

## EFFET DE LA DESHYDRATATION SUR LA DISTRIBUTION DES DYSTROPHINES ET DE SES PROTEINES ASSOCIEES AU NIVEAU DU LOBE NERVEUX HYPOPHYSIAIRE DE RAT WISTAR

Reçu le 01/06/2011 – Accepté le 23/09/2012

S. GUENDOZI, L. DORBANI-MAMINE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe de neurochimie, LBPO, FSB, USTHB, Alger

[latidorma@ymail.com](mailto:latidorma@ymail.com)

### Résumé

La dystrophine (Dp) est le produit du gène de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Nous nous sommes intéressés dans ce travail, à l'étude de l'expression et de la distribution des Dps, Ups, et les DAPs membranaires ( $\beta$ -DG,  $\delta$ - et  $\epsilon$ -sarcoglycane (SG)). Cette étude est réalisée au niveau des constituants du lobe nerveux hypophysaire (LN) de rat euhydraté et de rat déshydraté par 6 jours de privation d'eau. Les résultats obtenus ont montré l'expression des Dps, Ups,  $\beta$ -DG et pour la première fois les deux sarcoglycane ( $\delta$ - et  $\epsilon$ -SG) dans les différents constituants du LN. De plus, ces protéines semblent avoir des distributions en complexes différents constitués soit par une association Dps-DAPs ou Ups-DAPs selon les types cellulaires et les niveaux subcellulaires. Chez les rats déshydratés, la distribution des dystrophines, utrophines et DAPs est modifiée. Ces résultats suggèrent que ces complexes protéiques auraient des rôles physiologiques distincts dans l'activité neurosécrétoire et sa régulation au niveau de ce système.

**Mots clés :** Dystrophines, Utrophines, Protéines associées à la dystrophine (DAPs), Dystroglycane, Sarcoglycane, Déshydratation, Plasticité, Lobe nerveux hypophysaire

### Abstract

Dystrophin (Dp) is the product of the gene for Duchenne muscular dystrophy (DMD). We were interested in this work to study the expression and distribution of Dps, Ups, and membranous DAPs ( $\beta$ -DG,  $\delta$ - and  $\epsilon$ -sarcoglycan (SG)). This study was conducted at the components of the pituitary neural lobe (NL) of normal and six days dehydrated rats. The results showed that Dps, Ups,  $\beta$ -DG and for the first time the two sarcoglycans ( $\delta$ - and  $\epsilon$ -SG) are expressed in the different cell components of the NL. Furthermore, these proteins appear to have different distributions in complex formed by an association or Dps-DAPs-Ups DAPs according to cell types and subcellular levels. The distribution of dystrophins, utrophins and DAPs is changed when rats are dehydrated. These results suggest that these complexes could have distinct physiological roles in the neurosecretory activity and its regulation in this system.

**Keywords:** dystrophins, Utrophins, Dystrophin-Associated proteins (DAPs), dystroglycans, sarcoglycans, Dehydration, plasticity, pituitary neural lobe

### ملخص

الدستروفين (Dps) هو نتاج جين لضمور العضلات لدوشين (DMD). نحن مهتمون في هذا العمل لدراسة التعبير وتوزيع Dps، Ups، و ( $\beta$ -DG،  $\delta$  و  $\epsilon$ -sarcoglycan (SG)). وقد أجريت هذه الدراسة على مكونات من الغدة النخامية العصبية لجرذان مجففة بنسبة 6 أيام من الحرمان من شرب الماء. وجرذان. يسمح لها بالشرب المطلق. أظهرت النتائج التعبير عن Dps، Ups،  $\beta$ -DG، و لأول مرة اثنين sarcoglycans ( $\delta$  و  $\epsilon$ -SG) في المكونات المختلفة للغدة النخامية. وعلاوة على ذلك، يبدو أن هذه البروتينات لها توزيعات مختلفة في مجموعات مختلفة وفقا لأنواع الخلايا ومستويات تحت خلوية. يتم تغيير توزيع المجمعات البروتينية عند الجرذان المحرومة من شرب الماء. أظهرت هذه النتائج تشير إلى أن هذه مجموعات البروتين أدوارا فسيولوجية واضحة في نشاط الإفراز العصبي ولائحته في النظام الطائي.

**الكلمات المفتاحية :** ديستروفين – أوتروفين – البروتينات المرتبطة بالديستروفين – حرمان شرب الماء – اللدونة – الفص العصبي للغدة النخامية

Le cytosquelette subcortical ou membranaire, est composé de molécules protéiques transmembranaires et d'autres positionnées à la face interne de la membrane plasmique. Le cytosquelette membranaire le plus connu est celui des hématies où la spectrine constitue le composant structural majeur [1]. Au niveau de la cellule musculaire striée et des cellules endocrines, les dystrophines et la fodrine constituent respectivement les constituants majeurs du cytosquelette subcortical et présentent de fortes homologies de structure avec la spectrine [2].

L'organisation des dystrophines au niveau du sarcolemme a fait l'objet de plusieurs études. A ce niveau, la dystrophine assure le lien entre les filaments d'actine intracellulaires et la matrice extracellulaire (MEC). La liaison de la dystrophine aux éléments de la MEC fait intervenir un autre groupe de protéines associées à la dystrophine, les DAPs (Dystrophin-Associated-Proteins).

Ces interactions protéiques permettent la protection de la membrane sarcolemmale contre les forces de contractions musculaires et assurent l'intégrité tissulaire [3]. En effet, l'absence de la dystrophine dans le muscle est à l'origine d'une maladie héréditaire léthale, la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Les patients atteints de cette myopathie présentent une perte progressive des cellules musculaires qui touche aussi les cellules du muscle cardiaque [4], entraînant la mort de l'individu. Les malades atteints de DMD présentent aussi des déficiences cognitives [5].

La dystrophine, une protéine de 427 kDa (Dp427), est codée par le plus grand gène retrouvé chez l'homme, le gène DMD. Ce dernier code pour 4 isoformes de la Dp427. Il s'exprime spécifiquement en fonction du tissu et de son développement, la Dp 427M, Dp427B, Dp427P et Dp427L qui s'expriment, respectivement, dans le muscle, le cerveau, les cellules de Purkinje et les lymphocytes.

La Dp427 présente quatre domaines distincts [6]. L'extrémité N-terminale où sont localisés les sites de liaison de l'actine, un long domaine central, à motifs hélicoïdaux répétés, portant d'autres sites liant l'actine, un domaine riche en cystéine qui présente des sites de liaison d'ions calcium et un domaine C-terminal, où sont localisés les sites de liaison des protéines du complexe DAPs. Par ailleurs, le gène DMD possède des promoteurs internes qui s'expriment, en fonction des tissus, en protéines de plus petites tailles. Ces protéines sont définies par leurs poids moléculaires apparents. La Dp260 est retrouvée au niveau de la rétine [7], la Dp140, excepté dans le muscle, est retrouvée dans différents tissus, entre autres, le tissu nerveux [8], la Dp116 qui a été mise en évidence dans le système nerveux périphérique [9] et la Dp71 dont la distribution tissulaire est ubiquitaire mais dominante au niveau du SNC [10-12].

Dans le système hypothalamo-neurohypophysaire, notre groupe est le premier à avoir rapporté la présence des dystrophines dans les neurones et les cellules gliales [13].

Nous avons montré, par western blot, sur des fractions extraites du lobe nerveux hypophysaire, que les membranes de synaptosomes (fractions composée de dilatations axonales et de terminaisons neuronales de neurones magnocellulaires), les membranes de granules à core dense ainsi que celle des cellules gliales expriment les dystrophines. On retrouve la Dp427 au niveau des membranes des terminaisons et des dilatations axonales ainsi que des membranes gliales alors que la Dp116 et la Dp71 sont exprimées au niveau des membranes de granules à core dense en stock au niveau des dilatations.

En fait, le système hypothalamo-neurohypophysaire est une structure nerveuse très étudiée pour ses caractéristiques de plasticité réversible. Il est responsable de l'homéostasie hydrominérale. Il est constitué par des neurones magnocellulaires qui expriment l'Arginine-Vasopressine (AVP) et de l'oxytocine (OT). Les corps cellulaires de ces neurones sont regroupés au niveau de noyaux hypothalamiques dont les principaux sont les supraoptiques (NSO) et les paraventriculaires (NPV). Les prolongements axoniques traversent l'éminence médiane et finissent en plusieurs terminaisons neurohémales et dilatations qui aboutissent contre l'espace périvascularaire des capillaires fenêtrés du lobe nerveux hypophysaire. A ce niveau, les granules à core dense qui contiennent l'AVP ou l'OT sont soit sécrétés soit stockés dans les dilatations axonales.

L'activité des neurones magnocellulaires est régulée par les afférences glutamatergiques, GABAérgiques, catécholaminérgiques et par les cellules gliales astrocytaires. En effet, les astrocytes qui jouxtent les corps cellulaires des neurones magnocellulaires ainsi que les astrocytes modifiés, les pituicytes, qui jouxtent les terminaisons axonales font pour les premiers, barrière aux stimulations par les neurotransmetteurs en se mettant entre les terminaisons des neurones afférents et les corps cellulaires des neurones magnocellulaires et pour les deuxièmes empêchent la sécrétion neurohémale en se mettant entre les terminaisons des neurones magnocellulaires et l'espace périvasculaire [14-17].

Au niveau de ce système, en plus des dystrophines, nous avons mis en évidence les utrophines. Les utrophines sont des protéines homologues aux dystrophines. Ces deux groupes protéiques sont étroitement associés aux DAPs. Le  $\beta$ -dystroglycane, que nous avons retrouvé aussi au niveau du système hypothalamo-neurohypophysaire est le composant des DAPs le plus couramment retrouvé. Nous avons par ailleurs montré que dans des conditions de stress hydrique, telle que la privation d'eau, la distribution de ces complexes protéiques dystrophines-DAPs est modifiée et semble suivre la dynamique cellulaire neuronale et gliale. Ces complexes seraient impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques et de régulation au niveau de ce système.

Dans ce présent travail, et en complément aux précédents résultats, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression et la distribution des Dps, Ups et des DAPs

membranaires comme le  $\beta$ -dystroglycane, l' $\delta$  et l' $\epsilon$ -sarcoglycane, au niveau du lobe nerveux hypophysaire de rat. Cette étude, par une approche immunohistologique est entreprise chez des animaux normohydratés (NH) et des animaux déshydratés (DH) par privation d'eau pendant 6 jours.

## MATERIELS ET METHODES

Les rats de souche Wistar proviennent de l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB. Ils sont élevés dans des conditions standard de température (25°C) et d'hygrométrie. Ils sont nourris ad libitum par des granulés d'aliments complets fournis par l'Institut Pasteur d'Alger.

Après une période d'adaptation pendant laquelle les animaux sont répartis dans des cages individuelles, ils sont soumis aux conditions d'expérimentation où les biberons d'eau sont enlevés des cages des animaux déshydratés. La nourriture continue à être fournie à volonté à tous les animaux.

Les anticorps (tableau 1) sont fournis gracieusement par le laboratoire du Dr D. Mornet (Institut de Biologie, (EA701), Montpellier, France). Les anticorps secondaires, combinés à une activité peroxydase ainsi que les réactifs de révélation de cette activité, sont un don du Dr A. Rendon (Institut de la vision INSERM UMR\_S968, CNRS UMR\_7210, UPMC, Paris, France).

Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution d'uréthane à 25% et à raison de 1ml/100g du poids corporel. Ils sont ensuite disséqués par ouverture de la cage thoracique, une mise à nu du cœur. On pratique une perfusion intracardiaque semi-circulante, par clampage de l'aorte descendante, par 250mL de paraformaldéhyde à 3% (PAF) dans du tampon phosphate (TP) 0.1M avec un débit de perfusion égal à 13mL/min.

L'aiguille de perfusion est introduite au niveau du ventricule gauche jusqu'à l'aorte ascendante. L'oreillette droite est alors entaillée pour permettre une circulation ouverte du liquide de perfusion.

L'animal est décapité, le cerveau et l'hypophyse, logée dans la selle turcique sont prélevés et immergés dans la solution de fixation pendant 4h à + 4°C. Le liquide fixateur est ensuite remplacé par une solution de TP (0.1M) contenant du thymérosal (antifongique) à 0.1%. Les échantillons sont conservés à +4°C pendant 24-48h.

L'hypophyse, du fait de sa petite taille est incluse dans de l'agar-agar à 5% dans l'eau distillée. Les blocs d'agar-agar et les cerveaux sont collés à la super glue sur le support du vibratome (LKB-1000) immergé dans un bain de tampon PBS (TP-0.1M Na Cl 0.9%).

Les coupes au vibratome, flottantes de 50 $\mu$ m sont délicatement récupérées et triées dans du tampon PBS froid.

L'immunomarquage est réalisé en plusieurs étapes, sous agitation douce et à température ambiante, qui se résume comme suit :

a-) Perméabilisations par incubation des coupes pendant une heure, dans du Triton X-100 à 0.5% dans le PBS (0.05M).

b-) Blocage des sites aspécifiques par incubation des coupes dans de l'albumine sérique de bovins à 1% dans le PBS (0.05M) pendant 1 heure.

c-) La réaction immunologique obtenue par incubation, pendant 15h, en présence des différents anticorps primaires dilués dans le PBS (0.05M). Les différentes dilutions des anticorps sont résumées dans le tableau (1) :

**Tableau1:** dilution des différents anticorps primaires utilisés (type polyclonal)

Anticorps Iaire	Nomination	type	Dilution
Anti dystrophine	H4	polyclonal	1/5
Anti utrophine	K7	polyclonal	1/50
Anti $\beta$ - dystroglycane	LG5	polyclonal	1/100
Anti $\delta$ - sarcoglycane	-	polyclonal	1/200
Anti $\epsilon$ - sarcoglycane	-	polyclonal	1/200

d-) La réaction antigène-anticorps est révélée par des anticorps secondaires (IgG lapin dilué à 1/200 au PBS – 0.05M) couplé à la biotine) par incubation pendant 1h suivie de 3 lavages successifs (10mn chacun), au PBS.

e-) Révélation de l'activité peroxydase par incubation des coupes en présence du complexe Avidine-biotine peroxydase (Kit ABC, vecta stain, Germany) pendant 30mn à l'obscurité. Après 2 lavages de 10mn, l'activité peroxydase est révélée par une pré incubation dans la diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB-Tris HCl) avec 1ml DAB dans 9mL Tris-HCl pendant 10mn à l'obscurité, suivie d'une autre incubation DAB – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (avec 1.5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans 5mL DAB) pendant 10mn à l'obscurité. La coloration brune obtenue est contrôlée sous loupe binoculaire et la réaction est bloquée par 3 lavages au PBS (0.05M) de 10 mn chacun.

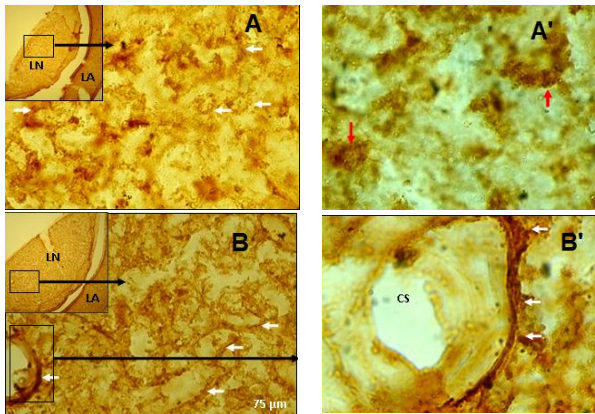
Les coupes immunomarquées sont étalées avec une goutte de PBS (0.05M) sur des lames gélatinées puis séchées à plat, pendant 24h à l'étuve à 45° C. Les coupes sont déshydratées par des bains d'alcools à 75°, 95°, 95°, 100°, Xylène, et Xylène à des temps 10', 5', 5', 10', 5', 5'

respectivement puis montées entre lame et lamelle au Baume de Canada.

L'observation au microscope est réalisée par un photo microscope (Zeiss) et la prise de photos est faite par un appareil numérique de marque Canon Shot power A808.

## RESULTATS

### Distribution des dystrophines au niveau du lobe nerveux hypophysaire de rats normohydraté et déshydraté (Figure 1)



**Figure 1:** Localisation par immunoperoxidase des dystrophines au niveau des lobes nerveux hypophysaires de rat normohydraté (A, A') et de rat déshydraté (B, B') 6 jours par privation d'eau.

LN (lobe nerveux), LA (lobe antérieur), (CS) capillaire sanguin.

A: Marquage d'aspect granuleux (flèches blanches).

A': Détail d'un marquage granuleux localisé

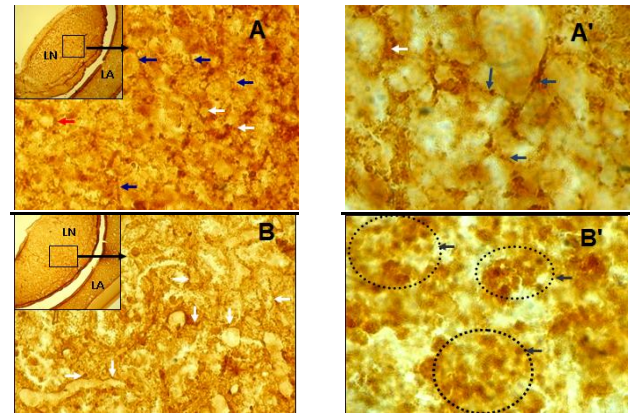
B: Marquage d'expansions gliales (flèches blanches)

B': Marquage d'expansion perivasculaire (flèches blanches),

Chez le rat normohydraté, le marquage des coupes d'hypophyse par le H4 révèle l'expression des dystrophines dans les constituants du lobe nerveux (LN) hypophysaire. Au fort grossissement (A), on constate une localisation généralisée diffuse du marquage dans la neurohypophyse avec un aspect granuleux important localisé (A'), pouvant correspondre aux dilatations ou terminaisons axoniques des neurones magnocellulaires.

Chez le rat déshydraté, le lobe nerveux hypophysaire (B) semble immuno-positif à l'anticorps anti-dystrophines H4. On remarque une distribution différente par rapport à celle obtenue chez le rat NH. L'aspect granuleux est moindre alors qu'on remarque une plus importante apparition d'expansions gliales. Le marquage est aussi très important au niveau périvasculaire (B'). A ce niveau, il apparaît une superposition membranaire autour du capillaire.

### Distribution des utrophines au niveau du lobe nerveux hypophysaire de rats normohydraté et déshydraté (Figure 2)



**Figure 2:** Localisation par immunoperoxidase des utrophines au niveau de lobes nerveux hypophysaires de rat normohydraté et de rat déshydraté 6 jours par privation d'eau.

(LN) lobe nerveux, (LA) lobe antérieur

A, A': marquage des expansions gliales (flèches bleues) et des expansions gliales périvasculaires (flèches blanches)

B: Marquage des expansions gliales (flèches blanches) plus accentué mais un marquage général moins important dans le LN. les expansions gliales périvasculaires sont indiquées (flèches noires).

B': apparition de regroupement glial pouvant correspondre à des astrocytes (pituicytes) ou des cellules microgliales (zones en pointillées).

Le K7 montre la présence des utrophines au niveau du LN hypophysaire de rat normohydraté. Le marquage intense est localisé au niveau de structures pouvant correspondre aux expansions gliales (A et A') (Flèches bleues) et à un niveau périvasculaire (flèches blanches).

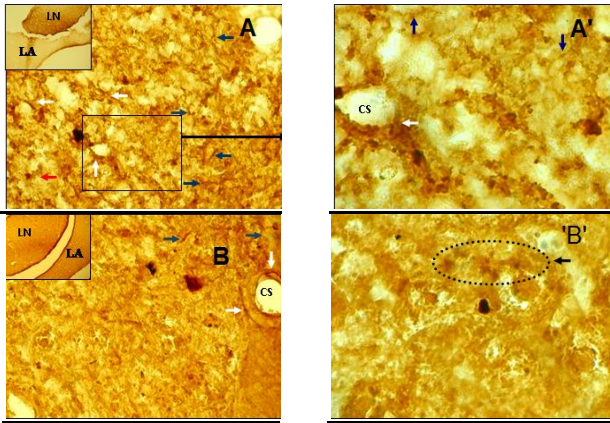
Chez le rat déshydraté, le marquage par le K7 est moins intense comparé à celui obtenu chez le rat normohydraté (B) avec cependant, des expansions gliales plus fines et plus longues (flèches blanches). Au fort grossissement, on note l'apparition de nombreuses cellules regroupées (B': zones en pointillées). Ces cellules pourraient correspondre à des cellules astrocytaires (pituicytes) rétractées ou des microglies.

### Distribution des DAPs au niveau du lobe nerveux hypophysaire de rat normohydraté et déshydraté:

#### - Le $\beta$ -dystroglycane (Figure 3)

Chez le rat normohydraté, le  $\beta$ -DG révélé par le LG5 présente une localisation généralisée au niveau du lobe nerveux hypophysaire. On constate une distribution compatible à celle des dystrophines et encore plus à celle des utrophines (A). Le marquage est présent au niveau de certaines expansions de pituicytes (flèches bleues) et au niveau des expansions gliales autour des capillaires sanguins (flèches blanches). Au plus fort grossissement (A'), les expansions gliales (Flèches bleues) et

perivasculaires (Flèches blanches) sont nettement bien marquées. Il apparaît que ces structures expriment fortement le  $\beta$ -dystroglycane.



**Figure 3 :** Localisation par immunoperoxydase du  $\beta$ -dystroglycane au niveau des lobes nerveux hypophysaires de rat normohydraté et de rat déshydraté 6 jours par privation d'eau.

(LN) Lobe nerveux, (LA) Lobe antérieur, (CS) capillaire sanguin.  
A, A': Les expansions gliales des pituicytes (flèches bleues) et perivasculaire (flèches blanches),  
B, B': Les expansions sont plus fines et plus nettes (flèches bleues) et concentrées au niveau périvasculaire (flèches blanches). Apparition de groupe cellulaire glial (pointillés).

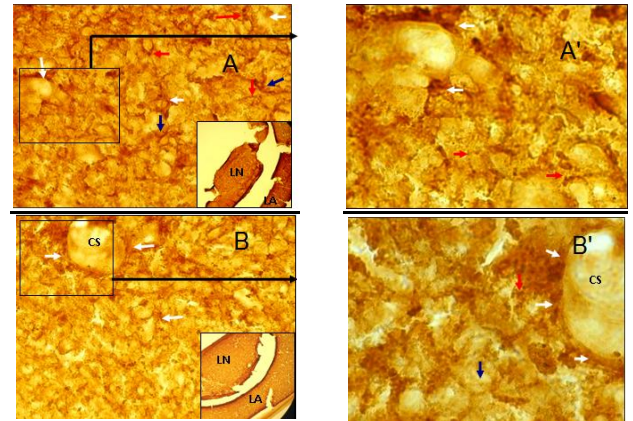
Chez le rat déshydraté, le marquage par le LG5 semble avoir une distribution et une intensité différentes (B). On remarque une concentration plus accentuée du marquage au niveau d'expansions fines des pituicytes (flèches bleues). Le marquage périvasculaire (flèches blanches) apparaît plus accentué au niveau périvasculaire. Cet aspect de marquage rappelle ceux observés par le H4 et par le K7 qui révèlent respectivement, les dystrophines et les utrophines. Au fort grossissement (B': zones en pointillées) les cellules que nous avons décrit précédemment, en plus des dystrophines et des utrophines, expriment le  $\beta$ -dystroglycane.

- **Le  $\delta$ -sarcoglycane (Figure 4)**

Chez le rat NH, le  $\delta$ -SG, révélé par l'anticorps qui lui est spécifique, est exprimé au niveau du lobe nerveux hypophysaire. La distribution du marquage est similaire à celle du  $\beta$ -DG (A). Le marquage présente une localisation gliale importante (flèches bleues) et aussi une localisation au niveau des expansions gliales autour des vaisseaux sanguins (flèches blanches). Un marquage d'aspect granuleux est aussi obtenu (flèches rouges). Au plus fort grossissement en A', on voit nettement le marquage de l'astroglie périvasculaire (flèches blanches).

Chez le rat déshydraté, l'immunomarquage à l'anticorps anti  $\delta$ -SG révèle une réaction positive mais avec une intensité du marquage plus faible que celle observée chez le rat normohydraté (B). Cette diminution du marquage est associée à un affinement des expansions gliales (flèches blanches), phénomène qui semble conséquent à leur rétraction. En B', le marquage périvasculaire (flèches

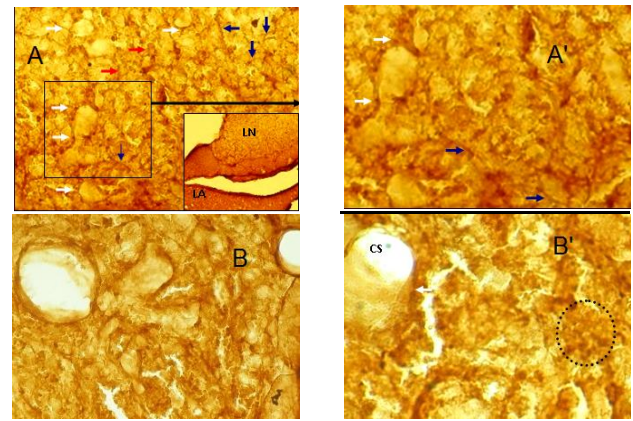
blanches) est d'aspect différent par rapport à celui observé chez le rat normohydraté mais est très semblable à celui observé pour le marquage des dystrophines ou même des utrophines et du  $\beta$ -DG, chez le rat déshydraté.



**Figure 4 :** Localisation par immunoperoxydase du  $\delta$ -sarcoglycane au niveau des lobes nerveux hypophysaires de rat normohydraté et de rat déshydraté 6 jours par privation d'eau.

(LN) Lobe nerveux, (LA) Lobe antérieur, (CS) capillaire sanguin.  
A, A': Fort marquage des expansions de pituicytes (flèches bleues), étalées dans l'espace et plus accentué au niveau périvasculaires (flèches blanches)  
B, B': Diminution de l'intensité du marquage mais affinement des expansions de pituicytes (flèches bleues). Vue détaillée de l'aspect du marquage périvasculaire (flèches blanches)

- **L' $\epsilon$ -sarcoglycane (Figure 5)**



**Figure 5 :** Localisation par immunoperoxydase de l' $\epsilon$ -sarcoglycane au niveau des lobes nerveux hypophysaires de rat normohydraté et de rat déshydraté par privation d'eau pendant 6 jours.

(LN) Lobe nerveux, (LA) Lobe antérieur, (CS) capillaire sanguin.  
A, A': Marquage des expansions de pituicytes (flèches bleues), marquage périvasculaire (flèches blanches), aspect granuleux du marquage (flèches rouges)  
B, B': Marquage moins intense que le rat euhydraté. Expansions périvasculaires (flèches blanches) non périvasculaires (flèches bleues). Apparition de groupe de cellules microgliales ou d'astrocytes contractés (zone en pointillés).

Chez le rat normohydraté, le marquage de l' $\epsilon$ -SG montre une distribution similaire à celle du  $\delta$ -SG, du  $\beta$ -DG,

des Dps (A). Un aspect granuleux (flèches rouges) très important. De plus, l' $\epsilon$ -SG semble aussi avoir une localisation gliale importante au niveau des membranes de pituicytes (Flèches bleues) et celle de la glie périvasculaire (Flèches blanches) (A').

Suite à un stress hydrique, en B, on remarque une réorganisation du marquage comme pour le  $\delta$ -SG et du  $\beta$ -DG. Le marquage lié aux expansions des pituicytes a beaucoup diminué. En B', on remarque que le marquage périvasculaire (flèches blanches) est aussi semblable à celui des autres protéines recherchées. On remarque, que l' $\epsilon$ -SG est localisé au niveau de petites cellules, rappelant celles observées chez le rat déshydraté et exprimant le  $\beta$ -DG et le  $\delta$ -sarcoglycane.

Nous avons récapitulé les distributions des marquages obtenus par les différents anticorps au niveau du lobe nerveux de rat normohydraté (NH) et déshydraté (DH) dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Tableau récapitulatif des distributions des Dps, Ups,  $\beta$ -DG,  $\delta$ - et  $\epsilon$ -SG au niveau du lobe nerveux hypophysaire de rats normohydraté (NH) et déshydraté (DH)

Structures du lobe nerveux hypophysaire	Niveau périvasculaire		Expansions des pituicytes		Aspect granuleux		Cellules Microgliales	
	EH	DH	EH	DH	EH	DH	EH	DH
Animal/ Type d'anticorps								
Anti DP (H4)	*	***	*	*	****	**	-	-
Anti Up (K7)	***	***	***	*	-	-	-	***
Anti- $\beta$ -DG (LG5)	***	***	***	*	***	*	-	***
Anti- $\delta$ -SG	***	***	***	*	***	*	-	**
Anti- $\epsilon$ -SG	***	***	***	*	***	*	-	**

## DISCUSSION

Les résultats obtenus ont permis la mise en évidence des dystrophines, utrophines,  $\beta$ -DG,  $\delta$ -SG et  $\epsilon$ -SG au niveau des constituants du lobe nerveux hypophysaire.

Les dystrophines semblent avoir une localisation généralisée dans cette structure. Le marquage présente un aspect granuleux important qui nous laisse suggérer une localisation des Dps au niveau des granules de sécrétions, concentrés dans les dilatations axonales subterminales des neurones magnocellulaires. Ce résultat rejoint celui obtenu précédemment par notre groupe [12].

Le fait que les dystrophines soient des protéines qui lient l'actine-F, leur présence au niveau des membranes de granules en stock, a permis à ces auteurs de suggérer leur implication dans l'immobilisation de ces granules et ainsi leur stockage, par un pontage croisé avec les filaments d'actine.

Suite à une déshydratation par privation d'eau, on a observé une diminution de l'aspect granuleux, observé chez le rat normohydraté. Cette diminution serait liée à l'exocytose des granules neurosécrétoires qui étaient en stock. En effet, cette population de granules n'est sollicitée à la sécrétion que suite à un stress chronique nécessitant un apport hormonal vasopressinergique important [18].

Par ailleurs, les dystrophines adoptent une autre localisation intéressante, au niveau périvasculaire. La dystrophines seraient associées aux membranes des expansions gliales qui forment un manchon autour des capillaires sanguins. Ce résultat rejoint celui obtenu dans le système nerveux central [19] et dans les membranes de cellules de Müller de la rétine [20]. Les expansions gliales périvasculaires ont été rapportées pour former une barrière entre les terminaisons subterminales et les espaces périvasculaires empêchant ou régulant ainsi la sécrétion neurohémale des hormones neurohypophysaires au niveau du lobe nerveux [15].

Nous avons rapporté la présence des utrophines dans les structures du lobe nerveux hypophysaire. Il apparait que les cellules gliales non seulement expriment autant les dystrophines que les utrophines mais que ces 2 familles de protéines sont aussi très enrichies au niveau des expansions gliales en position périvasculaire. Ces protéines seraient donc impliquées dans des fonctions complémentaires. Ces suggestions sont basées sur le fait que les cellules musculaires co-expriment les 2 familles de protéines et que ces dernières adoptent des localisations différentes au niveau du sarcolemme.

Les utrophines sont plus concentrées au niveau des jonctions neuromusculaires et interviendraient dans le regroupement des récepteurs de l'acétylcholine [21,22] alors que les dystrophines sont localisées sur le reste du sarcolemme, suggérant un rôle plutôt structural [23]. Ces 2 familles de protéines peuvent aussi avoir des fonctions homologues puisque dans des conditions pathologiques, les utrophines peuvent se substituer aux dystrophines manquantes dans la cellule musculaire [24].

Dans les conditions de stress hydrique, la distribution des dystrophines et celle des utrophines est modifiée au niveau du lobe nerveux. Elles semblent adopter des localisations analogues aux changements morphologiques observés dans cette structure. En effet, dans les conditions de stress hydrique, les expansions gliales se rétractent pour libérer l'accès des terminaisons à la lame basale [25-27]. Ces cellules gliales sont très actives à ce niveau. Elles sont capables de réguler la sécrétion des hormones [28]. Ainsi, il semble intéressant de suggérer que les dystrophines et les utrophines seraient impliquées dans cette plasticité cellulaire. Le processus moléculaire de ce phénomène pourrait être lié, comme pour d'autres systèmes, à des interactions probables entre les protéines du cytosquelette subcortical et les molécules d'adhésion.

Par ailleurs, les protéines associées à la dystrophine, le  $\beta$ -DG, la  $\delta$  et l' $\epsilon$ -sarcoglycanes sont exprimées par les cellules gliales et que ces protéines adoptent des distributions très similaires à celles des dystrophines et des utrophines.

On retrouve les DAPs au niveau des membranes de granules en stock. Les complexes retrouvés à ce niveau, seraient composés de Dps// $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG. Les DAPs accompagneraient les dystrophines dans leur rôle suggéré, dans le stockage des granules de neurohormones.

Au niveau des expansions, on retrouve les dystrophines, les utrophines ainsi que les DAPs étudiées. Ainsi les complexes formés au niveau des cellules gliales seraient composés de Dps/ $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG et Ups/ $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG. Leur distribution dans les membranes des expansions de pituicytes qu'elles soient périvasculaires ou non, serait une position stratégique donnant à ces complexes protéiques un rôle probable dans la plasticité des ces cellules qui, lors d'un stress hydrique, se rétractent pour libérer les espaces périvasculaires favorisant ainsi, une sécrétion hormonale accrue, nécessaire pour rétablir l'homéostasie.

## CONCLUSION

L'originalité de ce travail est l'étude de la distribution du  $\delta$ - et  $\epsilon$ -SG en plus de celles des dystrophines, utrophines et du  $\beta$ -DG dans les divers constituants cellulaires du lobe nerveux hypophysaire. L'intérêt des résultats obtenus est lié au fait que ce système est physiologiquement très actif et présente le siège d'importants processus sécrétoires avec une grande plasticité structurale et fonctionnelle. Ces protéines peuvent avoir une distribution en complexes différents selon chaque structure neurohypophysaire. Ainsi, nous suggérons :

-Un complexe formé par les Ups/ $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG et un autre formé par les Dps/  $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG au niveau des expansions gliales.

-Un complexe formé par les Dps/ $\beta$ -DG/ $\delta$ -SG/ $\epsilon$ -SG au niveau des granules neurosécrétoires en stock.

Cette variabilité des complexes au niveau des composants du lobe nerveux suggère des rôles physiologiques distincts et/ou complémentaires dans l'activité neurosecrétoire et sa régulation ainsi que dans les processus de plasticité cellulaire gliale, phénomène fondamental dans la physiologie de ce système.

## REFERENCES

- [1] **Bennet V. and Gilligan D.M.**, The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organisation of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **9** : 27-66 (1993).
- [2] **Takemitsu M., Ishiura S., Koga R., Kamakura K., Arahata K., Nonaka I and Sugita H.**, Dystrophin-related protein in the fetal and denervated skeletal muscle of normal and mdx mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **180** : 1179-1186 (1991).
- [3] **Culligan K.G., Mackey A.J., Finn D.M., Maguire P.B. and Ohlendieck K.**, Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int. J. Mol. Med.*, **2**: 639-648 (1998).
- [4] **Cohn R.D. and Campbell K.P.**, Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, **23** : 1456-1471 (2000).
- [5] **Anderson J.L., Head S.I., Rae C. And Morly J.W.**, Brain function in Duchenne muscular dystrophy, *Brain*, **125**: 4-13 (2002).
- [6] **Blake D.J., Tinsley J.M., Davies K.E., Knight A.E., Winder S.J. and Kendrick-Jones J.**, Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends. Biochem. Sci.*, **20** : 133-135 (1995).
- [7] **D'Souza V. N., Nguyen T. M., Morris G. E., Karges W., Pillers D. A., and Ray P. N.**, A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 837-842 (1995).
- [8] **Lidov, H. G., Selig, S., and Kunkel, L. M.**, Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 329-335 (1995).
- [9] **Byers, T. J., Lidov, H. G., and Kunkel, L. M.**, An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* **4**, 77-81 (1993).
- [10] **Lederfin D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U.**, A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5346-5350 (1992).

- [11] **Blake D.J., Hawkes R., Benson M.A., and Beesley P.W.**, Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J. Cell Biol.*, 147: 645–658 (1999).
- [12] **Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue MH, Rendon A.** Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul. Disord.*, 3 (5-6):515-8 (1993).
- [13] **Dorbani-Mamine L., Stoeckel M.E., Jancsik V., Ayad G and Rendon A.** Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats: immunolocalisation and biochemical characterization. *Neuroreport*, 9 : 3583-3587 (1998).
- [14] **Tweedle C.D. and Hatton G.I.**, Evidence for dynamic interactions between pituicytes and neurosecretory axons in the rat. *Neuroscience* 5: 661–667 (1980).
- [15] **Theodosis D.T., Bonhomme R., Vitiello S., Rougon G., Poulain D. A.**, Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. Neurosci.*, 19: 10228–10236 (1999).
- [16] **Theodosis D.T., Poulain D. A., and Oliet S.H. R.**, Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions, *Physiol. Rev.*, 88: 983–1008 (2008).
- [17] **Haydon PG, Carmignoto G.**, Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.*, 86: 1009–1031 (2006).
- [18] **Burbach J. P. H., Luckman S. M., Murphy D., and Gainer H.**, Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo- Neurohypophysial System, *Physiol. Rev.*, 81 (3): 1197-1267 (2001).
- [19] **Jancsik V. And Hajos F.**, The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Res.*, 831: 200-205 (1999).
- [20] **Fort P., Sene P., Pannicke T. ....** Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71-and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal cell membrane. *Glia*, 56: 596-610 (2008).
- [21] **Fallon J.R., and Hall Z.W.**, Building synapses: agrin and dystroglycan stick together. *TINS*, 17: 469–473 (1994).
- [22] **Tinsely J.M., Blake D.J., Zuellig R.A., and Davies K.E.**, Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 91:8307–8310 (1994).
- [23] **Campbell, K.P.**, Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton–extracellular matrix linkage. *Cell.* 80:675–679 (1995).
- [24] **James M., Man N.thi, Wise C.J., Jones G.E., and Morris G.E.**, A utrophin-glycoprotein complex in membranes of adherent cultured cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 33:163–174 (1996).
- [25] **Hatton G.I., Perlmutter L.S., Salm A.K and Tweedle C.D.**, Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary : implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides*, 5 : 121-138 (1984)
- [26] **Tweedle C.D. and Hatton G.I.**, Morphological adaptability at neurosecretory axonal endings on the neurovascular contact zone of the rat neurohypophysis. *Neurosciences*, 20 : 641-246 (1987).
- [27] **Hatton G.I.**, pituicytes, glia and control of terminal secretion. *J. Exp. Biol.*, 139 : 67-69 (1988).
- [28] **Murugaiyan P. and Salm A.K.**, Dehydration-induced proliferation of identified pituicytes in fully adult rats. *Glia*, 15 : 65-76 (1995).