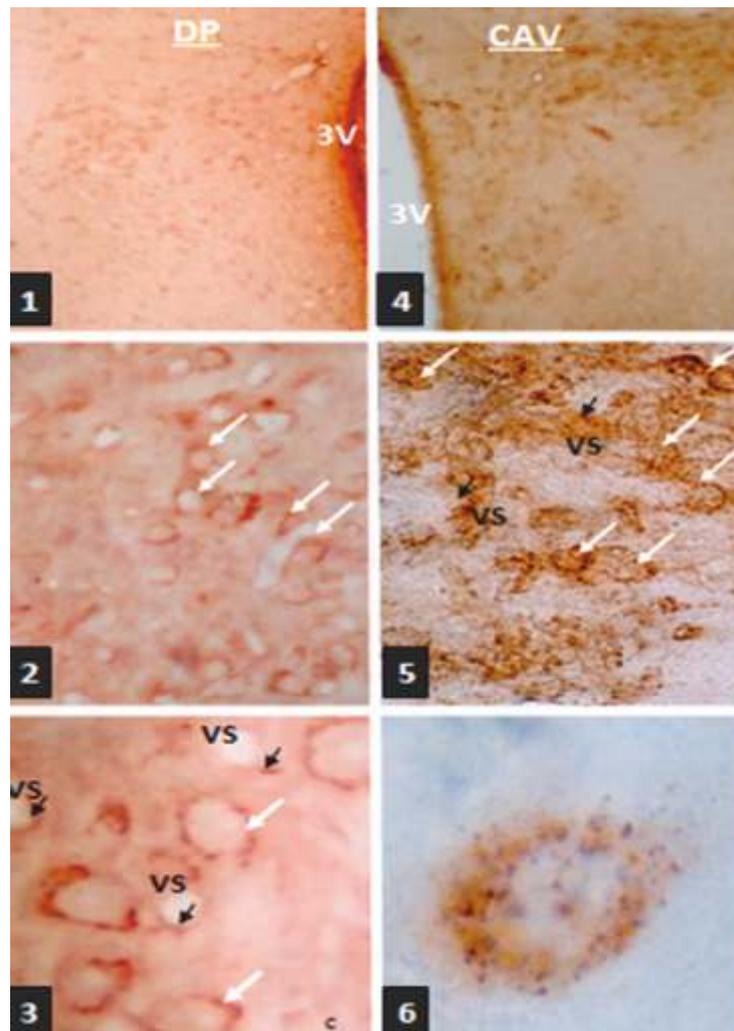


Figure 2 : Immunomarquages de la dystrophine (Dp) et de la cavéoline-1 (CAV) au niveau du noyau paraventriculaire

(1, 2, 3). Localisation par immunoperoxydase/AEC de la dystrophine. Noter en (1) le marquage des neurones par le Dys_2 , qui est peri-membranaire (flèches) en (2). Au fort grossissement il semble prendre un aspect discontinu (flèches) en (3), noter la présence de marquage perivasculaires filamenteux. 1 (x100), 2 (x200), 3 (x1000). (4, 5, 6). Localisation par immunoperoxydase/ DAB de la cavéoline. Noter le marquage par l'anticorps anti-cav1 dans le NPV en (4), il est retrouvé dans les NMC (flèches) et également sur les parois vasculaires (5). Au fort grossissement, il semble avoir un aspect granulaire à localisation cytoplasmique (6). (4) (x100), (5) (x200), (6) (x1000). 3V : Troisième Ventricule. N: Noyau. VS : Vaisseau Sanguin.

3. Immunomarquages de la dystrophine et de la cavéoline-1 au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse (LN)

La figure 3 présente le marquage de la dystrophine par le Dys_2 /peroxydase/DAB et la cavéoline-1 par l'anti-cav1/peroxydase/DAB.

3.1. Immunomarquage de la dystrophine

Une immuno-réaction positive au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse (Figure 3.1 et 2). Il est observé que l'antigène se répartit

aussi bien à proximité des vaisseaux que dans le reste du lobe. Au plus fort grossissement (Figure 3.3), le marquage s'observe de façon importante dans la région périvasculaire. A ce niveau, malgré que l'observation au microscope photonique ne permette pas de distinguer le détail de la localisation du marquage, il semble que ce soit les pieds de pituicytes périvasculaires qui soient porteurs de cette immunoréaction.

3.2. Immunomarquage de la cavéoline-1

Le marquage de la cav-1 dans le LN

est plus important et plus significatif par rapport aux deux autres lobes (intermédiaire et antérieur) (Figure 3.4). Au fort grossissement le marquage s'observe presque exclusivement aux régions périvasculaires (Figure 3.4). En effet, des structures représentant des coupes sagittales de vaisseaux sanguins sont fortement marquées en périphérie (Figure 3.4). Les vaisseaux sanguins sont fortement marqués, le marquage semble suivre le trajet des prolongements des pituicytes.

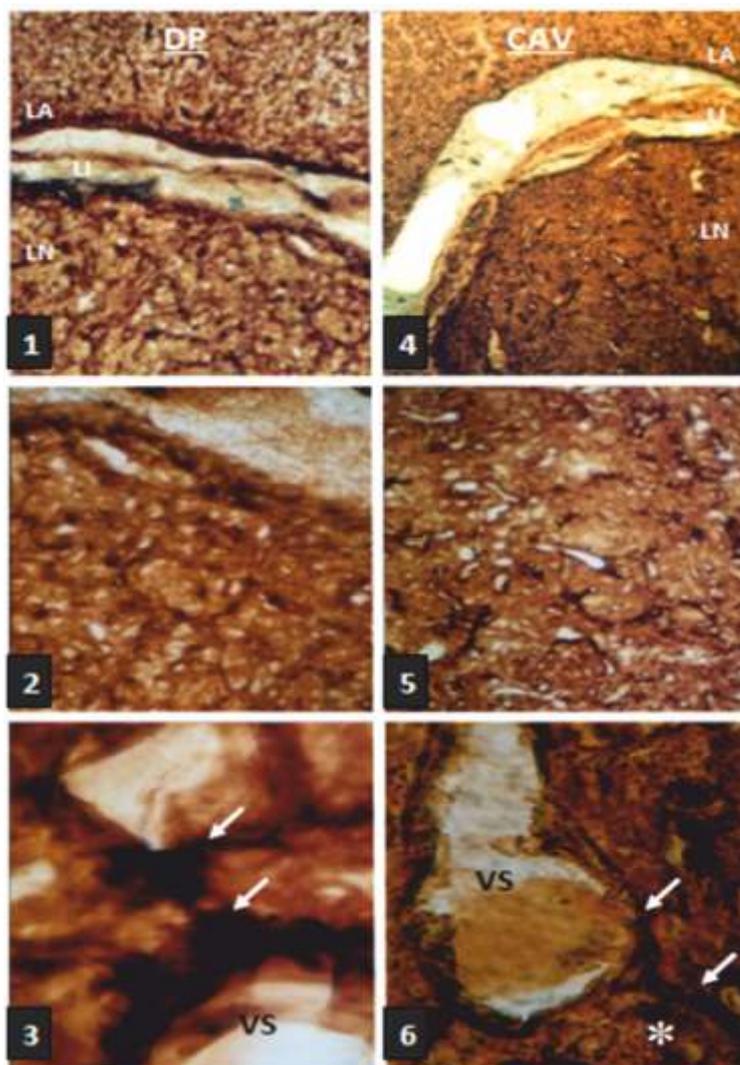


Figure 3 : Immunomarquage de la dystrophine (DP) et de la cavéoline-1 au niveau du lobe nerveux de l'hypophyse

(1, 2, 3). Localisation par immunoperoxydase/DAB de la dystrophine. Noter en (1 et 2) la présence du marquage dans tout le parenchyme. Au fort grossissement (3) l'immuno-réaction est intense à la région périvasculaire (flèches). 1 (x100), 2 (x200), 3(x1000). (4, 5, 6). Localisation par immunoperoxydase/ DAB de la cavéoline-1. Noter le marquage par l'anticorps anti-cav1 dans le lobe le LN en (4), il est retrouvé de manière intense à la périphérie es vaisseaux (5). Au fort grossissement, il semble prendre une localisation gliale (asterisk) et traces es structures d'aspect filamenteux. 4 (x100), 5 (x200), 6(x1000). LA: Lobe Antérieur; LI: Lobe Intermédiaire; LN: Lobe Nerveux; VS: Vaisseau Sanguin.

4. Immuno-détection de la dystrophine et de la cavéoline au niveau des fractions neurohypophysaires par western-blot

Après séparation des protéines des trois fractions P₁, P₂ et S par SDS-PAGE, elles sont électrotransférées sur membrane de nitrocellulose à partir du gel. La membrane est colorée au rouge ponceau puis découpée en trois bandes, chacune contient les fractions neurohypophysaires P₁, P₂ et S. Deux bandes membranaires sont incubées séparément, en présence de l'anticorps capable de reconnaître les dystrophines (DYS₂) et l'anticorps capable de reconnaître la cavéoline-1(anti-cav 1). La dernière bande a été réservée pour le ligand blotting.

Il semble que l'anticorps DYS₂ réagit positivement dans les trois fractions avec des protéines de

poids moléculaires différents (Figure 4, DP). La protéine immunopositive au DYS₂, supérieur à 250 kDa, est présente dans les trois fractions neurohypophysaires. Cette dystrophine pourrait correspondre à la Dp 427. La protéine qui se situe par rapport au marqueur de poids moléculaire (PM) entre 148 et 98 kDa dans les fractions P₁ et P₂, correspond à la dystrophine 116. La protéine présentant un PM inférieur à 80 kDa par rapport au marqueur de PM; dans la fraction S, pourrait probablement correspondre à la dystrophine 71 kDa. Par ailleurs, une autre membrane de nitrocellulose contenant les protéines séparées des trois fractions P₁, P₂ et S est incubée avec l'anticorps anti-cav1 (Figure 4, CAV). L'anticorps réagit positivement avec une protéine de 22 kDa dans les fractions P₁ et S. Il est fort probable qu'il s'agit de la cavéoline-1 car le PM de la cavéoline-1 est environ 22kDa. Aucune réaction positive de l'anticorps n'est observée dans la fraction P₂.

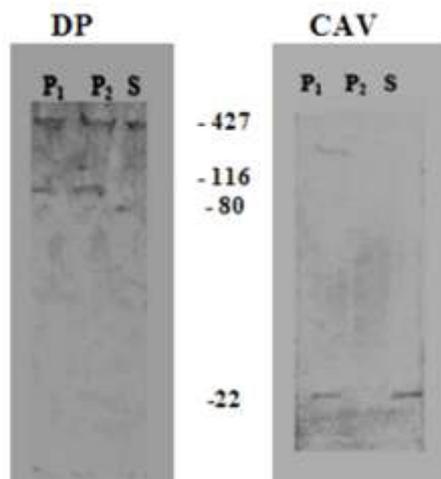


Figure 4 :Immunodétection des dystrophines et de la cavéoline-1 dans les fractions neurohypophysaires

5. Immuno-détection de l'interaction de la cavéoline-1

La figure 5 montre la membrane de nitrocellulose contenant les fractions neurohypophysaires, incubée dans un premier temps avec les cavéolaes (ligand). La fixation du ligand sur cette membrane est révélée par l'anticorps anti-cav1, dans un second temps. On remarque que l'anti-cav₁ réagit dans les trois fractions avec une protéine ayant un poids moléculaire supérieur à 250 kDa. Cela suggère que les cavéolaes se sont probablement liées des protéines de 427 kDa. L'anti-cav1 réagit aussi avec des protéines dont le poids moléculaire est situé au 116kDa. Nous rappelons que des protéines de même PM révélées par l'anti-cav1; ont été révélée par le DYS₂. Cela suggère que les cavéolaes se sont probablement liées à des protéines qui pourraient être la Dp427 et la Dp116.

La figure 6 présente un gel de 12% contenant deux fractions neurohypophysaires (P₁ et S). Le gel à 12% d'acrylamide ayant des mailles plus serrées que le 10%, permet de retenir les protéines de faible PM, l'inconvénient est que les protéines de haut PM ne peuvent pas pénétrer dans le gel de séparation. Il est remarqué qu'au niveau de P₁, l'anti-cav-1 révèle une liaison avec des protéines de différent PM, dont une de 45 kDa dans les trois fractions, une autre de 22 kDa dans la fraction P₁ et S et une autre de 16 pour les fractions P₁ et S.

Figure 5. Immunodétection de la cavéoline-1 par ligand blotting dans les fractions neurohypophysaires après électrotransfère d'un gel de 10 %

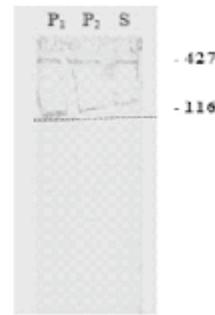
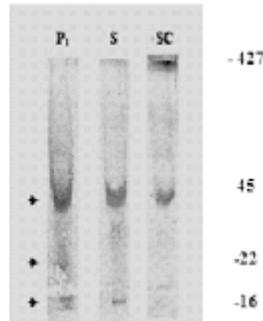


Figure 6. Immunodétection de la cavéoline-1 après un ligand blotting d'un gel électrotransfère de 12% de deux fractions P₁ et S d'un autre lot de rats (SC)



DISCUSSION

1. Distribution des dystrophines au niveau du système hypothalamo- neurohypophysaire

1.1. Au niveau du noyau supraoptique (NSO)

L'immunomarquage par le DYS₂, semble augmenter d'intensité vers la partie ventrale du noyau; endroit où est retrouvée la limitante gliale ventrale (LGV). La LGV est la zone du regroupement des expansions astrocytaires et des dendrites des neurones magnocellulaires.

Les dendrites des neurones magnocellulaires constituent les éléments post synaptiques des neurones afférents. En effet, des études morphologiques ont montré une localisation post synaptique des dystrophines dans le système nerveux central [15, 16]. Les astrocytes sont les cellules gliales prédominantes au niveau du NSO, leurs corps cellulaires se localisent au niveau de la LGV et leurs expansions se prolongent plus de 500 µm vers la partie dorsale du noyau et forment de fines

séparations entre les magnoneurones [17]. Il a été observé chez le rat déshydraté que ces expansions astrocytaires se rétractent et permettent l'apposition des magnoneurones. Cet aspect suggère une grande plasticité de ces cellules, dans laquelle il semble, que les dystrophines pourraient être impliquées dans leur arrangement spatial, en relation avec des composants moléculaires du cytosquelette.

Au niveau des corps cellulaires du NSO l'immunomarquage par le DYS₂, semble délimiter deux formes de pericaryons de neurones magnocellulaires, fusiforme et ronde. Ce marquage semble partager sa distribution entre la périphérie et la région sous-jacente à la membrane plasmique neuronale avec une intensité discontinue. Il est suggéré que la dystrophine au niveau des neurones post-synaptiques, attacheraient l'actine au complexe membranaire dystroglycane.

1.2. Au niveau du noyau para

ventriculaire (NPV)

L'immunomrquage par le DYS₂ se répartie sur des structures qui délimitent le noyau et s'accroissent au niveau de la paroi du troisième ventricule ou l'épendyme. Ce dernier est formé par les ependymocytes et les tanicytes. Les tanicytes lancent des prolongements basaux vers le tissu nerveux et autour des capillaires proches de cette zone. Les ependymocytes et les tanicytes sont pourvues dans leurs parties apicales par des cils et de microvillosités contribuant grâce à leurs battements à la circulation du liquide céphalorachidien dans les ventricules cérébraux et le canal épendymaire. Dans les corps cellulaires, le marquage au DYS₂ délimite la périphérie du corps cellulaire avec une discontinuité d'intensité. Ceci pourrait suggérer, comme pour le NSO que les dystrophines dans les régions où le marquage est plus intense, interviendraient dans l'établissement de contacts post synaptiques [18].

1.3. Au niveau du lobe nerveux (LN)

Dans la fraction des pituicytes (P1), nos résultats indiquent que l'immunoréaction des dystrophines a été observé au niveau des régions perivasculaires et dans des endroits isolés du parenchyme nerveux. A ce niveau de microscopie qui ne permet pas de distinguer les éléments du LN, il est probable que le marquage serait soit au niveau pituicytaire et/ou endothélial et/ou dans les terminaisons nerveuses. La plus grande population de cellules du LN, est celle des pituicytes. Ces cellules tendent à former un réseau spongieux à travers la totalité du lobe; Les espaces de ce réseau sont essentiellement occupés par les éléments nerveux tel que les parties distales des axones et les terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires ainsi que par les cellules endothéliales des capillaires fenêtrés [19]. Des études d'immunofluorescences sur le LN, par double marquage avec le DYS_2 et l'anticorps l'anti- GFAP (marqueurs des astrocytes notamment les pituicytes) et d'un autre côté avec le DYS_2 et l'anticorps anti-synaptophysine (marqueurs des terminaisons nerveuses des neurones magnocellulaires), ont permis la distinction du marquage des dystrophines dans les pituicytes et les terminaisons nerveuses ainsi que des dilatations subterminales. Ceci a été appuyé par immunocytochimie dans confirmation de leur présence dans la membrane des pituicytes et dans la membrane des dilatations et des terminaisons neurosécrétoires [5].

Parallèlement, les résultats biochimiques que nous avons obtenus dans les fractions

neurohypophysaires, affinent les résultats morphologiques par la présence des dystrophines de différents poids moléculaires. Dans la fraction contenant les pituicytes, et celle contenant les synaptosomes (P2), la présence de Dp427 et de Dp 116 a été signalée. Dans la fraction contenant les granules neurosécrétoires (S) les dystrophines de 427 et 71 kDa de PM apparent, ont été immuno-positives. Ces résultats corroborent avec ceux de Dorbani-Mamine et al [5]. Par ailleurs, dans la cellule musculaire la dystrophine 427 représente le cœur du complexe protéique associé à la dystrophine. Parmi les rôles de ce complexe est l'ancrage de l'actine aux éléments de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire du complexe dystroglycane [20]. Le β -dystroglycane a été démontré dans les pituicytes [5]. Ces cellules forment des manchons autour de la lame basale qui elle-même entoure les capillaires fenêtrés du LN. Il est suggéré, par analogie à la cellule de Schwann que la dystrophine 427 des pituicytes, pourrait intervenir dans l'ancrage d'éléments subcellulaires à des composants de la lame basale.

Il serait probable que la Dp116 dans les pituicytes, pourrait avoir un rôle supplémentaire d'ancrage membranaire par l'interaction avec le β -dystroglycane. Dans la fraction des synaptosomes (P2), nous rappelons que nous avons signalé la présence des Dp427 et 116, ceci est en accord avec les travaux de Dorbani-Mamine et collaborateurs [5]. Ces auteurs suggèrent que la Dp427 pourrait lier les filaments d'actine à la membrane plasmique par l'intermédiaire de la β -dystroglycane qui ont démontré sa présence dans cette fraction. Dans la

fraction des granules de sécrétion (S), les dystrophines retrouvées au niveau de cette fraction, sont la Dp427 et la Dp71. La Dp 71. Il a été suggéré que dans les terminaisons du NMC, la Dp 71 contribue à l'ancrage de la membrane des granules à l'actine [5].

2. Distribution de la cavéoline dans l'axe hypothalamo-neurohypophysaire

Les cavéolines ont fait l'objet de plusieurs études dans les différents systèmes cellulaires comme les cellules musculaires, hépatiques, pulmonaires, adipeuses et endothéliales, cependant, leur étude au niveau des neurones reste très sommaire. Les résultats que nous avons obtenus par immunohistochimie et par western-blot montrent l'existence des cavéolines au niveau des corps cellulaires des NMC ainsi que dans leurs terminaisons et dans les pituicytes au lobe nerveux.

2.1. Au niveau des noyaux supra-optiques et paraventriculaires

Dans ces noyaux, l'immunomarquage par l'anti-CAV1 s'observe dans les corps cellulaires des NMC et au niveau perivasculaire. Dans les corps cellulaires des NMC, il présente sous un aspect granuleux et hétérogène. Ce marquage est similaire à celui retrouvé dans les cellules gliales en culture [9]. Ces auteurs ont essayé d'expliquer à l'aide du microscope électronique que ces granulations hétérogènes observées, ne seraient que des amas de vésicules ressemblant aux cavéolines et qui seraient les transporteurs du matériel de biosynthèse.

D'un autre côté, Il est nettement observé dans le corps cellulaire que ces granulations prennent naissance dans la région perinucléaire et se propagent dans le cytosol pour atteindre la région membranaire plasmique. Il est suggéré selon Smart et collaborateurs [21] que cette distribution est en faveur d'un rôle de la cavéoline dans le transport du cholestérol entre le réticulum-endoplasmique et la membrane plasmique par une voie Golgi-indépendante.

Le marquage perivasculaire retrouvé dans ces deux noyaux, pourrait être localisé aussi bien dans les cellules endothéliales que dans les cellules gliales puis que ces dernières entourent les vaisseaux. Il est suggéré que dans ces cellules, la cavéoline pourrait participer dans le transport transcellulaire [22] et pourrait être impliquée dans la formation de la barrière hématoencéphalique.

2.2. Au niveau de la neurohypophyse

Nous rappelons que l'immunoréactivité à l'anti-CAV1 a été observée par immunohistochimie dans les régions perivasculaires et dans des éléments cellulaires qui semblent être des pituicytes. De même que pour le western-blot, les cavéolines sont observées dans la fraction enrichie en pituicytes et dans la fraction enrichie en granules de sécrétion.

Les résultats de western-blot que nous avons obtenus dans la fraction enrichie en pituicytes, montrent une réaction à une bande 22kDa e PM ce qui devrait correspondre à la cavéoline-1. Dans le système nerveux, les cavéolines ont été identifiées, dans les cellules gliales en culture [9] et dans les cellules de

schwann [24]. La cavéoline-1 retrouvée dans cette fraction, est un témoin de la présence de cavéolaes. Plusieurs études ont montrées que les cavéolaes isolées à partir de tissus non neuronaux, sont composés de lipides et de composants protéiques impliqués dans le phénomène de la signalisation cellulaire [10]. Parmi les composant de ce spectre de protéines, sont de multiple classes de molécules d'adhésion cellulaires comme la F3 [25]; la NCAM-120 [26]. Des cavéolaes obtenues à partir de fractions d'astrocytes montrent une composition similaire à celles obtenues à partir de tissus périphériques, notamment les molécules d'adhésion cellulaire [9]. Il est suggéré par analogie aux astrocytes que les cavéolaes pourraient participer dans la plasticité des pituicytes par l'intermédiaire des molécules d'adhésion qu'elles pourraient internaliser.

Dans la fraction des granules de sécrétion (S), les résultats montrent l'existence d'une bande protéique de 22 kDa qui correspond à la cavéoline-1. Dans cette fraction, on peut retrouver entre autre les granules de sécrétion les cavéolaes. Des travaux ont démontré que les cavéolaes sont équipées par la machinerie nécessaire pour le bourgeonnement, le docking et la fusion des structures membranaires, contenant le matériel de biosynthèse [27]. Il est suggéré que la cavéoline-1 pourrait être impliqué dans le processus de la libération du produit de sécrétion des granules neurohypophysaires. Dans le SHN le processus du retour vésiculaire est indépendant de la clathrine [28]. Il serait probable que la cavéoline-1 est impliquée dans ce processus.

3. Relation de la dystrophins/cavéolines au niveau de la neurohypophyse

Dans les trois fractions neurohypophysaires, on a démontré par la technique de ligand-blotting, la liaison des cavéolaes à des protéines de haut et de faible PM. Dans le gel de 10%, liaison des cavéolaes avec des protéines de 427, 116kDa dans les trois fractions. Dans le gel de 12%, liaison des cavéolaes avec des protéines de 71, 43, 45 et 22 kDa dans la fraction des pituicytes et des protéines de 43 et 45 kDa dans la fraction des granules sécrétatoires. Dans le gel de 10% qui permet la migration de protéines de haut PM, la liaison des cavéolaes avec des bandes protéiques de 427 et de 116kDa dans les trois fractions, coïncide avec des bandes protéiques de 427 et 116 kDa, révélées par le DYS2, dans ces mêmes fractions.

Dans le gel de 12%, permettant une meilleur migration des protéines de faible PM, la bande protéique de 22 kDa, observée dans la fraction des pituicytes, représente la cavéolin-1, résultat qui a été obtenu précédemment ou pourrait être des cavéolaes qui se sont attachées à une autre protéine de 22 kDa.

Dans la fraction des pituicytes et dans celle des granules neurosécrétoires, les cavéolaes sont liées à une bande protéique de 43-45 kDa qui pourrait correspondre à la β -dystroglycane. Par western-blotting, une protéine similaire révélée par l'anticorps anti- β -dystroglycane a été mise en évidence dans la fraction neurohypophysaire enrichie en pituicytes et dans celle des granules en stock, par les travaux de Dorbani-Mamine et collaborateurs [5].

Les mêmes auteurs ont démontré la présence de protéine de 45kDa, révélée par l'actine dans la fraction des granules en stock neurohypophysaires. Ce qui nous laisse penser que dans notre résultat la protéine de 45 kDa révélée par ligand-blotting à l'anticav-1 dans la fraction enrichie en granules pourrait correspondre à l'actine.

En effet, dans les différents systèmes cellulaires; les cavéolaes internalisent de multiples classe de molécules protéiques dont la cavéoline intéragie avec plusieurs [29]. Parmi elles; les protéines structurales comme l'actine [10]. La dystrophine appartient au groupe de protéines liant l'actine.

Par ailleurs, dans la cellule

musculaire l'intéraction de la dystrophine et la cavéoline existe dans le mécanisme de la contraction musculaire. Les invaginations des tubules -T sont formées par la coalescence de cavéolaes dont le fonctionnement dépend de la CAV-3 [30]. La CAV-3 s'associe à la dystrophine par l'intermédiaire du -dystroglycane [31] qui la relie à la membrane plasmique.

Dans le système nerveux central (SNC), tissu non contractile mais doté d'une très grande plasticité. Cette particularité qui intéresse aussi bien les neurones que les cellules gliales, fait intervenir les molécules protéiques d'adhésion cellulaires. Ces molécules interagissent du côté interne de la

membrane, à la fodrine (qui est l'isoforme de la spectrine dans le SNC). Par ailleurs, l'-actinine, une protéine liant l'actine analogue à la dystrophine est impliquée dans les adhésions entre les cellules dans le tissu musculaire [32]. Les cavéolaes de leurs coté renferment les molécules d'adhésion cellulaires. Dans la neurohypophyse, il serait probable que les pituicytes et les terminaisons neurosécrétoires qui sont en fonction des stimuli physiologiques en perpétuel réarrangement [33], font impliquer des molécules d'adhésions résidées dans les cavéolaes et qui interagiraient avec les dystrophines.

RÉFÉRENCES

- [1]. Takemitsu M., Ishira., Koga R., Kamakura k., Arahata K., Nonaka I & Sugita H. (1991). Dystrophime-related protein in the fetal and denerved skeletal muscle of normal and MDX Mice. *Biochem. Bbiophys. Res. Commun* 180: 1179-1186
- [2]. Petrof B.J., Sharger J.B., Stedman H.H., Kelly A.M. & Sweeney H.L. (1993). Dystrophin protects the sacolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3710-3714
- [3]. Rendo T. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signalling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24:1575-1594
- [4]. Jung D., Pons F., Leger J. J., Aunis D. & Rendon A. (1991). Dystrophin in central nervous system: a developmental, regional distribution and subcellular localization study. *Neurosci Lett* 124:87-91
- [5]. Dorbani-Mamine L., Stoeckel M.E., Jancsik V., Ayad G. & Alvaro Rendon A. (1998). Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats: Immunolocalization and biochemical characterization. *Neuroreport* 9: 3583-3587
- [6]. Palade G.E. (1953). Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Physiol* 24 :1424-1436
- [7]. Peters K-R., Carley W.W., Palade Ge. Endothelial plasmalemmal vesicles have a charactereristic striped bipolar surface structure. *J. Cell Biol.* 101: 2233-2238, 1985
- [8] Gil J. (1983). Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed. Proc.* 42:2414–2418
- [9]. Cameron PL., Rufin JW., Bolag R., Rasmussen H. & Cameron S. (1997). identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* 17:9520-9535
- [10]. Lisanti M.P., Sherer P.E., Viduiriene J., Tang Z-L., Hemanoski-Vosalkaa., Tu Y-H. Cook Rf & Sargiacomo M, (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from endothelial-rich source: implications for human disease. *J; Cell Biol;* 126: 11-126

- [11]. Murata M., Peranen J., Schreiner R., Weiland F., Kurzchalia T. & Simons K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10339–10343,
- [12]. Nordmann J.J. (1982). *Evidence for an ageing process within neurosecretory granules*. In: *Neuroendocrinology of vasopressin, corticotiberin and opiomelanocortins*, Eds., A.J. Baertschi and JJ Dreifuss, Academic press, London: 11-20
- [13]. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254
- [14]. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-688
- [15]. Lidov H.G.W. (1996). Dystrophin in the nervous system, *Brain Pathol.*, 6: 63-77
- [16]. Janscik V. & Hajos F. (1999). The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Res.*, 831: 200-205
- [17]. Hatton G.I. (1997). Oxytocin and vasopressin neurones: vive la difference! *J Physiol* 500: 284
- [18]. Lidov H.G.W. (1996). Dystrophin in the nervous system, *Brain Pathol.*, 6: 63-77
- [19]. Miyata S. & Hatton G.I. (2002). Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microscopy Research and Technique*, 56: 143-157.
- [20]. Petrof B.J., Sharger J.B., Stedman H.H., Kelly A.M. & Sweeney H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3710-3714
- [21]. Smart E.J., Ying Y-S., Donzell W.C., & Anderson R.G.W. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem* 271:29427–29435,
- [22]. Ghitescu L. & Bendayan M. (1992). Transendothelial transport of serum albumin: A quantitative immunocytochemical study. *J Cell Biol* 117:745–755,
- [23]. Virgintino D. Robertson D., Erred M., Benagiano V., Tauer U., Roncali L. & Bertossi M. (2002). Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* 115: 145-152,
- [24]. Mikol D.D., Hong H.L., Cheng H.L. & Feldman E.L. (1999). Caveolin-1 expression in Schwann cells. *Glia*, 27: 39-52,
- [25]. Gennarini, Cibelli G., Rougon G., Mattei M. & Golidis C. (1989). The mouse neuronal surface F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to the chick contactin. *J Cell Biol* 109: 775-788
- [26]. Hemperly J.J., Edelman G.M. & Cunningham B.A. (1986). Sequence of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via phosphatidylinositol intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83/9822-9826
- [27] Schnitzer J.E., Oh P., Pinney E. & Allard J. F. (1994). Sensitive caveolae mediated transport in endothelium: Reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol* 127:1217–1232,
- [28]. Burbach J.P.H., Luckman S.M., Murphy D. & Gainer H. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo- neurohypophysial system. *Physiol. Rev.* 81:1197-1267, 2001.
- [29]. Razani B., Scotte W. and Lisanti P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54:431-467

- [30]. Minetti C., Bado M., Broda P., Sotgia F., Bruno C., Galbiati F., Volonte D., Lucania G., Pavan A. & Bonilla E. (2002). Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol* 160:265–270
- [31]. Sotgia F., Lee J.K., Das K., Bedford M., Petrucci T.C., Macioce P., Sargiacomo M., Bricarelli F.D., Minetti C., Sudol M. & Lisanti M.P. (2000). Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta-dystroglycan. Identification of central WW-like domain within caveolin family members. *J. Biol. Chem.* 275: 38048–38058
- [32]. Ahn A.H. & Kunke I. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature Genet.* 3: 283-291
- [33]. Boersma C.J.C., Sonnemans M.A.F. & Van Leeuwen F.W. (1993). Immunoelectron microscopic demonstration of oxytocin and vasopressin in pituicytes and nerve terminals forming synaptoid contacts with pituicytes in the rat neural lobe. *Brain Res.* 611: 117-129