

CHRISTINA TREMBLAY

**CARACTÉRISATION D'UN CANAL SODIQUE  
« DE FUITE » ESSENTIEL POUR LA DÉTECTION  
DU SODIUM DANS LES NEURONES DU MnPO**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en Neurobiologie  
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences(M.Sc.)

DÉPARTEMENT D'ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## RÉSUMÉ

Une majorité de neurones du noyau préoptique médian (MnPO) chez le rat sont sensibles aux variations de la concentration extracellulaire de sodium ( $\text{Na}^+$ ). L'objectif de cette étude était de déterminer le mécanisme cellulaire impliqué dans la détection du  $\text{Na}^+$  dans le MnPO. Pour étudier ce mécanisme, des enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés sur des neurones dissociés et des neurones présents dans une tranche de l'hypothalamus. On a d'abord démontré la présence de « senseurs » de  $\text{Na}^+$  dans les neurones du MnPO. Ensuite, on a déterminé que la détection du  $\text{Na}^+$  extracellulaire était spécifiquement attribuée à un flux d'ions  $\text{Na}^+$  à travers un canal de fuite bloqué par le rubidium. Les propriétés de ce canal étaient similaires à celles d'un canal sodique. Même si cela reste à confirmer, la présence d'ARNm codant pour le canal  $\text{Na}_x$  dans le MnPO fait de ce canal un candidat potentiel.

## ABSTRACT

A large neuronal population of the median preoptic nucleus (MnPO) of the rat has been shown to be sensitive to variations in the extracellular sodium concentration ( $[Na^+]_{out}$ ). The purpose of the present study was to determine the cellular mechanism underlying  $Na^+$  detection in the MnPO. This investigation was done with whole-cell patch clamp recordings in dissociated neurons and in neurons embedded in a brain slice. First, we demonstrated the presence of  $Na^+$  sensor neurons in the MnPO. We then determined that the detection of  $[Na^+]_{out}$  was achieved via a specific  $Na^+$  influx throughout a leak channel that was blocked by rubidium. Moreover, the leak channel properties were similar to those of a  $Na^+$  channel, but the identity of the leak channel remains to be clarified. However, the presence of  $Na_x$  channel mRNAs in MnPO neurons makes this channel a potential candidate.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tous les étudiants et tous les chercheurs qui m'ont apporté leur aide de près ou de loin durant ces deux années de recherche en électrophysiologie. Un merci spécial à mon directeur de recherche, Didier M. Mougnot, qui a su faire confiance à « une petite nouvelle » dans le laboratoire et m'aider à mener cette maîtrise à terme malgré de nombreux obstacles. Je veux également remercier Méline Henry-Nehmé qui m'a pratiquement tout enseigné sur les techniques en électrophysiologie en faisant preuve d'une grande patience et d'une grande disponibilité. Ses commentaires et ses connaissances sur le sujet ont été très utiles pour l'avancement de mon projet de recherche. Je veux également remercier Louis Nadeau pour ses suggestions et nos discussions animées qui ont contribué à éveiller mon intérêt pour la recherche et la neurobiologie tout au long de ma maîtrise.

Merci à Mohamed Chahine pour son temps et ses commentaires qui ont également permis à mon projet de maîtrise d'évoluer. Merci à Charles Bourque qui a pris l'initiative, cette année, de regrouper d'éminentes équipes de recherche canadiennes qui s'intéressent particulièrement aux mécanismes régulant l'homéostasie hydrominérale et à mon directeur de recherche, pour m'avoir donné la possibilité de participer à cette rencontre. Leurs commentaires et leurs questions ont été très utiles pour mon projet de recherche. Finalement, je veux remercier mon conjoint pour son support tout au long de ma maîtrise ainsi que mes parents pour leurs encouragements et pour leur aide quel que soient mes projets. J'aimerais finalement lever mon chapeau à tous ceux qui persévèrent malgré les difficultés et qui contribuent pas à pas à l'avancement des connaissances dans les nombreuses sphères de la recherche. N'était-ce pas Albert Einstein qui disait : « Ce qu'il y a de plus incompréhensible dans l'univers, c'est qu'il soit compréhensible. » ?

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>2</b>
1.0.1 Osmolarité, osmolalité et tonicité .....	4
1.0.2 Changements physiologiques régulant l'homéostasie hydrominérale...	5
1.1 Régions du CNS impliquées dans la détection du Na <sup>+</sup> et de l'osmolarité.....	6
1.2 Mécanismes centraux de détection du sodium.....	8
1.2.1 Sécrétion de taurine par les cellules gliales.....	9
1.2.2 Les canaux sensibles à l'étirement membranaire.....	11
1.2.3 Les récepteurs vanilloïdes.....	13
1.2.4 Les neurones senseurs de Na <sup>+</sup> .....	15
1.2.5 Libération de lactate par les cellules gliales.....	17
<b>2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....</b>	<b>20</b>
2.1 Hypothèse 1 : Les neurones du MnPO sont des senseurs de sodium.....	20
2.2 Hypothèse 2: Le mécanisme de détection du sodium dans les neurones du MnPO implique un canal sodique spécifique.....	21
<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>23</b>
3.1 Préparation des tranches de cerveau.....	23

3.2	Dissociation neuronale.....	24
3.3	Électrophysiologie.....	26
3.3.1	Enregistrement des neurones dissociés.....	26
3.3.2	Enregistrement de neurones dans une tranche de cerveau.....	28
3.4	Composition des solutions extracellulaires à tester.....	29
3.5	Protocole expérimental pour déterminer le potentiel d'inversion d'un courant ionique.....	30
3.6	Soustraction des courants de fuite.....	30
3.7	Analyse statistique.....	32
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>35</b>
4.1	Enregistrement de neurones dans une tranche de cerveau.....	35
4.1.1	Réponses à un stimulus hypotonique et hypertonique.....	35
4.1.2	Réponse à un stimulus hyperosmotique.....	38
4.1.3	Réponse au lactate.....	40
4.2	Enregistrement de neurones dissociés.....	42
4.2.1	Réponse à un stimulus hyperosmotique.....	42
4.2.2	Réponse à différentes concentrations en sodium.....	45
4.2.2.1	Potentiel d'inversion du courant induit par une solution hypotonique.....	47
4.2.2.2	Potentiel d'inversion du courant induit par des solutions hypertoniques.....	49
4.2.3	Tests de perméabilité.....	53
4.2.3.1	Ratio des courants générés par le Na <sup>+</sup> , le Li <sup>+</sup> et le CH <sub>6</sub> N <sub>3</sub> <sup>+</sup> ...53	
4.2.3.2	Utilisation de l'équation modifiée de Goldman-Hodgkin-Katz.....	56

4.2.4 Obstruction du canal par le rubidium.....	58
<b>5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....</b>	<b>62</b>
5.1 Spécificité des neurones du MnPO dans la détection du sodium .....	62
5.1.1 Sensibilité des neurones aux variations de la $[Na^+]_{ext}$ .....	62
5.1.2 Insensibilité des neurones du MnPO à un stimulus hyperosmotique..	63
5.1.3 Implication des cellules gliales dans la détection du $Na^+$ ?.....	65
5.2 Nature du courant généré par une variation de la $[Na^+]_{ext}$ .....	67
5.3 Caractéristiques du canal responsable du courant $Na^+$ étudié.....	68
5.4 Le canal sodique $Na_x$ , responsable du courant $Na^+$ étudié ?.....	69
<b>6. CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>89</b>

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## CHAPITRE 1 : Introduction générale

<b>FIGURE 1.1</b> – Projections schématiques entre les régions du CNS impliquées dans la détection du Na <sup>+</sup> et de l'osmolarité.....	7
<b>FIGURE 1.2</b> – Model de détection de l'osmolarité dans le SON.....	11
<b>FIGURE 1.3</b> – Détection de l'osmolarité par les SICs.....	12
<b>FIGURE 1.4</b> – Mécanisme d'osmorégulation par les TRPV1s.....	14
<b>FIGURE 1.5</b> – Model de détection du Na <sup>+</sup> dans le SFO.....	18

## CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes

<b>FIGURE 3.1</b> – Tissu recueilli ( <i>micropunch</i> ) dans la région du MnPO.....	24
<b>FIGURE 3.2</b> – Exemple d'un neurone dissocié du MnPO.....	26
<b>FIGURE 3.3</b> – Enregistrement d'un neurone en configuration « cellule entière ».....	28
<b>FIGURE 3.4</b> – Protocole expérimental pour générer des rampes de potentiel dépolarisant.....	31
<b>TABLEAU 1</b> – Description des agents pharmacologiques utilisés pendant les enregistrements des neurones dissociés du MnPO.....	33

## CHAPITRE 4: Résultats

<b>TABLEAU 2</b> – Comparaison de la perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine avec celle de référence pour les canaux sodiques.....	57
<b>FIGURE 4.1</b> – Réponse des neurones du MnPO à une solution hypotonique et hypertonique.....	37

<b>FIGURE 4.2</b> – Réponse des neurones du MnPO à une augmentation d’osmolarité extracellulaire.....	39
<b>FIGURE 4.3</b> – Réponse des neurones du MnPO au lactate.....	41
<b>FIGURE 4.4</b> – Réponse à un stimulus hyperosmotique.....	43
<b>FIGURE 4.5</b> – Courant généré par une solution hypotonique et hypertonique.....	46
<b>FIGURE 4.6</b> – Réponse d’un neurone dissocié du MnPO à un stimulus hypotonique.....	48
<b>FIGURE 4.7</b> – Réponse des neurones dissociés du MnPO aux stimuli hypertoniques.....	50
<b>FIGURE 4.8</b> – Comparaison entre les potentiels d’inversion expérimentaux du courant et ceux de référence pour les ions $\text{Na}^+$ .....	52
<b>FIGURE 4.9</b> – Perméabilité du canal étudié pour le lithium et la guanidine.....	54
<b>FIGURE 4.10</b> – Obstruction du canal par le rubidium.....	59

## **CHAPITRE 6: Conclusion générale**

<b>FIGURE 6.1</b> – Hypothèse de mécanisme cellulaire impliquant les canaux $\text{Na}_x$ dans la régulation de l’appétit pour le sel et de la diurèse.....	77
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>3<sup>e</sup>V</b>	troisième ventricule
<b>4-AP</b>	4-aminopyridine
<b>AC</b>	commissure antérieure
<b>aCSF</b>	fluide cérébrospinal artificiel
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>AVP</b>	arginine vasopressine
<b>CC</b>	corps calleux
<b>CdCl</b>	chlorure de cadmium
<b>Cl<sup>-</sup></b>	ion chlorure
<b>CNS</b>	système nerveux central « central nervous system »
<b>CsCl</b>	chlorure de césium
<b>CSF</b>	fluide cérébrospinal
<b>CVO</b>	organe circumventriculaire
<b>DRG</b>	ganglion de la racine dorsale
<b>E<sub>Na+</sub></b>	potentiel d'inversion du sodium
<b>FX</b>	fornix
<b>GlyR</b>	récepteur glycinergique

<b>HP</b>	potentiel de maintien « hold potential »
<b><math>\Delta I_x</math></b>	amplitude du courant généré par l'ion x
<b>KO</b>	« knock-out »
<b>Li<sup>+</sup></b>	ion lithium
<b>LT</b>	lame terminale
<b>MnPO</b>	noyau préoptique médian <b>vMnPO</b> : MnPO ventral
<b>Na<sup>+</sup></b>	ion sodium
<b>[Na<sup>+</sup>]<sub>ext</sub></b>	concentration extracellulaire de sodium
<b>NaCl</b>	chlorure de sodium
<b>OVLT</b>	organe vasculaire de la lame terminale
<b>PVN</b>	noyau paraventriculaire
<b>P<sub>x</sub></b>	perméabilité de l'ion x
<b>Rb<sup>+</sup></b>	ion rubidium
<b>SD ou DS</b>	déviation standard « standard deviation »
<b>SIC</b>	canal inactivé par l'étirement membranaire « stretch inactivated channel »
<b>SN</b>	système nerveux
<b>SON</b>	noyau supraoptique
<b>SFO</b>	organe subfornical

<b>TEA</b>	tétraéthylammonium
<b>TRPV ou VR</b>	« transient receptor potential vanilloid »
<b>TTX</b>	térodotoxine
<b>VR-OAC</b>	« vanilloid receptor-related osmotically activated channel»

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

« La meilleure odeur est celle du pain, le meilleur goût, celui du sel... » Cette citation de Graham Greene [Greene G, 1977], un écrivain anglais, montre que pour l'homme, le chlorure de sodium (NaCl), communément appelé sel, ne constitue pas seulement un nutriment essentiel, mais représente aussi un plaisir gustatif [Beauchamp GK, 1987]. Souvent à un tel point que la consommation quotidienne de sel, qui provient principalement des aliments préparés par les industries alimentaires, dépasse largement la quantité recommandée (6-7g de NaCl par jour) par l'Organisation mondiale de la santé [Meneton P, 2001]. En effet, le sel est un ingrédient prédominant de l'alimentation dans les sociétés industrialisées [Geerling JC, Loewy AD, 2008]. L'étude d'Ambard et son équipe a été la première à associer directement la surconsommation de sel à une augmentation des risques d'hypertension artérielle chez l'humain indépendamment du sexe, de l'indice de masse corporelle (IMC), de l'apport en potassium et de la consommation d'alcool [Ambard L, 1904].

L'hypertension a pour conséquence d'augmenter les risques d'accidents vasculaires cérébraux, de maladies coronariennes (infarctus, angine de poitrine, etc.) et de défaillances cardiaques [Burke and al., 1996; Riaz K, 1996; Whitworth JA, 2003]. Au Canada, des chercheurs ont montré qu'en limitant la consommation d'additifs alimentaires contenant du sodium, comme le benzoate ou le nitrite de sodium présent dans les plats préparés, on pourrait diminuer de 1 000 000 le nombre de Canadiens qui souffrent d'hypertension [Joffres and al., 2007]. Les consultations médicales et les coûts associés à cette maladie chuteraient de 6,5%. Le scientifique Pierre Meneton, chercheur à l'INSERM en France, va même jusqu'à attribuer la mort de 25 000 personnes et plus de 75 000 accidents cardiovasculaires chaque année, en France, à une surconsommation de sel [Meneton P, 2001].

Toutefois, même si la surconsommation de sel est néfaste, la présence de sodium ( $\text{Na}^+$ ) est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme, notamment pour le maintien de la

pression artérielle et pour la genèse des influx nerveux. Une privation de sodium à long terme peut causer des retards de croissance, une réduction de la masse musculaire, des problèmes de reproduction, des altérations dans la composition des os et d'autres pathologies qui vont devenir létales si la privation persiste [Orent-Keiles and al., 1937; Bursey and Watson, 1983; Fine and al. 1987]. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes qui régissent l'appétit pour le sel peut se révéler très utile pour aider à maintenir l'homéostasie hydrominérale de l'organisme et lutter contre certaines maladies cardiovasculaires, dont l'hypertension.

Ainsi, à court terme, une augmentation de la concentration en sodium dans les fluides corporels (plasma sanguin, fluide cérébrospinal (*CSF*)) cause une élévation du volume sanguin qui augmente la pression artérielle. Si cet état persiste et la tension augmente au-delà de 140/90 mm Hg (tension systolique/tension diastolique), on parle alors d'hypertension [Organisation mondiale de la santé, 2007]. Inversement, lorsqu'il y a une diminution de la concentration en sodium, la pression artérielle diminue. Si cette situation persiste et la tension diastolique descend sous le seuil de 90 mm Hg, on parle d'hypotension [Association médicale du Canada, 2003]. Ainsi, un déséquilibre au niveau de l'homéostasie hydrominérale peut être responsable des problèmes d'hypertension ou d'hypotension. De ce fait, la détection du sodium par le système nerveux central (CNS) est essentielle dans la régulation de l'homéostasie sodique qui permet de maintenir un volume sanguin adéquat. L'équilibre des fluides corporels est maintenu principalement par des ajustements dans l'ingestion et l'excrétion d'eau et de sodium. Ce contrôle de la quantité d'eau et de sodium est nécessaire pour maintenir un volume adéquat pour les fluides extracellulaires de l'organisme. Comme le sodium est le plus abondant soluté extracellulaire, il dicte principalement l'osmolarité des fluides extracellulaires [Verbalis, 2003]. En condition d'équilibre, cette osmolarité est maintenue autour de 290 mOsm/l et la concentration de sodium extracellulaire ( $[Na^+]_{ext}$ ) est d'environ 140 mM [Verbalis, 2003]. L'osmolarité extracellulaire est régi principalement par l'ingestion et l'excrétion d'eau tandis que le volume des fluides extracellulaires est directement proportionnel à la quantité de sodium dans l'organisme. Ainsi, le sodium doit être excrété pour diminuer le volume du plasma tandis qu'il doit être ingéré pour augmenter ce volume.

### 1.0.1 Osmolarité, osmolalité et tonicité

L'osmolarité est exprimée en osmole par litre (Osm/l) où une osmole réfère au nombre de particules dissoutes dans une solution. Il est à noter que l'osmolarité est généralement différente de la molarité qui désigne plutôt la quantité de matière de soluté (exprimé en mole) par unité de volume de solution (généralement exprimé en litre). Ainsi, pour les substances qui se dissocient lorsqu'elles sont en solution, comme le NaCl qui se dissocie en  $\text{Na}^+$  et en  $\text{Cl}^-$ , l'osmolarité est le nombre de particules libres multiplié par la molarité. L'osmolarité du NaCl est donc deux fois la molarité de la solution contenant du NaCl. Toutefois, pour les substances qui ne se dissocient pas dans le solvant, comme le glucose, la molarité et l'osmolarité sont les mêmes. On peut également exprimer le nombre d'osmoles dans une solution par kilogramme de solvant, ce qui définit l'osmolalité. Pour l'ensemble des liquides intra- et extracellulaires, chez la majorité des mammifères dont l'homme et le rat, l'osmolalité en condition normale se situe entre 280 et 300 mOsm/kg tandis que l'osmolarité se situe aux alentours de 290 mOsm/l [Kumar and Berl, 1998]. Ainsi, dans le cas des fluides de l'organisme, on utilise souvent le terme osmolalité ou osmolarité indifféremment.

L'osmolarité d'une solution est également reliée à sa tonicité. Celle-ci dépend de la concentration de solutés qui ne diffuse pas naturellement (par exemple, le NaCl) à travers la membrane cellulaire séparant les milieux intra- et extracellulaire. La tonicité est donc définie par la tendance d'une solution extracellulaire à résister à l'expansion du volume intracellulaire. De ce fait, lorsque la concentration en sodium de la solution extracellulaire augmente au-dessus de sa valeur physiologique (145 mM) (solution hypernatrémique), cela fait augmenter à la fois l'osmolarité et la tonicité. Cette solution est donc hyperosmotique ou hypertonique. Ainsi, une solution hypertonique extracellulaire va provoquer un mouvement d'eau de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule pour rétablir un équilibre osmotique entre le compartiment intra- et extracellulaire. Cela va avoir pour effet de diminuer le volume de la cellule tandis que le phénomène inverse va se produire avec une solution hypotonique extracellulaire qui va résulter en une augmentation du volume cellulaire [Guyton and Hall., 2003].

En effet, lorsque la concentration en sodium diminue en dessous de la valeur physiologique (solution hyponatriurique), cela fait diminuer à la fois l'osmolarité et la tonicité de la solution. Cette solution est donc hypo-osmotique ou hypotonique. Ainsi, des changements dans la concentration extracellulaire de sodium entraînent inévitablement des variations de l'osmolarité extracellulaire. Généralement, en condition d'homéostasie hydrominérale, la concentration des solutés non diffusibles et l'osmolarité sont égales de part et d'autre de la membrane cellulaire. On définit alors cette solution comme isotonique ou iso-osmotique.

### **1.0.2 Changements physiologiques régulant l'homéostasie hydrominérale**

Pour réguler l'homéostasie hydrominérale, il existe différents mécanismes physiologiques qui vont influencer la soif et l'appétit pour le sel. Par exemple, à court terme, la libération d'hormones comme l'arginine vasopressine (AVP) et l'aldostérone contrôle la diurèse et la natriurèse en diminuant le volume des urines et en régulant l'élimination de sodium à travers celles-ci [Skott, 2003]. À plus long terme, la sécrétion d'ocytocine (OT) inhibe l'appétit pour le sel ainsi que la soif [Marazziti, 2006]. On remarque également une augmentation de la production d'angiotensine II qui stimule la soif lors d'une diminution du volume sanguin (hypovolémie) [Fitzsimons, 1998]. La libération d'aldostérone sécrétée par les glandes surrénales et d'angiotensine II augmente également en condition de privation prolongée de sodium (hyponatrémie) [Okubo and al., 1997; Makhanova and al., 2006]. L'hyponatrémie est définie par une concentration en sodium dans le volume du plasma sanguin inférieure à 135 mM. Dans cette condition, l'eau passe du secteur extracellulaire à celui intracellulaire afin d'égaliser les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane cellulaire. Le phénomène inverse va se produire en condition d'hypernatrémie, définie par une augmentation de la concentration plasmatique de sodium au-dessus de 145 mM [Lassonde, 2005]. L'hypernatrémie implique donc une hypertonicité qui cause la déshydratation cellulaire.

La concentration intracérébrale de sodium est directement reliée à celle du plasma sanguin [Doi and al., 1992]. Ainsi, une augmentation de sodium dans le CSF stimule la soif [Andersson, 1978] et inhibe l'appétit pour le sel [Weisinger and al, 1982]. Par exemple, une injection intraveineuse d'une solution hypertonique de NaCl a causé une augmentation de

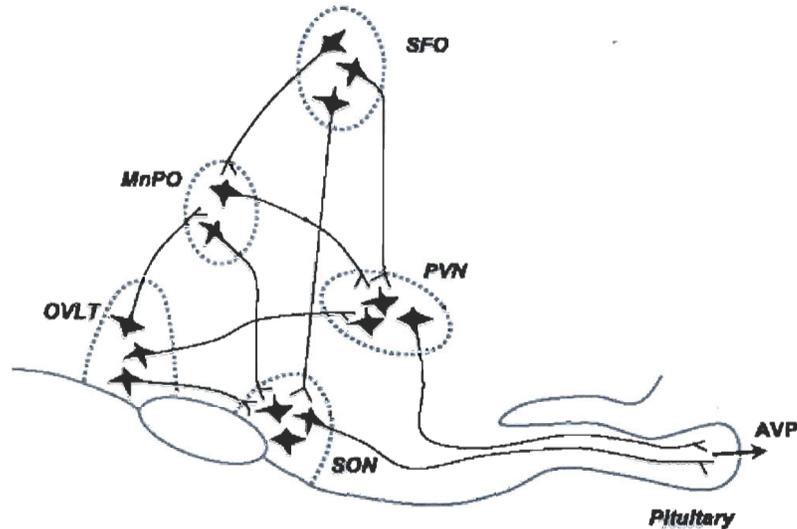
l'osmolarité du plasma sanguin et, conséquemment, de la concentration en sodium dans le CSF qui a stimulé la soif chez tous les chiens testés par Trasher et son équipe [Trasher and al., 1980]. De plus, l'injection d'une solution hypertonique dans le troisième ventricule cérébral ( $3^{\text{e}}$ V) a diminué significativement l'ingestion de sodium par des rats [Chiaraviglio and Perez Guaita, 1986] et des moutons [Weisinger and al., 1979] avec une carence en sel. En conséquence, la détection des changements de la concentration en sodium ainsi que de l'osmolarité dans le CSF est un élément important dans la régulation de la soif et de l'appétit pour le sel.

### 1.1 Régions du CNS impliquées dans la détection du $\text{Na}^+$ et de l'osmolarité

Les reins et le système nerveux central sont les deux plus importants sites impliqués dans la détection du sodium et de l'osmolarité qui est une étape primordiale pour le maintien de l'homéostasie hydrominérale [Orlov and Mongin, 2007]. Il est à noter que la détection du sodium extracellulaire est intimement liée à celle de l'osmolarité des fluides extracellulaires puisque des changements dans la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  provoquent également des variations dans l'osmolarité, tel que mentionné dans la section 1.0.1. Chez les mammifères, le CNS régule la prise d'eau et de sel par la libération de diverses hormones dans la circulation sanguine, dont l'AVP. Cette hormone est produite par les neurones magnocellulaires de deux noyaux hypothalamiques, le noyau supraoptique (SON) et le noyau paraventriculaire (PVN) qui projettent à l'éminence médiane dans la neurohypophyse. L'activité électrique de ces neurones est contrôlée par deux autres organes de l'hypothalamus, l'organe subfornical (SFO) et l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) via des projections excitatrices directes. L'activité de ces neurones magnocellulaires est également influencée par un autre noyau hypothalamique qui reçoit des afférences du SFO et de l'OVLT, le noyau préoptique médian (MnPO) qui innerve le PVN et le SON [Figure 1.1]. Ces cinq noyaux forment un réseau qui détecte les changements d'osmolarité et de sodium dans les fluides extracellulaires.

## Figure 1.1

### Projections schématiques entre les régions du CNS impliquées dans la détection du Na<sup>+</sup> et de l'osmolarité



© Hussy, Deleuze and al., 2000

Chacune des régions du CNS illustrée dans la figure 1.1 est en mesure de détecter les changements de la concentration en sodium dans le CSF ou le plasma sanguin par l'intermédiaire de différents mécanismes cellulaires. Diverses expériences ont montré l'importance de structures près de la partie antérieure de l'hypothalamus dans la régulation osmotique de la soif [Gardiner and Stricker, 1985; Johnson 1985], dans l'appétit pour le sel [Thunhorst and al., 1990], la natriurèse [Bealer, 1983; McKinley, 1992] ainsi que la sécrétion d'AVP contrôlant la diurèse [McKinley and al., 1987]. Ainsi, la région de la lame terminale (LT), qui forme la paroi antérieure du troisième ventricule, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie sodique [McKinley and al., 1999]. En effet, l'ablation complète de la LT produit une hypernatrémie qui résulte en une déshydratation chez beaucoup d'animaux (rats, chiens, chats, moutons et chèvres) [Andersson and al., 1975; Dorn and al., 1973; McKinley and al., 1982; Buggy and al., 1977; Rundgren and Fyhrquist, 1978; Thrasher and al., 1982; Mckinley and al., 1986]. La lame terminale est composée du MnPO et de deux organes circumventriculaires (CVOs) : le SFO et l'OVL. Ces deux CVOs sont des

structures dépourvues de barrière hématoencéphalique (BHE) et peuvent ainsi détecter directement les changements d'osmolarité ou de concentration en sodium dans le sang via plusieurs mécanismes impliquant des osmorécepteurs ou des senseurs de sodium [Ferguson and Bains, 1996]. De plus, les CVOs sont exposés à plusieurs hormones présentes dans la circulation sanguine, dont l'angiotensine II et l'AVP qui influencent la régulation de la soif et l'appétit pour le sel.

Les trois organes de la LT, le SFO, l'OVLT et le MnPO, sont connus pour détecter les changements dans la concentration en sodium ou dans l'osmolarité des fluides extracellulaires et ils sont également impliqués dans le réseau neuronal régulant la consommation d'eau. En effet, l'ablation de l'OVLT et du SFO chez le mouton résulte en une diminution du volume d'eau bu en réponse à un stimulus hypertonique (injection intraveineuse de 4 mM NaCl) [McKinley and al., 1998]. De même, les animaux ayant subi une lésion du MnPO boivent moins que ceux sans lésion en réponse à l'injection de NaCl. On remarque également une diminution de la sécrétion de vasopressine suite au stimulus hypertonique chez les rats dont le MnPO ou le SFO a été lésé [Mangiapane and al., 1983; Cunningham and al., 1992; Mangiapane and al., 1984]. En fait, ces trois régions de la lame terminale détectent les changements de tonicité des fluides corporels et envoient les signaux neuronaux appropriés pour maintenir l'homéostasie hydrominérale du corps. De plus, le SON et le PVN possèdent leurs propres mécanismes de détection de l'osmolarité dans le plasma ainsi que dans le CSF, ce qui montre la complexité du système du CNS impliqué dans la régulation hydrominérale.

## 1.2 Mécanismes centraux de détection du sodium

Il existe plusieurs mécanismes distincts pour la détection du sodium et de l'osmolarité dans le système nerveux (SN), dont certains impliquent uniquement les neurones et d'autres impliquent à la fois les cellules gliales et les neurones. En effet, les neurones peuvent réagir directement aux changements de concentration en sodium ou d'osmolarité du milieu extracellulaire. La détection du sodium ou de l'osmolarité est donc, dans certaines régions du CNS, une propriété intrinsèque des neurones. De plus, dans d'autres régions du CNS, les

cellules gliales impliquées dans la détection du sodium extracellulaire ou de l'osmolarité vont réagir à une diminution ou une augmentation de la concentration de sodium ou d'osmolarité en libérant une molécule spécifique qui va affecter différemment le potentiel de membrane des neurones. Il est à noter que même si l'osmolarité et la concentration extracellulaire de sodium sont inextricablement liées, les mécanismes de détection de l'une et de l'autre sont différents.

### **1.2.1 Sécrétion de taurine par les cellules gliales**

Le réseau de neurones magnocellulaires et de cellules gliales du SON et du PVN est un bon exemple de système intégré qui possède à la fois des détecteurs d'osmolarité et des effecteurs. En effet, la détection de l'osmolarité est une propriété intrinsèque des neurones du SON et du PVN qui libèrent l'ocytocine et l'AVP ayant pour effet d'inhiber l'appétit pour le sel [Brimble, 1978; Blackburn, 1993]. Le potentiel de membrane de ces neurones est également influencé par un neuromodulateur sécrété par les cellules gliales.

Ainsi, les cellules gliales du SON et du PVN réagissent à une diminution de l'osmolarité extracellulaire en libérant de la taurine, ce qui va affecter le potentiel de membrane des neurones [Hussy and al.,2000; Hussy and al.,2001]. La taurine est le deuxième plus abondant aminoacide du CNS (après le glutamate) et elle est connue pour son implication dans le maintien du volume cellulaire. En effet, c'est un osmolyte utilisé par les cellules pour compenser les changements d'osmolarité extracellulaire. Ainsi, sa libération permet de rétablir le volume initial des cellules gliales. La taurine est localisée principalement dans les cellules gliales de l'hippocampe [Torp and al.,1992], du thalamus et de l'hypothalamus [Decavel et Hatton, 1995].

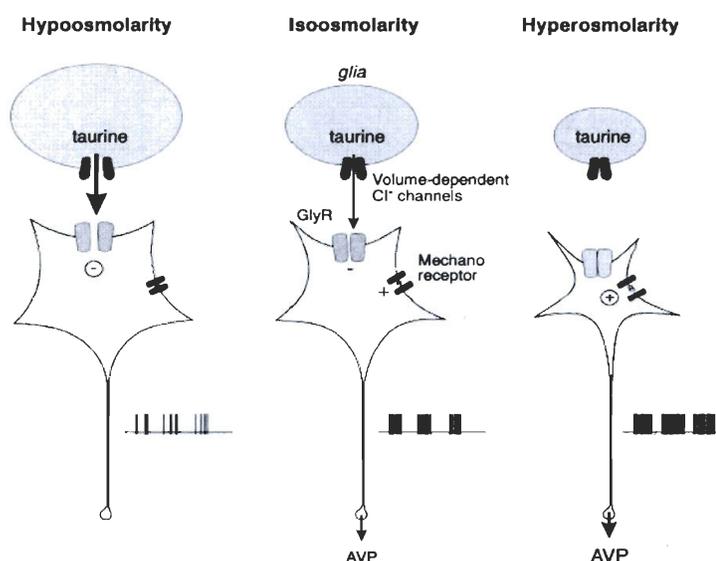
Comme en condition hypotonique, l'osmolarité du milieu extracellulaire est plus basse, l'eau pénètre massivement à l'intérieur des astrocytes (par osmose), ce qui a pour effet de faire augmenter le volume des cellules. Les cellules gliales libèrent donc de la taurine via leurs canaux anioniques activés par l'osmolarité (VR-OACs) et, de cette façon, retrouvent leur volume initial [Bres, Hussy and al., 2000]. Ils sont exprimés principalement dans les

cellules gliales du SON, du PVN et de la glande pituitaire [Mongin, 2007]. En effet, une réduction d'osmolarité de 5% à 7% augmente la libération de taurine de 10% à 25%, respectivement [Deleuze and al., 1998]. La taurine, relâchée près des neurones magnocellulaires dans le SON et le PVN, active des récepteurs glycinergiques neuronaux (GlyRs) qui laissent entrer les ions chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) à l'intérieur des neurones [Figure 1.2]. Cette entrée d'ions chlorures provoque donc une diminution du potentiel de membrane, c'est-à-dire une hyperpolarisation du neurone et, dans certains cas, une diminution des potentiels d'action. Ce phénomène a également été observé dans les neurones du MnPO, enregistrés dans une tranche de cerveau de rat, pendant l'application de  $1\mu\text{M}$  de taurine dans des conditions hyponatriuriques hypo-osmotiques [Thèse de Magali Grob (2005), données non publiées].

Ainsi, l'entrée d'ions chlorures dans les neurones, causée indirectement par l'application d'une solution extracellulaire hypo-osmotique, provoque donc une hyperpolarisation qui inhibe ou diminue la fréquence des potentiels d'action des neurones. Cette inhibition bloque la libération d'ocytocine, ce qui a pour effet d'augmenter l'appétit pour le sel. Dans des conditions hyperosmotiques hypernatriuriques, la libération de taurine est inhibée, car la diminution du volume des cellules gliales entraîne la fermeture des VR-OACs. Ainsi, les potentiels d'action des neurones ne sont plus inhibés par l'entrée d'ions chlorures. Ceci permet alors la libération d'ocytocine qui a pour effet d'inhiber l'appétit pour le sel. Toutefois, les cellules gliales ne sont pas les seules à détecter directement les changements d'osmolarité dans le SON.

## Figure 1.2

### Model de détection de l'osmolarité dans le SON



© Hussey, Moos and al. (2000)

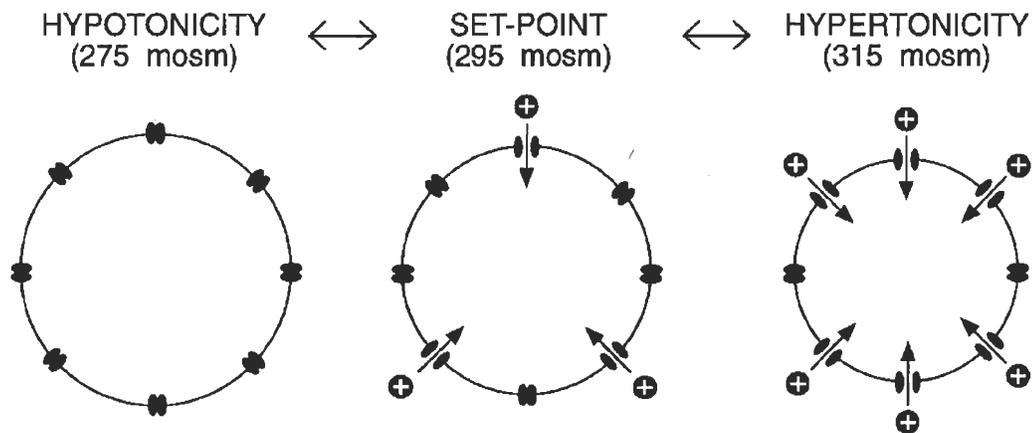
#### 1.2.2 Les canaux sensibles à l'étirement membranaire

La libération de taurine par les cellules gliales est un mécanisme à long terme qui a lieu lorsque le déséquilibre dans l'osmolarité perdure. Toutefois, à court terme, il existe un mécanisme pour la détection de l'osmolarité dans le SON. Ainsi, la détection de l'osmolarité dans ce noyau est une propriété intrinsèque des neurones. La présence de canaux cationiques sensibles à l'étirement membranaire (*stretch inactivated channels (SIC)*) dans les neurones magnocellulaires du SON a été reportée par Bourque et son équipe en 1993 [Oliet and Bourque, 1993]. En effet, lorsque le volume des cellules diminue dans des conditions d'hyper-osmolarité, ces canaux cationiques s'ouvrent [Figure 1.3] et font augmenter la fréquence de décharge du neurone [Bourque and al., 1994; Oliet and Bourque, 1997]. Inversement, en condition d'hypo-osmolarité, les SICs sont inactivés, car le volume des cellules augmente, ce qui a pour effet de faire diminuer l'excitabilité neuronale en hyperpolarisant la cellule [Oliet and Bourque, 1994]. Dans des conditions d'osmolarité normale (290 mOsm/l), seulement une certaine fraction des SICs sont ouverts et permettent

l'entrée de charges positives, tel que montré dans la figure 1.3. Les canaux cationiques inactivés par l'étirement ont donc des effets qui vont dans le même sens que ceux de la taurine. Ces deux systèmes permettent ainsi de moduler la sécrétion d'arginine vasopressine et d'ocytocine produites par les neurones du SON et du PVN [Figure 1.2]. En effet, en condition d'hyperosmolarité, la libération de ces deux hormones augmente tandis qu'elle est inhibée en condition d'hypo-osmolarité. Ceci a pour effet d'augmenter la concentration en sodium dans les urines et d'inhiber la consommation de sel dans des conditions d'hyperosmolarité et inversement, dans des conditions d'hypo-osmolarité.

**Figure 1.3**

**Détection de l'osmolarité par les SICs**



© Modifié de Oliet and Bourque (1997)

Les neurones magnocellulaires du SON et du PVN sont un bon exemple de système qui intègre à la fois les détecteurs d'osmolarité et les effecteurs, des hormones très importantes dans la régulation de l'homéostasie sodique (l'AVP et l'OT) libérées par ces neurones. Toutefois, il existe des neurones dans d'autres noyaux de l'hypothalamus qui sont impliqués dans l'homéostasie hydrominérale uniquement comme détecteur de sodium ou d'osmolarité.

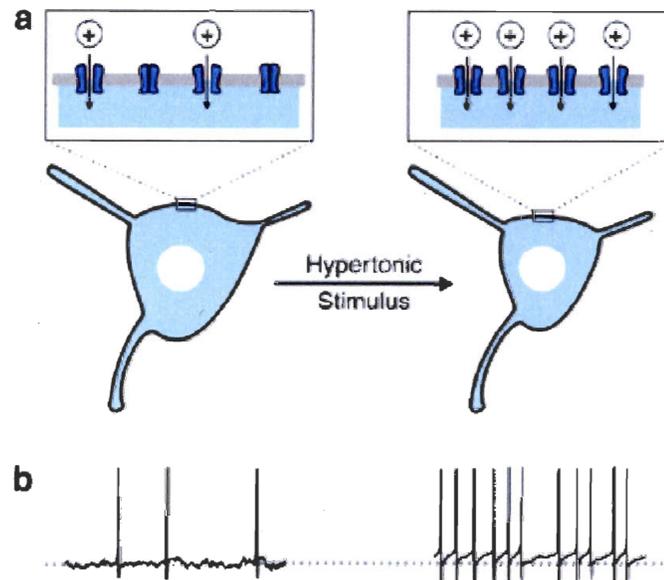
### 1.2.3 Les récepteurs vanilloïdes

Ainsi, dans les neurones de l'OVLT, la présence d'osmorécepteurs, dont les récepteurs vanilloïdes désignés par VR ou TRPV (*transient receptor potential vanilloid*), est primordiale pour répondre adéquatement aux changements d'osmolarité du milieu extracellulaire [Ciura and Bourque, 2006]. De cette façon, les osmorécepteurs de l'OVLT contribuent à la balance hydrominérale. Le mécanisme par lequel les osmorécepteurs détectent les stimuli osmotiques a été déterminé à partir de neurones de l'OVLT et du SON. Ainsi, en condition hyperosmotique, lorsque le volume du neurone diminue, ces osmorécepteurs, qui sont des canaux cationiques perméables au sodium, au potassium et au calcium [Zhang and Bourque, 2006], s'ouvrent [Naeini and Bourque, 2006]. Cela induit alors un courant entrant qui a pour effet de dépolariser le neurone et d'augmenter la fréquence de ses potentiels d'action. Inversement, en condition hypotonique (ou d'hypo-osmolarité), le volume de la cellule augmente et le canal se referme. Toutefois, les détails de ce mécanisme restent encore inconnus.

Les osmorécepteurs les plus connus de la famille des TRPVs sont les TRPV1s qui sont présents à la surface des nerfs sensitifs périphériques, dans diverses régions du cerveau dont l'OVLT et le SON ainsi que dans la moelle épinière. Les neurones de l'OVLT sont particulièrement sensibles à une augmentation d'osmolarité du milieu extracellulaire [Ciura and Bourque, 2006]. En condition hypertonique, lorsque l'osmolarité augmente, les TRPV1s présents dans les neurones laissent passer un courant entrant qui dépolarise la cellule et augmente la décharge des potentiels d'action [Figure 1.4]. Cette réponse peut être bloquée par le ruthénium rouge, un inhibiteur des canaux TRPVs. Également, les souris KO (*knock-out*) pour le gène codant pour le TRPV1 boivent beaucoup moins d'eau en réponse à une hypertonicité de leur système en comparaison avec les souris sauvages. De plus, contrairement aux neurones de l'OVLT des souris sauvages, les neurones des souris KO ne se dépolarisent pas en condition d'hypertonicité.

## Figure 1.4

### Mécanisme d'osmorégulation par les TRPV1s



© Sharif-Naeini, Bourque and al., 2008

Il existe également d'autres types de TRPVs, comme les TRPV2s [Muraki and al., 2003] et les TRPV4s [Wissenbach and al., 2000] qui sont activés par un stimulus hypotonique. Bien que ce phénotype soit l'inverse de celui des osmorécepteurs décrit ci haut, il s'agit toutefois de sous-classes de la famille des TRPVs. Les TRPV2s sont présents dans les *myocytes* de l'aorte et répondent à un étirement de la membrane cellulaire en laissant entrer du calcium à l'intérieur de la cellule [Liedtke, 2007]. Les TRPV4s sont, pour leur part, impliqués dans la régulation de la soif. En effet, les rats qui ont eu des injections intracérébroventriculaires de 4- $\alpha$ -PDD (*4alpha-phorbol didécanoate*), connu pour activer le TRPV4 [Tshusima and Mori, 2006], arrêtent de s'abreuver en eau. Également, l'inactivation du gène codant pour le TRPV4 diminue la libération d'AVP provoquée par un stimulus osmotique [Liedtker and Friedman, 2003]. Cependant, le mécanisme d'action des TRPV4s reste encore inconnu.

#### 1.2.4 Les neurones senseurs de Na<sup>+</sup>

La concentration en NaCl dans le CSF peut affecter directement les neurones de deux façons. Premièrement, comme on vient de le mentionner avec les osmorécepteurs TRPVs et les SICs, le changement d'osmolarité dû à une augmentation ou à une diminution de NaCl extracellulaire peut faire varier le potentiel de membrane des neurones et leur fréquence de décharges. Le NaCl étant le composant essentiel de tous les fluides biologiques et le plus abondant dans le CSF, il est également le plus apte à régir les changements d'osmolarité du milieu. De plus, des changements uniquement dans la concentration extracellulaire de sodium, et non dans l'osmolarité, peuvent être détectés par des neurones situés dans le MnPO [Grob and al, 2004]. Comme physiologiquement les variations dans la  $[Na^+]_{ext}$  entraînent toujours des variations dans l'osmolarité, tel que discuté précédemment, ces résultats ont été utilisés uniquement dans le but de définir plus spécifiquement le mécanisme d'action qui régit la détection du sodium dans ces neurones.

Ainsi, il existe des neurones senseurs de sodium en plus des osmorécepteurs. Cette constatation a été faite par Andersson et Olsson en 1973 qui ont observé que des injections de sodium dans le troisième ventricule induisait la sécrétion d'une hormone antidiurétique (ADH) et augmentait la soif, contrairement à l'injection de saccharides qui n'avait aucun effet [Andersson and Olsson, 1973]. De plus, Osborne et son équipe ont remarqué que l'injection d'une solution hypertonique (0.5 M) intraventriculaire chez le rat provoquait une augmentation du volume d'eau ingurgité plus grande que celle causée par une injection d'une solution de sucrose (0.7 M) isonatriurique [Osborne and al., 1987]. De ce fait, ils en ont conclu que la solution de sucrose activait seulement les neurones sensibles à l'osmolarité tandis qu'il devait aussi exister des neurones senseurs de sodium stimulés par la solution hypertonique.

Plus récemment, Grob et al., ont montré qu'une population neuronale du MnPO réagissait spécifiquement comme des senseurs de sodium [Grob and al., 2004]. En effet, l'application d'une solution hyperosmotique isonatriurique (330 mOsm/l et 145 mM NaCl) n'avait aucun effet sur les neurones du MnPO enregistrés sur des tranches de cerveau de rat. Cela leur a indiqué que ces neurones ne possédaient pas d'osmorécepteurs sensibles à une

augmentation d'osmolarité, causée par l'application de mannitol. Toutefois, un changement dans le potentiel de membrane de la majorité de ces neurones (70-75%) était perçu pendant l'application de solutions hypotoniques (100 mM NaCl) ou de solutions hypertoniques (170 mM NaCl). Ces solutions mimaient une variation de la concentration en sodium dans le CSF. La diminution du potentiel de membrane des neurones pendant l'application de la solution hypotonique était suffisante pour réduire leur fréquence de décharge et même inhiber leurs potentiels d'action. De façon opposée, l'application de la solution hypertonique avait pour effet d'augmenter le potentiel de membrane des neurones suffisamment pour provoquer une augmentation significative de la fréquence des potentiels d'action.

Afin de vérifier si la réponse des neurones à un changement de la concentration en sodium était causée par la présence de SICs, qui sont très perméables au sodium [Voisin and al., 1999], 100  $\mu$ m de gadolinium ( $Gd^{3+}$ ), connu pour bloquer ces mécanorécepteurs, a été appliqué en même temps qu'une solution hypotonique et hypertonique. Toutefois, l'application de gadolinium dans ces deux solutions ne changeait rien à la réponse. Ceci indique que les SICs ne sont pas responsables de la détection du sodium dans le MnPO. Cette étude a donc démontré la capacité des neurones du MnPO à détecter les changements de la concentration en  $Na^+$  indépendamment de l'osmolarité du milieu extracellulaire et de l'étirement membranaire de la cellule.

Elle a également mis en évidence l'insensibilité des neurones du MnPO aux ions chlorures en remplaçant le NaCl par du  $Na^+$ -gluconate dans la solution mimant le CSF. En effet, l'application de  $Na^+$ -gluconate ne changeait rien à la réponse observée. De plus, l'application de choline chloride sur ces neurones ne provoquait aucune modification du potentiel de membrane. D'autre part, les réponses de ces neurones aux changements de concentration en sodium étaient indépendantes du potentiel et n'étaient pas bloquées par la TTX (*tétradotoxine*). Suite à ces résultats, Grob et al. ont émis l'hypothèse que la détection du sodium dans les neurones du MnPO pourrait se faire via un canal sodique atypique indépendant du voltage et résistant à la TTX : le canal  $Na_X$ . En effet, les caractéristiques du canal qu'ils ont étudié sont comparables avec les propriétés du canal  $Na_X$  détecté dans les

neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG) [Hiyama and al., 2002]. De plus, des ARN messagers codant pour le canal sodique  $\text{Na}_x$  ont été observés dans les neurones du MnPO à l'aide de la technique d'hybridation in situ [Grob and al, 2004].

### 1.2.5 Libération de lactate par les cellules gliales

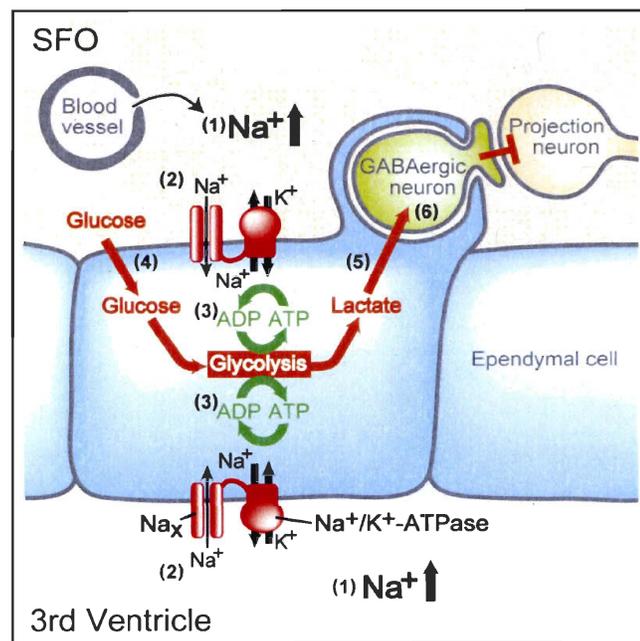
En plus des senseurs de sodium dans le MnPO, il existe également des cellules gliales dans le SFO qui détectent l'augmentation de la concentration en sodium dans le CSF à l'aide d'un canal sodique spécifique. Ces cellules gliales libèrent du lactate qui va affecter le potentiel membranaire des neurones du SFO. En effet, Noda et son équipe ont récemment publié une étude sur ce mécanisme relativement complexe [Noda and al., 2007]. Ainsi, certaines cellules du SFO, dont les astrocytes et les cellules épendymaires, possèdent des canaux sodiques de type  $\text{Na}_x$  qui sont spécialisés dans la détection du sodium extracellulaire. Ces canaux sont formellement appelés  $\text{NaG/SCL11}$  (chez le rat),  $\text{Na}_v2.3$  (chez la souris) et  $\text{Na}_v2.1$  (chez les humains) et sont classés comme une sous-famille des canaux sodiques dépendants du voltage [Goldin and al., 2000]. On retrouve principalement les canaux  $\text{Na}_x$  dans les ganglions de la racine dorsale, les organes circumventriculaires du cerveau, dont le SFO, le MnPO ainsi que l'OVLT, et la glande pituitaire postérieure [Watanabe, Noda and al., 2006]. Ces canaux laissent entrer le sodium à l'intérieur des cellules gliales du SFO lorsque la concentration extracellulaire de  $\text{Na}^+$  dépasse celle physiologique (145 mM) [Figure 1.5 (1)]. Ceci active la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui consomme alors davantage d'ATP pour faire sortir le sodium de la cellule [Figure 1.5 (3)]. De ce fait, le mécanisme de glycolyse est augmenté dans cette cellule ainsi que l'entrée de glucose pour produire plus d'ATP [Figure 1.5 (4)]. Finalement, le lactate, qui est un produit résiduel de cette glycolyse, est relâché par les cellules gliales et capté par les neurones avoisinants, dont les neurones GABAergiques [Figure 1.5 (5)].

Le lactate a alors pour effet de faire augmenter la fréquence de décharge des neurones GABAergiques via la production d'ATP, ces neurones étant possiblement reliés à d'autres neurones impliqués dans la régulation de l'appétit pour le sel. L'augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP va donc bloquer les canaux potassiques dépendants de l'ATP ( $K_{ATP}$  channel), ce qui va avoir pour effet de dépolariser la cellule. Il est à noter que

les cellules épendymaires de la figure 1.5 peuvent aussi bien être remplacées par des astrocytes et que le mécanisme complet, décrit ci-haut, a seulement été testé, jusqu'à présent, dans le SFO. Ainsi, la présence de canaux  $\text{Na}_x$  est primordiale dans les cellules gliales du SFO pour la libération de lactate qui produit une augmentation de l'activité électrique des neurones GABAergiques. En effet, les neurones GABAergiques des souris KO pour le gène  $\text{Na}_x$  ne présentent aucun changement dans la fréquence de leurs potentiels d'action lorsque la concentration extracellulaire de sodium augmente contrairement aux souris sauvages. Cependant, l'application de 1 mM de lactate augmente la fréquence de décharge des neurones du SFO de ces souris KO de la même manière que pour les souris sauvages.

**Figure 1.5**

**Model de détection du sodium dans le SFO**



© Modifié de Noda, Chimizu and al. (2007)

## **CHAPITRE 2**

### **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE**

## 2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Ces recherches démontrent la multiplicité des mécanismes de détection du sodium dans différentes structures de l'hypothalamus et l'implication du MnPO dans la régulation de l'homéostasie hydrominérale. Ce noyau est en mesure de détecter des changements dans la concentration extracellulaire de sodium du CSF. Cependant, le mécanisme impliqué dans cette détection reste encore à être élucidé. C'est pourquoi, l'objectif général de ce mémoire de maîtrise est d'étudier le mécanisme de détection du sodium présent dans le MnPO. Comme il a été mentionné dans le chapitre 1, ce noyau est une structure importante de la LT. Il est situé dans un endroit stratégique, dans la région périventriculaire antéroventrale du troisième ventricule (AV3V), et s'étend du SFO à la partie dorsale de l'OVLTL [Zadetto-Smith and Johnson, 1995; McKinley and al., 2003]. Le MnPO reçoit des afférences de ces deux CVOs et envoie des projections vers d'autres noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie hydrominérale. Il joue le rôle d'un centre intégrateur dans l'osmorégulation et dans la régulation de comportements qui régissent la soif et l'appétit pour le sel. En effet, l'activité des neurones de rats privés d'eau pendant 24h augmente dans le MnPO et dans d'autres structures du cerveau interconnectées avec ce noyau (l'OVLTL, le SON, le PVN et, dans une moindre mesure, le SFO) [McKinley, Hards, Oldfield, 1994]. Ainsi, ces cinq régions forment un réseau de communication complexe impliqué dans la réponse homéostasique hydrominérale dont le relais central est le MnPO.

### 2.1 Hypothèse 1 : Les neurones du MnPO sont des senseurs de sodium

Le MnPO est également directement impliqué dans la détection du sodium extracellulaire. En effet, l'injection de 1.5M de NaCl intrapéritonéale chez le rat produisait une augmentation de l'excitabilité d'une certaine population de neurones dans le MnPO [Aradachi and al., 1996]. Bien que les chercheurs attribuaient cette réponse à un changement de l'osmolalité du plasma, l'étude de Grob et al. a montré que les neurones du MnPO étaient plutôt affectés spécifiquement par la concentration en sodium et non par l'osmolarité du CSF [Grob and al., 2004]. Suite à ces recherches, on a voulu déterminer si les « senseurs » de sodium du MnPO étaient présents sur les neurones ou sur les cellules gliales. Ainsi, on a défini la spécificité des neurones du MnPO pour la détection de la

$[Na^+]_{ext}$  en faisant des enregistrements électrophysiologiques dans des tranches de cerveau de rat. On a alors déterminé si le même neurone répondait à la fois à un stimulus hypotonique et hypertonique. De plus, comme Noda l'a démontré dans le SFO, il serait probable que les cellules gliales détectent les changements de sodium via le canal  $Na_x$  et qu'elles signalent cette information aux neurones en libérant du lactate [Noda and al., 2007]. C'est pourquoi on a déterminé si les cellules gliales étaient impliquées dans la réponse au sodium en appliquant du lactate sur les neurones du MnPO.

## **2.2 Hypothèse 2: Le mécanisme de détection du sodium dans les neurones du MnPO implique un canal sodique spécifique**

Comme les études précédentes montrent que les neurones du MnPO se dépolarisent pendant l'application d'une solution hypertonique et s'hyperpolarisent pendant l'application d'une solution hypotonique, on a procédé à des enregistrements électrophysiologiques sur des neurones dissociés du MnPO afin d'étudier la nature du courant généré par les changements dans la  $[Na^+]_{ext}$ . On a alors déterminé si la réponse à diverses concentrations en sodium était causée uniquement par un flux d'ions sodium ou si d'autres types d'ions étaient impliqués. Ces enregistrements avaient aussi pour but de caractériser le canal responsable de la réponse au  $Na^+$  en mesurant sa perméabilité à divers ions. En effet, Grob et al. avaient émis l'hypothèse que des canaux sodiques atypiques indépendants du potentiel, possiblement les canaux  $Na_x$ , seraient responsables de la détection du sodium dans les neurones du MnPO.

# CHAPITRE 3

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Toutes les expériences ont été faites en accord avec les normes établies par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et ont été approuvées par le Comité de protection des animaux du Centre hospitalier universitaire de Québec (CPACHUQ).

#### 3.1 Préparation des tranches de cerveau

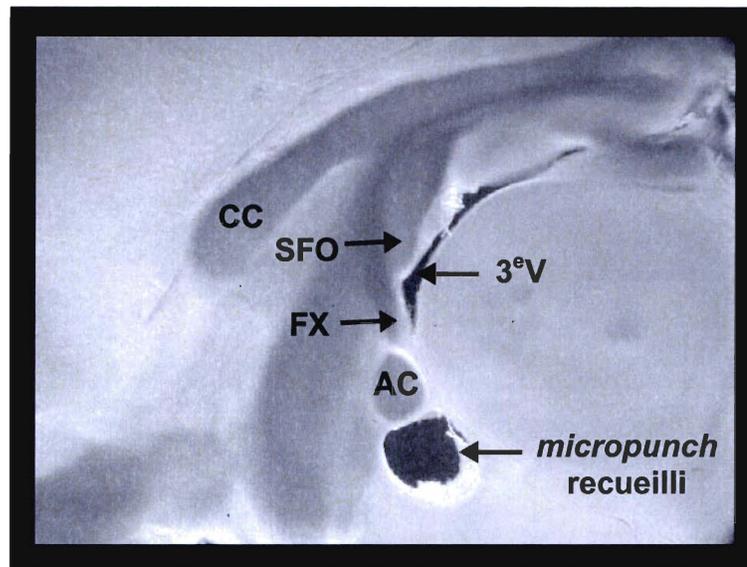
Des tranches de cerveau de rat ont été récoltées afin d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques dans la région du MnPO. Dans un premier temps, les enregistrements ont été faits sur une tranche de tissu neuronal spécifique et, dans un deuxième temps, sur des neurones complètement dissociés à partir de ces mêmes tranches. Ainsi, de jeunes rats Wistar mâles (d'environ 100 g) ont été profondément anesthésiés avec une solution de kétamine-xylozine (respectivement 43,7 et 1,25 mg/kg) injectée intrapéritonalement. Après la décapitation, le cerveau a été rapidement enlevé et immergé dans une solution glacée (à 2° C) enrichie en succrose et oxygénée constamment avec un mélange gazeux (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). La composition de cette solution était la suivante (en mM) : 200 succrose, 2 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 D-glucose et 1 CaCl<sub>2</sub> (avec un pH d'environ 7.4). Ensuite, un bloque de tissu neuronal de la région antérieure du cerveau a été monté sur une plate-forme métallique et placé dans un vibratome (VT 1000S; Leica, Nussloch, Allemagne) contenant la solution enrichie en succrose très froide et oxygénée. Une tranche de cerveau contenant le MnPO et coupée sagittalement a alors été recueillie.

Pour la première série d'expériences, une tranche de 350 µm d'épaisseur a été déposée directement dans une chambre d'enregistrement (Warner Instruments Inc., Hamden, CT) sous le microscope. Elle était continuellement submergée dans une solution isotonique oxygénée (O<sub>2</sub>) à température ambiante (20-24°C) mimant le fluide cérébro-spinal (aCSF). Cette solution contenait (en mM) : 145 NaCl, 3.1 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub> et 10 HEPES avec un pH de 7.4 ajusté avec du NaOH 10M et une osmolarité entre 295-305 mOsm/l. Cette tranche a reposé de 20 à 30 minutes dans cette chambre avant le commencement des enregistrements électrophysiologiques.

Pour la deuxième série d'enregistrements, on a fait une microdissection (*micropunch*) dans la région ventrale du MnPO à partir d'une tranche sagittale de 390  $\mu\text{m}$  d'épaisseur récemment coupée. Ainsi, seulement la région située directement en dessous de la commissure antérieure a été récoltée pour faire des enregistrements sur des neurones dissociés [Figure 3.1].

### Figure 3.1

#### Tissu recueilli (*micropunch*) dans la région du MnPO



**Figure 3.1 :** Photo d'une tranche sagittale de cerveau de rat montrant le tissu recueilli dans la région du MnPO en dessous de la commissure antérieure (AC) près du troisième ventricule (3<sup>e</sup>V). Le corps calleux (CC), l'organe subfornical (SFO) et le fornix (FX) sont également visibles sur cette photo.

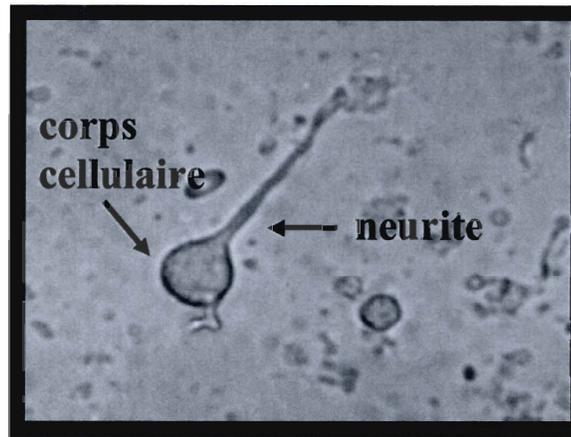
### 3.2 Dissociation neuronale

L'obtention de neurones dissociés à partir du tissu recueilli s'est faite en deux étapes : 1) une dissociation chimique du micropunch dans 0,9 ml de solution PIPES et 0,1 ml de pronase (1 mg/ml) oxygéné à 37°C pendant 10 minutes selon la méthode utilisée

précédemment pour dissocier ce type de neurones [Kolaj and Renaud, 2001]. La composition de la solution PIPES était la suivante (en mM) : 120 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 PIPES et 10 D-Glucose. Le pH de la solution a été ajusté à 7.4 avec du HCl (1M) et son osmolarité a été ajusté entre 295 et 300 mOsm/l avec du mannitol. Ensuite, le tissu a été transféré dans 1 ml de solution PIPES oxygénée à 37°C contenant 0,2 mg de BSA (Sigma), pendant 15 minutes afin d'optimiser la survie des neurones. Afin de compléter la dissociation chimique, on a transféré les neurones dans une solution composée de 0,1 ml de thermolysine (1 mg/ml) et de 0,9 ml de solution PIPES oxygénée à 37°C pendant 10 minutes. 2) Une dissociation mécanique du tissu s'est faite par trituration à l'aide de quatre pipettes Pasteur en verre poli possédant des bouts de plus en plus effilés. Après ces 2 étapes, une solution laiteuse contenant les neurones dissociés de la région ventrale du MnPO [Figure 3.2] a été placée directement sur des lamelles de verre recouvertes de gélatine (2%) dans la chambre d'enregistrement à la température de la pièce (20°C-23°C) pendant 15 minutes pour permettre aux neurones de bien adhérer sur la lamelle.

## Figure 3.2

### Exemple d'un neurone dissocié du MnPO



**Figure 3.2 :** Photo d'un neurone dissocié du MnPO composé de son corps cellulaire et d'un neurite. Les neurones dissociés sélectionnés pour l'enregistrement électrophysiologique ne possédaient soit aucun neurite ou, dans la majorité des cas, un ou deux neurites.

### 3.3 Électrophysiologie

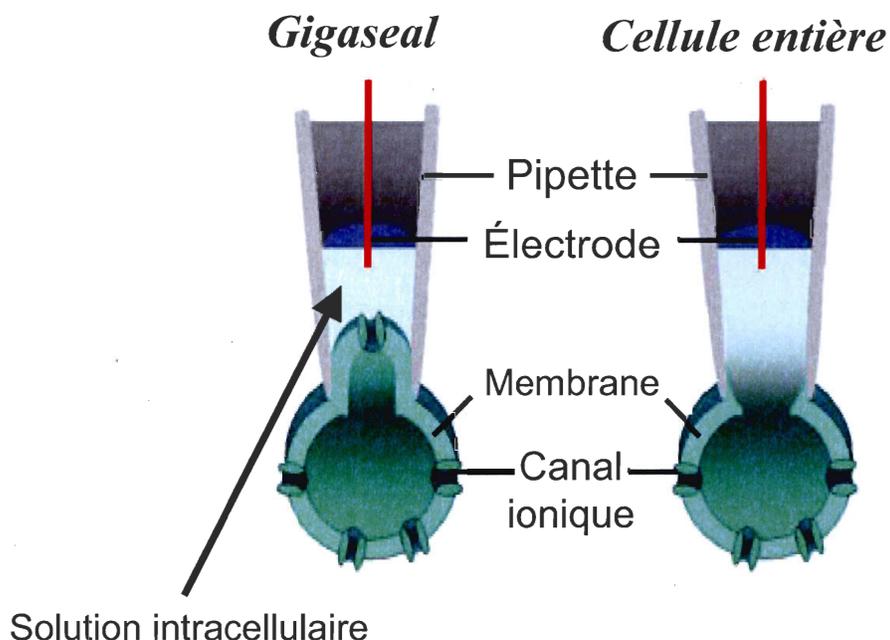
#### 3.3.1 Enregistrement des neurones dissociés

L'enregistrement électrophysiologique des neurones dissociés a été effectué à la température ambiante. La pipette de verre entourant l'électrode d'enregistrement a été faite à partir d'un tube de verre très mince (diamètre extérieur : 1.5 mm et diamètre intérieur : 1.1 mm) en borosilicate à l'aide d'une machine pour fabriquer les pipettes (vertical puller, model PIP5, Heka Elektronik). Les pipettes fabriquées avaient une résistance mesurée dans la solution extracellulaire d'environ 4-5 M $\Omega$  et étaient remplies d'une solution intracellulaire composée de (en mM) : 100 NaCl, 5 HEPES, 0.003 Na<sup>+</sup>-GTP, 0.4 Na<sup>+</sup>-ATP, 5 TEACl et 25 CsCl (pH à 7,3 ajusté avec du KOH 1M et osmolarité entre 295-305 mOsm/l ajusté avec du sorbitol). La TEA et le césium (Cs) étaient ajoutés pour bloquer des canaux spécifiques [Tableau 1]. La jonction entre le neurone et l'extrémité de la pipette (*gigaseal*) ainsi que la configuration en cellule entière [Figure 3.3] ont été obtenues dans

une solution extracellulaire isotonique oxygénée, composée de (en mM) : 145 NaCl, 3.1 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 D-Glucose et 2.4 CaCl<sub>2</sub>. Le pH de la solution a été ajusté autour de 7.35 avec du NaOH (10M) et l'osmolarité entre 295-305 mOsm/l avec du mannitol. Le potentiel de jonction a été calculé pour toutes les solutions appliquées et il a été soustrait des potentiels d'inversion observés pour l'analyse des résultats. La capacitance rapide de l'électrode (*c-fast*) a d'abord été compensée et, après avoir obtenu la configuration « cellule entière », la capacitance lente (*c-slow*) ainsi que la résistance en série (*G-series*) ont été ajustées correctement. Les enregistrements en « cellule entière » ont été effectués en mesurant le courant en mode potentiel imposé (*Voltage-Clamp*) en utilisant un amplificateur EPC8 (Heka Elektronik). Les signaux d'enregistrement ont été filtrés à 1 kHz. Les neurones possédant un courant de fuite au début de l'enregistrement inférieur à -80 pA n'ont pas été retenus dans les résultats. Les neurones ont été maintenus à un potentiel de membrane près de leur potentiel de repos et la valeur moyenne de la résistance des neurones à ce potentiel de membrane étaient de  $1,0 \pm 0,7 \text{ G}\Omega$  et celle de la capacitance était de  $26,8 \pm 3,0 \text{ pF}$ .

## Figure 3.3

### Enregistrement d'un neurone en configuration « cellule entière »



**Figure 3.3 :** L'illustration de droite montre la configuration de base (« cellule attachée ») obtenue avec la technique du *patch-clamp* pour effectuer des enregistrements électrophysiologiques. Le passage à la configuration « cellule entière » se fait en appliquant une pression négative dans la pipette pour rompre le fragment de membrane présent dans la pipette.

#### 3.3.2 Enregistrement de neurones dans une tranche de cerveau

L'enregistrement électrophysiologique en cellule entière des neurones du MnPO dans une tranche sagittale de cerveau s'est effectué dans la partie ventrale du noyau pré-optique médian (vMnPO) qui s'étend du bas de la commissure antérieure jusqu'à l'organe

vasculaire de la lame terminale. Le même type de pipettes de verre décrit pour les neurones dissociés a été utilisé pour effectuer les enregistrements. Toutefois, la pipette contenait une solution intracellulaire différente composée de (en mM) : 130 K-Gluconate, 6 NaCl, 10 HEPES, 0.3 Na<sup>+</sup>-GTP, 4 Na<sup>+</sup>-ATP et 10 EGTA, le pH a été ajusté à 7,2 avec du KOH 1M et l'osmolarité ajustée à 295-305 mOsm/l avec du sorbitol. La configuration « cellule entière » a été obtenue dans la solution extracellulaire mentionnée dans la section 3.1. Les capacitances (*fast* et *slow*) ainsi que la résistance en série de l'électrode et de la cellule ont été ajustées correctement de la même manière que pour les neurones dissociés. Toutefois, les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués en mesurant le changement de potentiel membranaire en mode de courant imposé (*Current-Clamp*). Le courant a été ajusté pour maintenir le neurone près de son potentiel de repos à -60 mV. Les signaux d'enregistrement ont été filtrés à 3,5 kHz. Le potentiel de jonction a également été calculé et soustrait automatiquement du potentiel de membrane observé.

### 3.4 Composition des solutions extracellulaires à tester

Pour étudier les effets de la réponse des neurones dissociés du MnPO aux variations de la  $[Na^+]_{ext}$ , trois solutions contenant respectivement 50 mM, 150 mM et 180 mM de NaCl ont été testées suite à l'application d'une solution témoin contenant 100 mM de NaCl. Les autres composés et leur concentration étaient similaires dans ces 3 solutions oxygénées (en mM) : 10 HEPES, 10 TEACl, 5 D-glucose, 3.5 CsCl, 3.1 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1 4-AP, 0.3 CdCl et 0.0005 TTX. Le TEACl, le CsCl, la 4-AP, le CdCl et la TTX étaient ajoutés pour s'assurer d'enregistrer uniquement le courant causé par des variations de NaCl (voir tableau 1). Pour améliorer l'efficacité des agents pharmacologiques ci-dessus, la solution témoin a été appliquée au moins 5 minutes avant le début des enregistrements sur chaque neurone. Le pH des solutions a été ajusté entre 7.3 et 7.4 avant de mesurer l'osmolarité à l'aide d'un osmomètre VAPRO (*vapor pressure*, Wescor). Celle-ci a été ajustée à  $300 \pm 5$  mOsm/l pour les solutions avec moins de 145 mM NaCl en ajoutant du mannitol. L'application respective des différentes solutions extracellulaires dans la chambre d'enregistrement s'est faite à l'aide d'un contrôleur RSC-160 (*Rapid Solution Changer*, Bio Logic).

Pour étudier le changement du potentiel de membrane des neurones du MnPO dans une tranche de cerveau induit par des changements de la concentration extracellulaire, trois types de solutions ont été testés. Ainsi, une solution hypotonique contenant 100 mM NaCl (270 mOsm/l) et une solution hypertonique contenant 170 mM NaCl (330 mOsm/l) ont été successivement appliquées. L'application du CSF artificiel contenant 145 mM NaCl (300 mOsm/l) a été faite avant et après chacune des solutions testées pour vérifier le retour de la réponse. Les autres composés des solutions restaient les mêmes (en mM) : 3.1 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub> et 10 HEPES (pH de 7.4). Ensuite, pour tester l'effet d'une augmentation d'osmolarité sur les neurones enregistrés en tranche, on a ajouté du mannitol dans le CSF artificiel afin d'avoir une solution hyperosmotique de 330 mOsm/l.

### 3.5 Protocole expérimental pour déterminer le potentiel d'inversion d'un courant ionique

Afin de trouver le potentiel d'inversion expérimental du courant généré dans les neurones dissociés ( $E_{Na^+}$ ) par un changement de la  $[Na^+]_{ext}$ , on a généré une rampe de potentiel dépolarisant de -60 mV à +20 mV (16 mV/sec) pendant l'application de la solution témoin (100 mM NaCl) et au maximum du courant entrant pendant l'application des solutions hypertoniques [Figure 3.4]. De façon similaire, une rampe de potentiel de -30 mV à +20 mV (16 mV/sec) a été générée pendant l'application de la solution témoin et au maximum du courant sortant généré par l'application de la solution hypotonique. Chaque solution était appliquée en moyenne 3 à 4 minutes. La solution témoin était appliquée avant et après les solutions hypotonique ou hypertoniques pour vérifier le retour de la réponse.

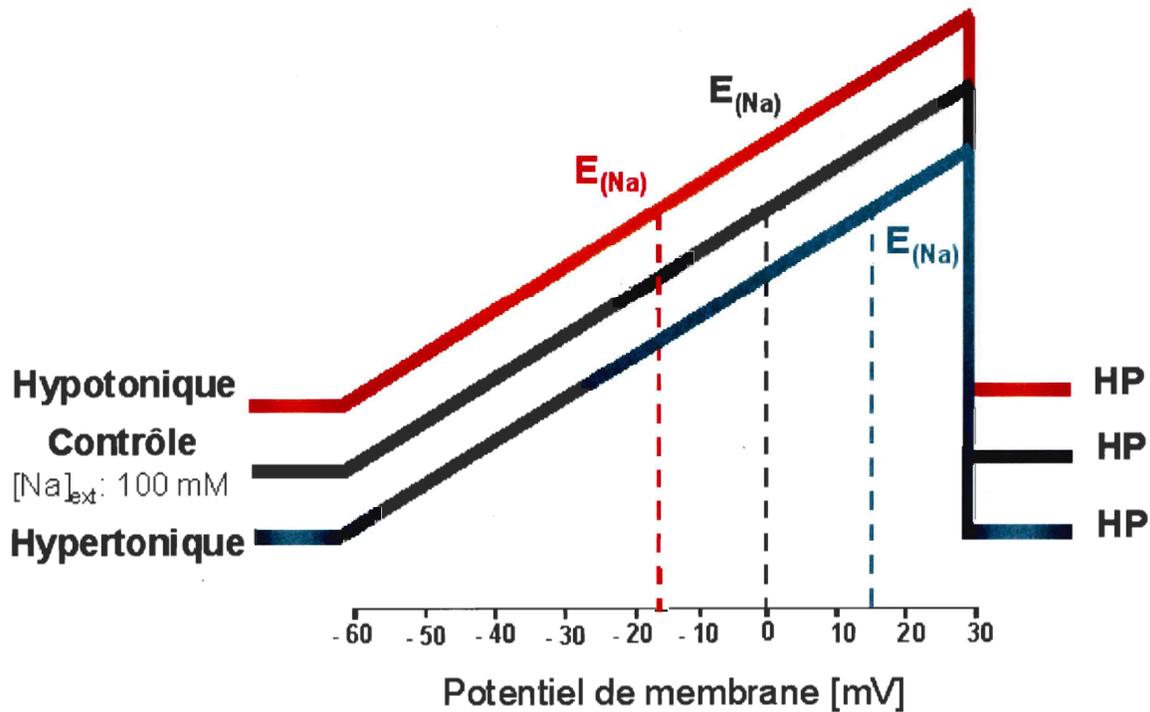
### 3.6 Soustraction des courants de fuite

Comme notre hypothèse de travail privilégie un courant de fuite particulier activé par la variation de la  $[Na^+]_{ext}$ , la valeur des courants de fuite totaux (*leak currents*) n'a pas été soustraite automatiquement en utilisant un protocole de soustraction des courants de fuite. Toutefois, l'amplitude des courants de fuite, qui ne variait pas pendant l'application des solutions testées, a pu être soustraite des rampes de potentiel générées pendant l'application des solutions avec différentes concentrations extracellulaires de sodium. Ainsi, pour

vérifier l'hypothèse selon laquelle le courant modulé par la  $[Na^+]_{ext}$  était porté par des ions sodium, les courants de fuite non étudiés ont été soustraits artificiellement en faisant croiser la rampe de potentiel générée pendant la solution témoin au potentiel d'inversion théorique du sodium. De cette façon, on a pu vérifier si le potentiel d'inversion expérimental du courant généré pendant l'application de solutions avec différentes concentrations de NaCl correspondait au potentiel d'inversion théorique du  $Na^+$ .

**Figure 3.4**

**Protocole expérimental pour générer des rampes de potentiel dépolarisant**



**Figure 3.4 :** Rampes de potentiel dépolarisant générées pendant l'application de solutions hypotonique (50 mM NaCl) et hypertoniques (150 mM ou 180 mM NaCl) en comparaison avec une rampe générée pendant l'application de la solution témoin (100 mM NaCl). Le décalage entre les rampes est causé par l'augmentation ou la diminution de courant selon les différentes  $[Na^+]_{ext}$  appliquées. Les sections horizontales des rampes représentent le courant présent au potentiel de membrane imposé (HP, *hold potentiel*) au neurone dès le début de l'enregistrement.

### 3.7 Analyse Statistique

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  la déviation standard (SD). La forme de la distribution des résultats, Gaussienne ou non, a été déterminée à l'aide de deux tests statistiques : le test de Kolmogorov-Smirnov (avec la correction pour la valeur de P de Dallal-Wilkinson-Lilliefors) ainsi que le test de normalité omnibus de D'Agostino et Pearson ( $p < 0,05$ ). Après avoir vérifié que la distribution des résultats était Gaussienne, un t-test (*one-sample Student's t test*) a été utilisé pour savoir si la moyenne expérimentale des variables mesurées (potentiel d'inversion, perméabilité) était comparable à une valeur de référence déterminée. Un t-test (*paired t-test two-tailed*) a également été appliqué pour vérifier si deux groupes différents étaient statistiquement comparables ( $P > 0,05$ ).

## Tableau 1

### Description des agents pharmacologiques utilisés pendant les enregistrements des neurones dissociés du MnPO

Nom des bloquants	Description	Références bibliographiques
TTX	Bloque les potentiels d'action dus au courant sodium dépendant du voltage	Narahashi and al.(1964)
TEA	Bloque certains courants potassiques	Davies and al.(1989)
Césium	Bloque certains courants cationiques dont ( $I_h$ )	Svoboda (1998)
Cadmium	Bloque tous les courants calciques observés dans les neurones du MnPO	Kolaj and Renaud 2001)
4-AP	Bloque des courants potassiques dépendants du voltage	Hermann and Gorman (1981)

# CHAPITRE 4

## RÉSULTATS

## 4. RÉSULTATS

Le but de ces recherches était d'étudier le mécanisme de détection du sodium présent dans le MnPO. Les résultats ont été obtenus à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques effectués avec la technique du patch-clamp sur des neurones de rat. La première partie des recherches s'est effectuée sur des neurones dans une tranche de cerveau contenant le MnPO (section 4.1) et la seconde étape a été faite sur des neurones dissociés de ce noyau (section 4.2).

### 4.1 Enregistrement de neurones dans une tranche de cerveau

Pour déterminer si les neurones du MnPO sont directement impliqués dans la détection des changements de la concentration extracellulaire en sodium du CSF, différentes solutions contenant des  $[Na^+]_{ext}$  variées ont été testées. Dans un premier temps, les enregistrements électrophysiologiques, effectués dans une tranche de cerveau, ont permis d'observer la réponse des neurones du MnPO à une solution hypotonique et hypertonique. Ensuite, on a vérifié si des mécanismes physiologiques, impliquant une réponse à un changement d'osmolarité ou à l'application d'un neuromodulateur particulier (le lactate), affectaient indirectement la réponse des neurones aux variations de la  $[Na^+]_{ext}$ . Tous les enregistrements ont été faits en mode de courant imposé.

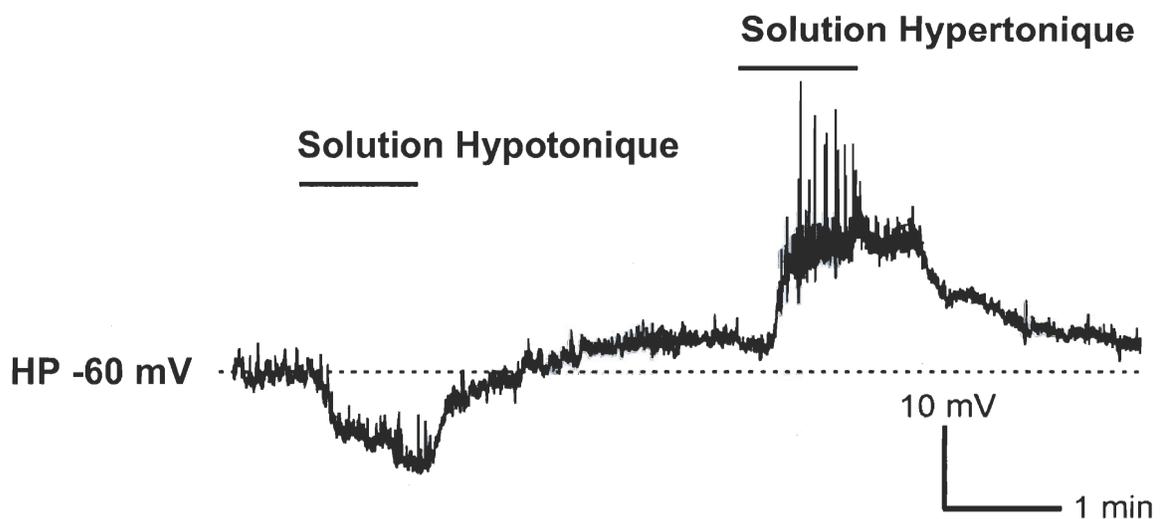
#### 4.1.1 Réponses à un stimulus hypotonique et hypertonique

Les effets d'une diminution et d'une augmentation de la concentration extracellulaire de NaCl sur le potentiel de membrane du même neurone du MnPO ont d'abord été testés. La variation du potentiel de membrane causée par différentes  $[Na^+]_{ext}$  était déterminée par rapport à la valeur du potentiel de membrane pendant l'application d'une solution physiologique contenant 145 mM de NaCl (aCSF). Ainsi, une solution hypotonique (100 mM NaCl) et une solution hypertonique (170 mM NaCl) ont été appliquées de une à deux minutes sur plusieurs neurones (n=6) enregistrés dans une tranche de cerveau. Pendant l'application transitoire de la solution hypotonique, le potentiel de membrane a diminué de  $6,5 \pm 2,3$  mV tandis que pendant celle de la solution hypertonique, le potentiel de

membrane a augmenté de  $6,0 \pm 1,7$  mV [Figure 4.1] dans la majorité des neurones enregistrés (4/6). Le changement du potentiel de membrane s'est produit très rapidement : environ 10 secondes après le début de l'application de ces solutions. L'application du aCSF après celle des solutions testées a permis le retour du potentiel de membrane à sa valeur initiale, près de son potentiel de repos (environ -60 mV), montrant ainsi la réversibilité de la réponse induite par la variation de la  $[Na^+]_{ext}$ . Tous les neurones répondant à la solution hypotonique répondaient également à la solution hypertonique. Seulement 33% des neurones enregistrés (2/6) ne répondaient ni à l'application de la solution hypotonique ni à celle de la solution hypertonique. La réponse des neurones à la solution hypotonique et à la solution hypertonique montre que la détection du sodium est une propriété intrinsèque des neurones du MnPO.

## Figure 4.1

### Réponse des neurones du MnPO à une solution hypotonique et hypertonique



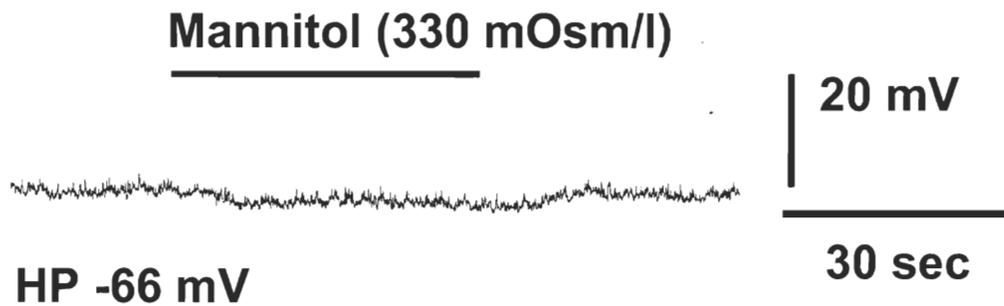
**Figure 4.1 :** Le même neurone du MnPO enregistré dans une tranche de cerveau répond à une solution extracellulaire hypotonique et hypertonique. L'application d'une solution hypotonique avec 100 mM NaCl par rapport au aCSF (145 mM NaCl) a provoqué rapidement une hyperpolarisation d'environ 10 mV. Ensuite, lorsqu'une solution hypertonique avec 170 mM NaCl a été appliquée, une dépolarisation de même amplitude a été observée. Le neurone était maintenu près de son potentiel de repos (HP) à -60 mV avant l'application des différentes solutions extracellulaires.

#### 4.1.2 Réponse à un stimulus hyperosmotique

Pour faire apparaître la spécificité de la réponse au sodium, les effets d'un changement d'osmolarité ont été testés sur les neurones du MnPO. Ceux-ci étaient maintenus près de leur potentiel de repos au début de l'enregistrement. Ainsi, l'application d'une solution hyperosmotique isonatriurique (330 mOsm/l) par rapport à celle du aCSF (295-305 mOsm/l) ne changeait rien dans le potentiel de membrane des neurones enregistrés (n=6) [Figure 4.2]. L'osmolarité de la solution hyperosmotique a été ajustée en ajoutant du mannitol dans le aCSF, ainsi la concentration en sodium est restée la même dans ces deux solutions. Toutefois, ces neurones présentaient une augmentation de leur potentiel de membrane pendant l'application d'une solution hypertonique (170 mM NaCl). Ceci montre que les neurones répondaient spécifiquement au changement de la  $[Na^+]_{ext}$  pendant l'application de la solution hypertonique et non au fait que l'osmolarité de cette solution (330 mOsm/l) était plus élevée que celle du aCSF. De ce fait, la réponse aux variations de la  $[Na^+]_{ext}$  est spécifique au sodium et non aux variations d'osmolarité dans les neurones du MnPO.

## Figure 4.2

### Réponse des neurones du MnPO à une augmentation d'osmolarité extracellulaire



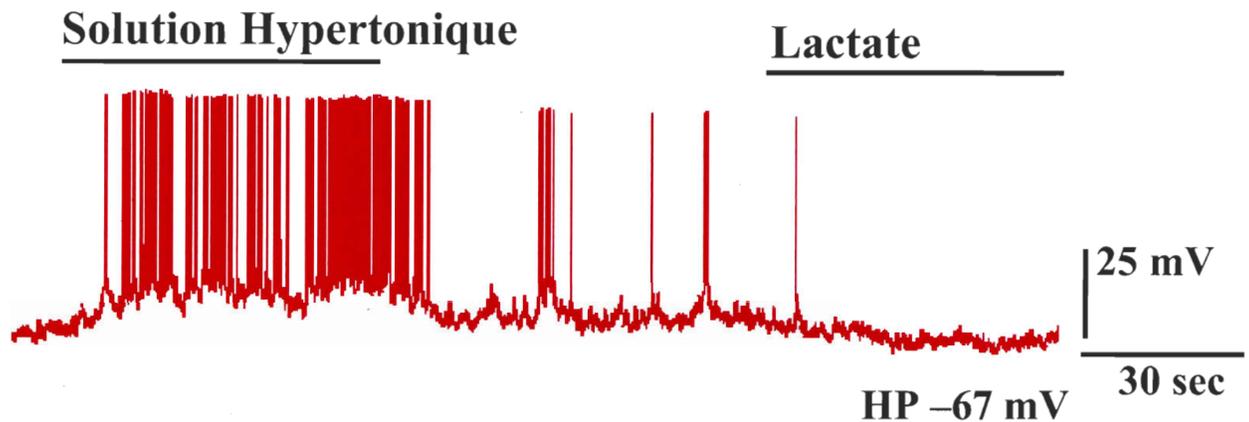
**Figure 4.2 :** Une solution hyperosmotique extracellulaire (330 mOsm/l), causée par l'ajout de mannitol dans le aCSF, a été testée sur plusieurs neurones du MnPO enregistrés en tranche et maintenus à leur potentiel de repos (HP = -66 mV). Ces neurones ne présentaient aucun changement significatif de leur potentiel de membrane pendant l'application de la solution hyperosmotique.

### 4.1.3 Réponse au lactate

Afin de déterminer si les cellules gliales étaient impliquées dans la réponse des neurones du MnPO à un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  (voir section 1.1.2), on a ajouté 1 mM de lactate dans le aCSF (145 mM NaCl). Ceci avait pour but de mimer l'action de ce neuromodulateur libéré par les cellules gliales. Aucun des neurones testés ne présentait de changement significatif de leur potentiel de membrane pendant l'application transitoire du lactate (n=4) [Figure 4.3]. Ces neurones étaient maintenus à leur potentiel de repos au début de l'enregistrement (environ  $-60$  mV). Cependant, l'application d'une solution hypertonique avec 185 mM NaCl sur ces mêmes neurones produisait une dépolarisation de 5 à 10 mV et parfois l'apparition de potentiels d'action, selon le potentiel de repos du neurone avant l'application de la solution hypertonique. Par conséquent, les cellules gliales qui affectent le potentiel de membrane des neurones via la libération de lactate ne sont pas impliquées dans la réponse des neurones du MnPO aux changements de la  $[Na^+]_{ext}$ .

## Figure 4.3

### Réponse des neurones du MnPO au lactate



**Figure 4.3 :** L'application de 1 mM de lactate (environ 1 min) dans le aCSF (145 mM NaCl) n'a provoqué aucun changement significatif dans le potentiel de membrane du neurone du MnPO enregistré dans une tranche de cerveau. Celui-ci était maintenu à son potentiel de repos (-67 mV) au début de l'enregistrement. Toutefois, ce même neurone répondait rapidement à l'application d'une solution hypertonique (185 mM NaCl), causant une augmentation du potentiel de membrane du neurone et même l'apparition de potentiels d'action.

## 4.2 Enregistrement de neurones dissociés

Les résultats précédents montrent que la détection de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  est une propriété intrinsèque des neurones du MnPO et que la réponse de ces neurones aux variations de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  n'est ni causée par un changement d'osmolarité ni par le lactate libéré par les cellules gliales. Afin d'étudier la nature du courant ionique sous-tendant les changements du potentiel membranaire, des enregistrements électrophysiologiques en mode de potentiel imposé ont été faits sur des neurones dissociés du MnPO. Ainsi, on a pu observer uniquement le courant présent dans un neurone isolé de toutes connections synaptiques. De plus, on a ajouté différents agents pharmacologiques (TTX, TEACl, CSCl, CdCl et 4-AP) dans toutes les solutions extracellulaires pour s'assurer d'enregistrer uniquement la réponse aux changements de la concentration de NaCl. [voir Matériel et méthodes]. La réponse des neurones dissociés à l'application de différentes solutions était observée par rapport à celle d'une solution témoin, contenant 100 mM de NaCl, pendant tous les enregistrements électrophysiologiques.

### 4.2.1 Réponse à un stimulus hyperosmotique

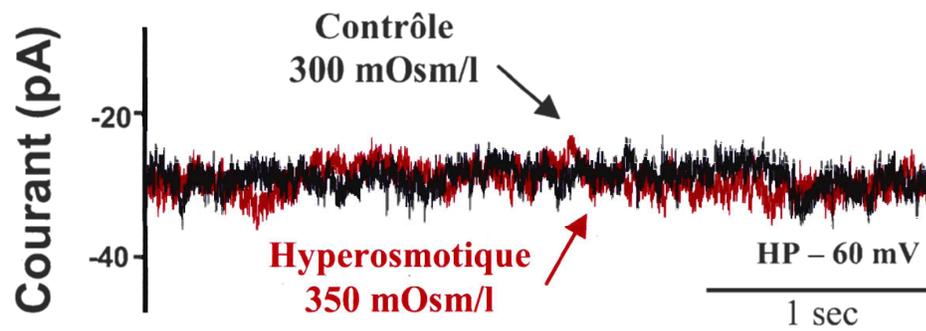
Afin de confirmer que la réponse au sodium des neurones du MnPO est indépendante de l'osmolarité des solutions testées, on a enregistré le courant produit pendant l'application d'une solution hyperosmotique sur des neurones dissociés. L'osmolarité de la solution hyperosmotique a été ajustée à 350 mOsm/l en ajoutant du mannitol dans la solution témoin (300 mOsm/l). La concentration en NaCl extracellulaire (100 mM) était la même dans les deux solutions. Aucun changement de courant n'a été remarqué pendant l'application de la solution hyperosmotique sur tous les neurones testés (12/12) à leur potentiel de repos [Figure 4.4(A)]. Pour tester une éventuelle dépendance au voltage de la réponse à l'hyperosmolarité, on a utilisé le protocole de rampe dépolarisante pendant l'application des solutions. On a observé que la rampe de potentiel, de -60 mV à 30 mV (16 mV/sec), générée pendant l'application de la solution hyperosmotique était identique à celle générée pendant l'application de la solution témoin [Figure 4.4(B)]. Tous les neurones testés (12/12) répondaient toutefois à un changement de concentration en sodium. Ceci confirme

la spécificité de la réponse aux variations de la  $[Na^+]_{ext}$  et l'indépendance de cette réponse à l'osmolarité du milieu extracellulaire dans les neurones dissociés du MnPO.

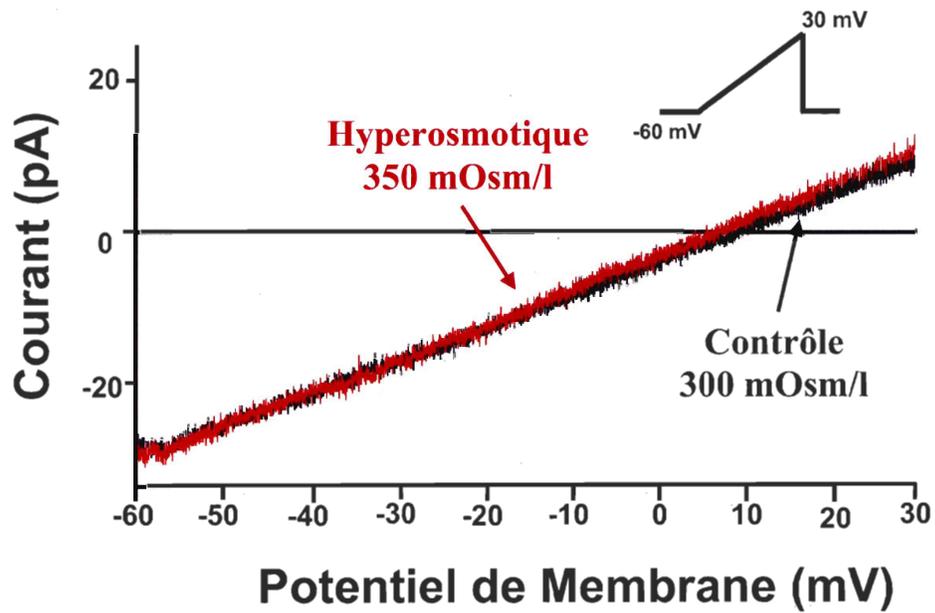
## Figure 4.4

### Réponse à un stimulus hyperosmotique

A



B



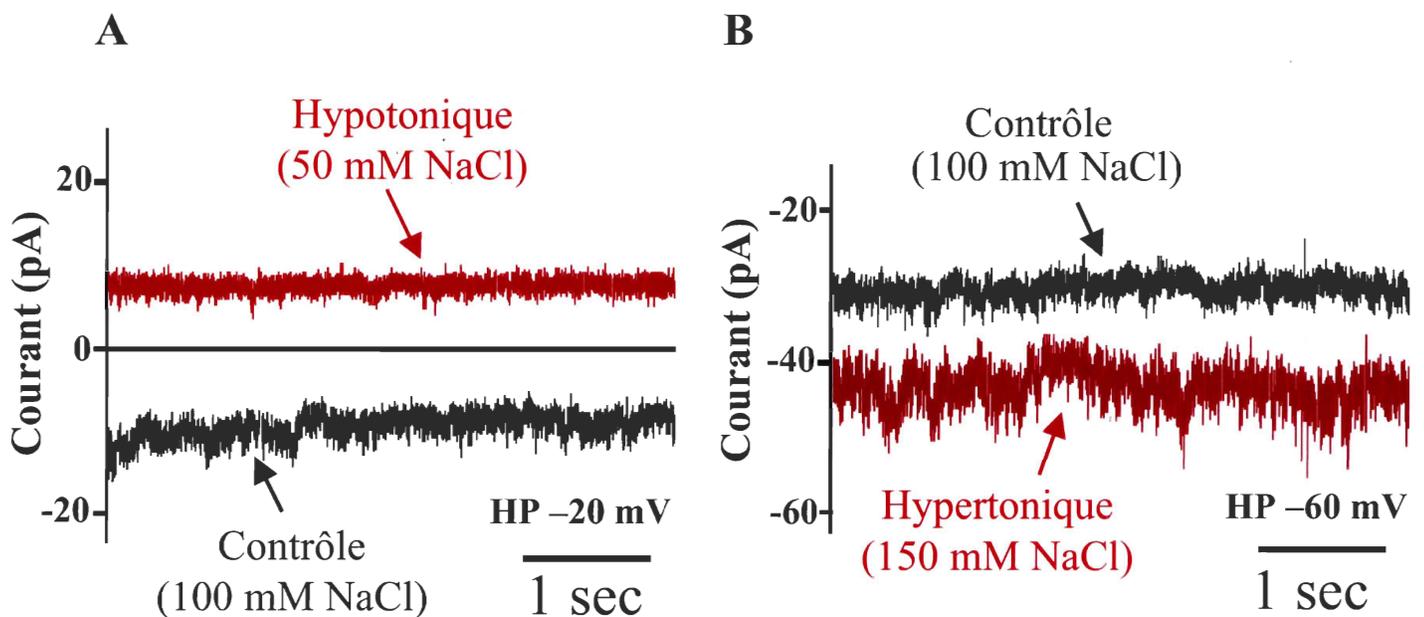
**Figure 4.4 :** (A) L'application transitoire d'une solution hyperosmotique (350 mOsm/l) ne génère aucun changement de courant dans les neurones dissociés du MnPO par rapport à la valeur du courant pendant la solution témoin (300 mOsm/l), c'est pourquoi les traces de courant sont superposées. (B) Les rampes de potentiel (de  $-60$  mV à  $30$  mV) générées pendant l'application de ces deux solutions produisaient des courants identiques. Le courant généré pendant l'application de la solution hyperosmotique est en rouge tandis que celui pendant l'application de la solution témoin est en noir dans les deux figures. Les deux traces sont superposables quelque soit le potentiel de membrane.

#### 4.2.2 Réponse à différentes concentrations en sodium

On a aussi déterminé la nature du courant généré par des changements de la  $[Na^+]_{ext}$  dans les neurones dissociés du MnPO. La concentration intracellulaire de sodium était de 100 mM pendant l'application de toutes les solutions. L'application transitoire d'une solution hypotonique (50 mM NaCl) a généré un courant sortant [Figure 4.5(A)] tandis que l'application d'une solution hypertonique (150 mM NaCl) générait un courant entrant [Figure 4.5(B)] dans la majorité des neurones enregistrés (70-75 %). L'application de la solution témoin après celle de la solution hypotonique ou hypertonique ramenait le courant à son niveau d'origine. Les courants observés (entrants ou sortants) variaient toujours autour des mêmes valeurs d'amplitude indépendamment du potentiel imposé aux neurones au début de l'enregistrement. Après la soustraction du courant causé par le potentiel de jonction de la solution hypotonique (2,3 pA) ou hypertonique (-1,4 pA), la moyenne du courant généré par l'application de la solution hypotonique ( $12,0 \pm 7,6$  pA) et hypertonique ( $-11,2 \pm 5,3$  pA) ont été calculées. Suite à ces observations, on a déterminé les ions responsables des courants causés par un changement de concentration extracellulaire de NaCl en mesurant le potentiel d'inversion des courants induits pendant l'application de solutions avec différentes concentrations en sodium.

## Figure 4.5

### Courant généré par une solution hypotonique et hypertonique



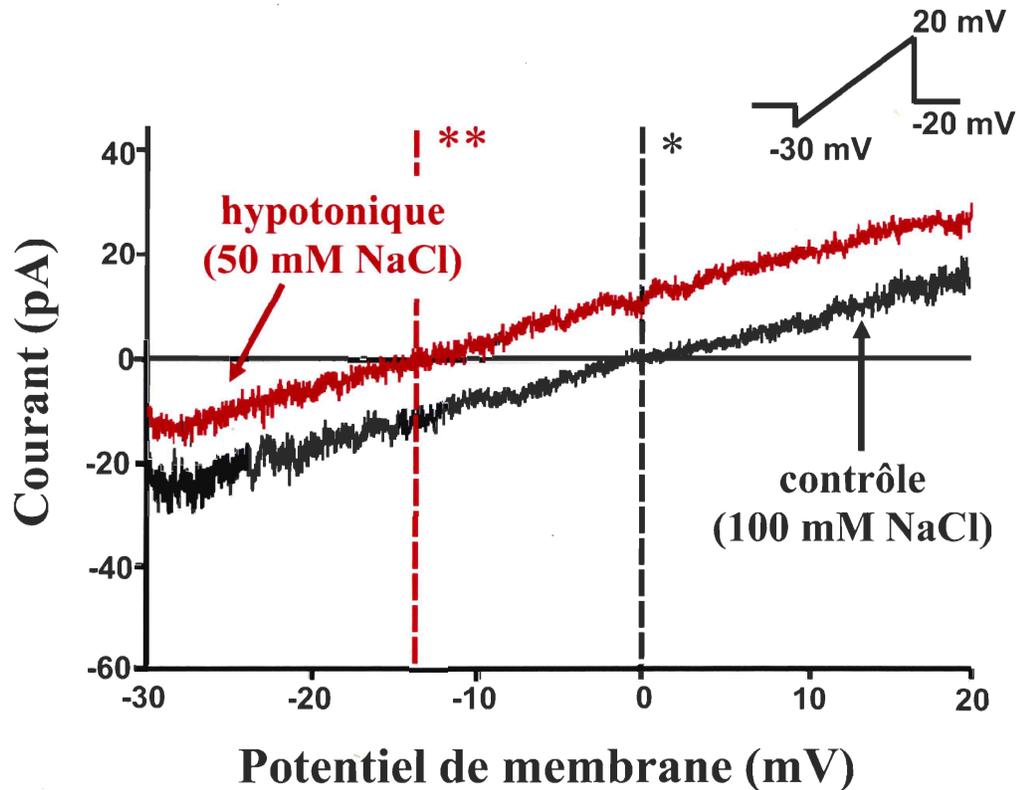
**Figure 4.5 :** (A) L'application d'une solution hypotonique (50 mM NaCl) par rapport à l'application de la solution témoin (100 mM NaCl) a provoqué un courant sortant dans la majorité des neurones dissociés du MnPO. L'amplitude du courant observé dans le neurone enregistré en A était de 15,5 pA. (B) Un courant entrant d'amplitude semblable a été observé lors de l'application d'une solution hypertonique (150 mM NaCl) dans la majorité des neurones. Ainsi, la valeur du courant sortant généré par l'application de la solution hypertonique était de -12,3 pA. Il est à noter que les neurones en A et en B n'étaient pas maintenus au même potentiel (HP : -20 mV [A] et -60 mV [B]).

#### 4.2.2.1 *Potentiel d'inversion du courant induit par une solution hypotonique*

La génération de rampes de potentiel dépolarisant, de  $-30$  mV à  $20$  mV ( $16$  mV/sec), pendant l'application d'une solution hypotonique ( $50$  mM NaCl) et pendant celle de la solution témoin ( $100$  mM NaCl), a permis de trouver le potentiel d'inversion expérimental moyen du courant généré par la solution hypotonique [Figure 4.6]. Ainsi, on a remarqué, à l'aide d'un test statistique (*One simple t-test*,  $n=13$ ,  $P>0,05$ ), que la moyenne des  $E_{Na^+}$  expérimentaux ( $-15,1 \pm 2,8$  mV) était semblable au potentiel d'inversion calculé avec l'équation de Nernst pour l'ion sodium ( $-17 \pm 1$  mV) [Figure 4.8]. L'incertitude sur la moyenne mesurée est donnée par la déviation standard (SD) tandis que celle sur la valeur de référence, calculée avec l'équation de Nernst, est due à l'incertitude sur la mesure de la concentration intracellulaire et extracellulaire de sodium (voir Matériel et méthodes).  $79\%$  des neurones enregistrés présentaient un courant sortant lors de l'application de la solution hypotonique, tandis que  $21\%$  des neurones ne présentaient aucun changement de courant. Il est à noter que les neurones répondant à l'application de la solution hypotonique ont également été testés avec une solution hypertonique ( $150$  mM ou  $180$  mM NaCl). Dans ce cas, un courant entrant a été observé dans la totalité des neurones pendant l'application de la solution hypertonique ( $9/9$ ). Ainsi, le même neurone dissocié répondait à la fois à l'application de la solution hypotonique et hypertonique.

Figure 4.6

Réponse d'un neurone dissocié du MnPO à un stimulus hypotonique



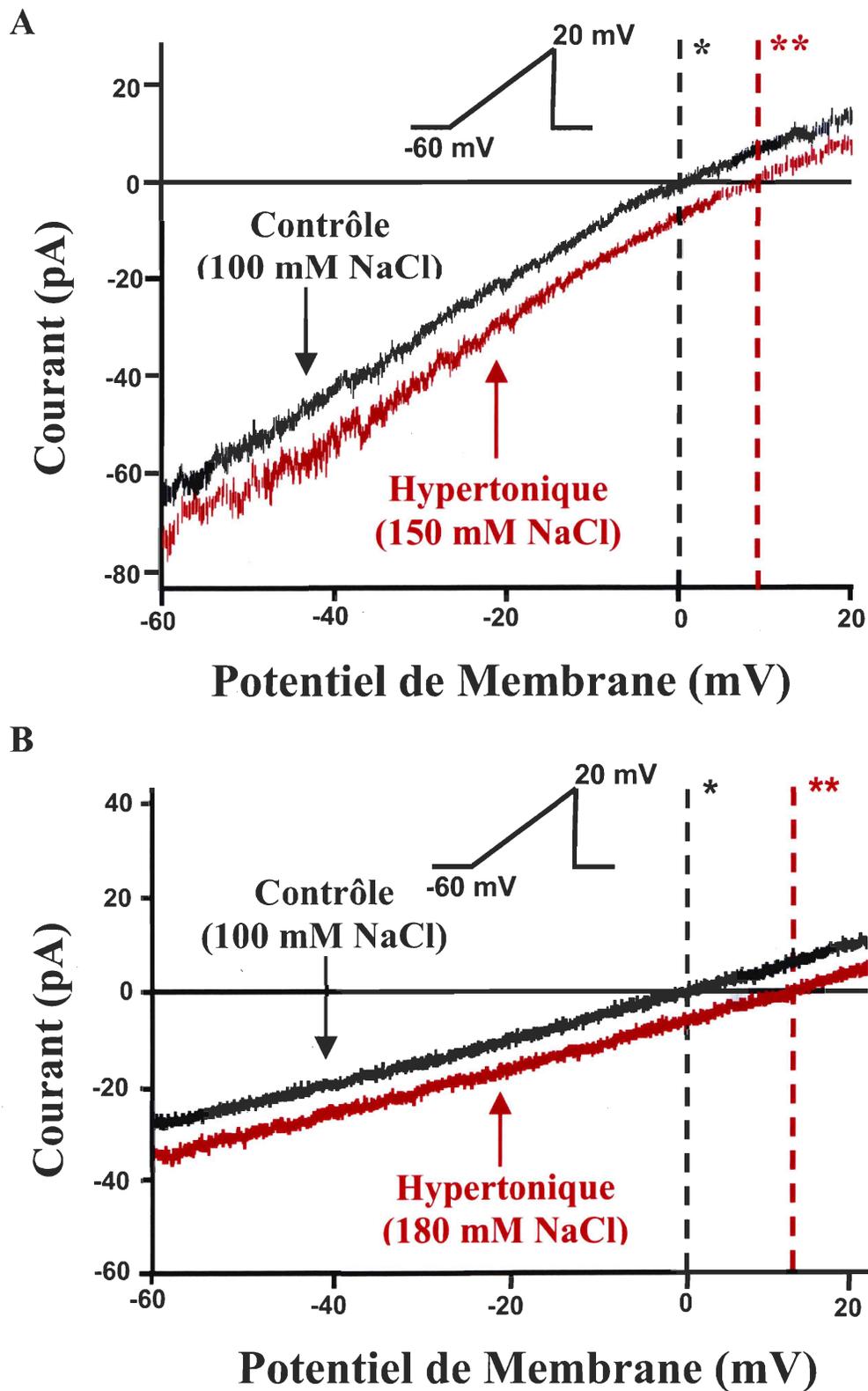
**Figure 4.6 :** L'application de la solution extracellulaire hypotonique (50 mM NaCl) par rapport à une solution témoin (100 mM NaCl) sur un neurone dissocié du MnPO a provoqué un courant sortant. Afin de soustraire les courants de fuite autres que le sodium, on a fait artificiellement coïncider le potentiel d'inversion du courant généré par la rampe de potentiel dépolarisant pendant l'application de la solution témoin avec celui calculé avec l'équation de Nernst pour le sodium, soit 0 mV(\*). Ensuite, la rampe de potentiel, générée au maximum du courant sortant (en rouge), a permis de trouver le potentiel d'inversion du courant produit pendant l'application de la solution hypotonique (-15 mV \*\*).

#### 4.2.2.2 Potentiels d'inversion du courant induit par des solutions hypertoniques

Le même protocole expérimental de rampes de potentiel dépolarisant de  $-60$  mV à  $20$  mV ( $16$  mV/sec) a été utilisé pour déterminer la moyenne du potentiel d'inversion du courant induit par deux solutions hypertoniques avec, respectivement,  $150$  mM NaCl [Figure 4.7(A)] et  $180$  mM NaCl [Figure 4.7(B)]. Ces deux solutions ont été testées sur des neurones différents. Pendant l'application des solutions hypertoniques, on a enregistré un courant entrant de  $-11,2 \pm 5,3$  pA pour la solution avec  $150$  mM NaCl ( $n=21$ ) et de  $-12,7 \pm 6,9$  pA pour celle avec  $180$  mM de sodium ( $n=18$ ). Ce courant entrant a été observé dans  $78$  % des neurones testés ( $39/50$ ).

Les valeurs moyennes du potentiel d'inversion expérimental pour les courants générés par les deux solutions hypertoniques ( $150$  mM et  $180$  mM NaCl), étaient respectivement de  $9,4 \pm 3,2$  mV et de  $13,7 \pm 3,2$  mV. Ces valeurs ont été comparées à celles du potentiel d'inversion de référence de la solution hypertonique avec  $150$  mM NaCl ( $10 \pm 1$  mV) et avec  $180$  mM NaCl ( $15 \pm 1$  mV) [Figure 4.8]. Ainsi, le potentiel d'inversion de référence, calculé avec l'équation de Nernst pour le sodium, s'est avéré semblable à la moyenne des potentiels d'inversion expérimentaux pour les deux solutions hypertoniques (solution avec  $150$  mM NaCl : *One simple t-test*,  $n=21$ ,  $P>0,05$ ; solution avec  $180$  mM NaCl : *One simple t-test*,  $n=18$ ,  $P>0,05$ ). Les incertitudes ont été déterminées de la même façon que pour la solution hypotonique. Comme c'est aussi le cas pour les potentiels d'inversion de référence, on observe une augmentation de la valeur du  $E_{Na^+}$  expérimental lorsqu'on augmente la concentration extracellulaire de sodium. Même si les courants possèdent des profils différents, comme illustré dans la figure 4.7, la différence entre la rampe de courant servant de contrôle et la rampe de courant générée pendant la solution hypertonique reste sensiblement la même dans l'intervalle de potentiels testés ( $-60$  mV à  $+20$  mV). Ceci démontre que le courant généré par la variation de la  $[Na^+]_{ext}$  est indépendant du potentiel imposé au neurone.

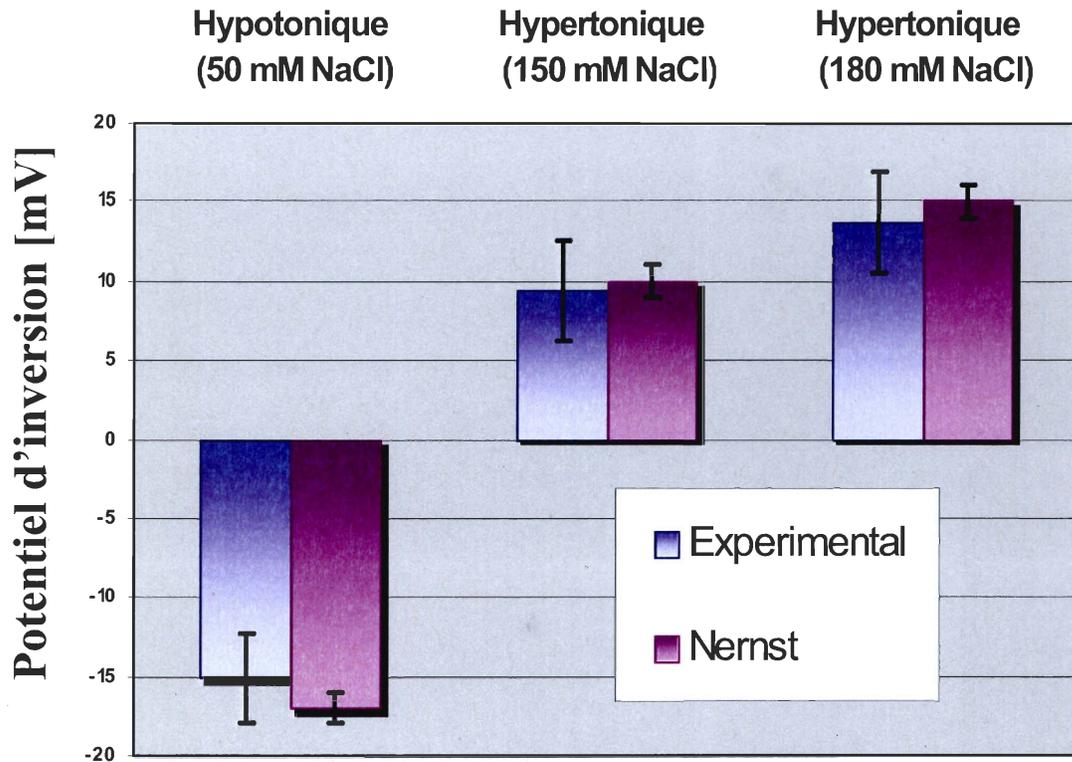
Figure 4.7

Réponse des neurones dissociés du MnPO  
aux stimuli hypertoniques

**Figure 4.7 :** Un courant entrant a été observé durant l'application d'une solution extracellulaire hypertonique avec 150 mM NaCl (**A**) et 180 mM NaCl (**B**) suite à l'application d'une solution témoin (100 mM NaCl) sur des neurones dissociés du MnPO en présence de certains bloquants (TTX, TEA, cadmium, CsCl et 4-AP). Le potentiel d'inversion ( $E_{Na^+}$ ) du courant généré par l'application de la solution témoin était artificiellement amené à 0 mV(\*). Dans ces conditions, le potentiel d'inversion du courant généré par les solutions hypertoniques était respectivement de \*\* 9,6 mV [A] et \*\* 13,5 mV [B]. Ce potentiel est comparable au potentiel de référence calculé avec l'équation de Nernst (respectivement 10 mV et 15 mV).

Figure 4.8

Comparaison entre les potentiels d'inversion expérimentaux du courant et ceux de référence pour les ions sodium



**Figure 4.8 :** La valeur moyenne des potentiels d'inversion expérimentaux pour une solution hypotonique (100 mM NaCl) et deux solutions hypertoniques (150 mM et 180 mM NaCl) a été comparée à la valeur des potentiels d'inversion de référence calculée avec l'équation de Nernst pour chacune des trois solutions. Aucune différence significative entre la valeur expérimentale et celle de référence du potentiel d'inversion de chacune de ces solutions n'a été observée (*One simple t-test*,  $P > 0,05$ ).

### 4.2.3 Tests de perméabilité

Pour tenter d'identifier le type de canal ionique à travers lequel passe les ions sodium pendant l'application transitoire d'une solution hypotonique ou hypertonique, on a calculé la perméabilité du canal impliqué pour deux ions : le lithium ( $\text{Li}^+$ ) et la guanidine ( $\text{CH}_6\text{N}_3^+$ ). La perméabilité de ces ions par rapport au sodium ( $P_x/P_{\text{Na}^+}$ ) a été déterminée de deux manières différentes.

#### 4.2.3.1 Ratio des courants générés par le $\text{Na}^+$ , le $\text{Li}^+$ et le $\text{CH}_6\text{N}_3^+$

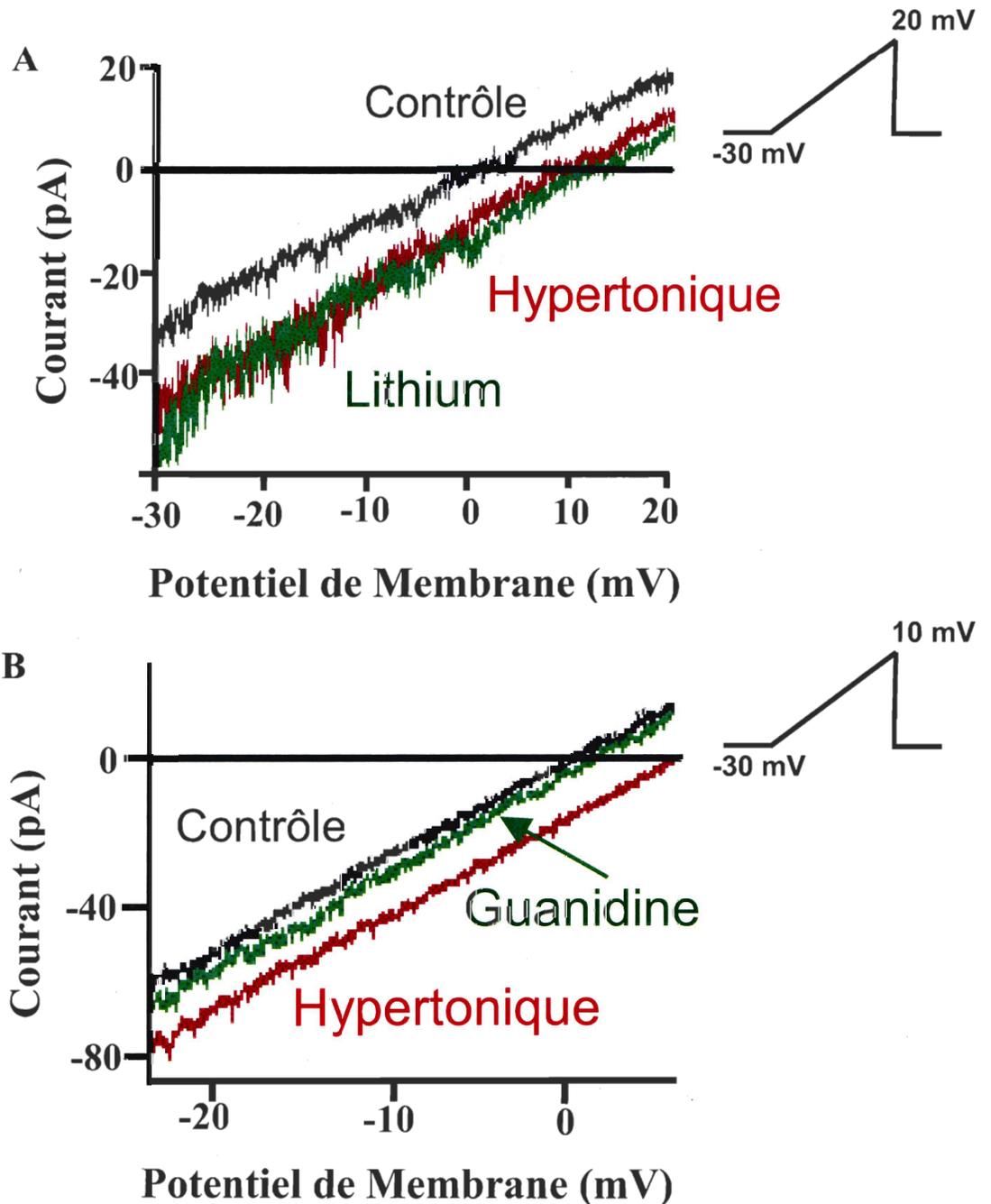
Premièrement, on a calculé le ratio de courant du lithium et de la guanidine en divisant l'amplitude du courant généré par une solution extracellulaire contenant, soit 100 mM NaCl et 50 mM de LiCl ( $\Delta I_{\text{LiCl}}$ ), soit 50 mM de  $\text{CH}_6\text{N}_3\text{Cl}$  ( $\Delta I_{\text{Guanidine}}$ ) par l'amplitude du courant produit par une solution hypertonique avec 150 mM NaCl ( $\Delta I_{\text{NaCl}}$ ). Nos résultats ont montré que le  $\Delta I_{\text{LiCl}}$  était de  $-15,9 \pm 5,0$  pA ( $n=8$ ), une amplitude similaire à celle du courant généré par la solution hypertonique ( $-14,9 \pm 4,3$  pA). Ainsi, en divisant ces deux valeurs, on a évalué la perméabilité du canal pour le lithium à  $0,94 \pm 0,05$ . On a refait ces mêmes étapes, mais cette fois, en remplaçant le lithium par la guanidine. Nos résultats montrent que l'application de la solution contenant de la guanidine générait un courant de faible amplitude ( $-3,1 \pm 2,6$  pA,  $n=5$ ) comparé au courant produit par l'application de la solution hypertonique ( $-11,4 \pm 5,4$  pA). On a ensuite calculé la perméabilité du canal à la guanidine en déterminant le ratio de courant à l'aide de ces deux valeurs ( $0,23 \pm 0,16$ ).

Afin de comparer la valeur des potentiels d'inversion du courant induit par l'application de la solution hypertonique avec celle du courant induit par la solution composée de lithium [Figure 4.9(A)] ou de guanidine [Figure 4.9(B)], on a généré une rampe de potentiel dépolarisant (voir sections 3.5 et 3.6) pendant l'application respective des trois solutions utilisées pour déterminer le ratio de courant : la solution témoin avec 100 mM NaCl, la solution hypertonique avec 150 mM NaCl et la solution composée de 100 mM NaCl et 50 mM lithium ou 50 mM guanidine. Nos résultats montrent que le potentiel d'inversion du courant induit par la solution contenant le lithium ( $11,1 \pm 1,8$  mV) était semblable à celui de la solution hypertonique ( $11,3 \pm 1,3$  mV). Cependant, le potentiel d'inversion du courant

induit par la solution contenant 50 mM de guanidine ( $4,0 \pm 3,6$  mV) est plus proche de celui de la solution témoin (0 mV) que du potentiel d'inversion du courant généré par la solution hypertonique ( $12,0 \pm 4,3$  mV).

**Figure 4.9**

**Perméabilité du canal étudié pour le lithium et la guanidine**



**Figure 4.9 :** (A) La perméabilité du canal a d'abord été testée pour le lithium ( $P_{Li^+}$ ). Ainsi, trois rampes de potentiel ont été générées: la première, pendant l'application de la solution témoin contenant 100 mM NaCl (en noir) ensuite, pendant l'application transitoire de la solution hypertonique contenant 150 mM NaCl (en rouge) et finalement, pendant l'application de la solution contenant 100 mM NaCl et 50 mM lithium (en vert). Le courant généré par l'application de la solution hypertonique et par la solution contenant du lithium était sensiblement le même. De plus, noter que les potentiels d'inversion des courants produits par l'application de ces deux solutions étaient semblables. (B) illustre la perméabilité du canal à la guanidine ( $P_{Guanidine}$ ) par rapport au sodium. Les rampes de potentiel ont été générées de la même façon que pour le lithium. Le courant produit par l'application de guanidine (en vert) était de très faible amplitude en comparaison avec celui produit par la solution hypertonique (en rouge).

#### 4.2.3.2 Utilisation de l'équation modifiée de Goldman-Hodgkin-Katz

La valeur du ratio de perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine a également été évaluée en utilisant l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) modifiée [Annexe I]. Cette équation montre que le ratio de perméabilité dépend de la différence entre le potentiel d'inversion du  $\Delta I_{LiCl}$  ou du  $\Delta I_{Guanidine}$  et celui déterminé pour le courant généré par l'application de la solution hypertonique. En utilisant les valeurs des potentiels d'inversion, mentionnées dans la section 4.2.3.2, dans l'équation modifiée de Goldman-Hodgkin-Katz, on a déterminé  $P_{Li^+}/P_{Na^+}$  ( $0,98 \pm 0,08$ ) et  $P_{Guanidine}/P_{Na^+}$  ( $0,20 \pm 0,14$ ). Ceci a permis de vérifier que cette méthode de calcul de la perméabilité du canal à différents ions était équivalente à la première méthode utilisant le ratio de courant. En effet, la comparaison statistique des résultats obtenus à l'aide d'un t-test (pour le lithium : *Paired t-test*,  $n=8$ ,  $P>0,05$ ; pour la guanidine : *Paired t-test*,  $n=5$ ,  $P>0,05$ ) montre que les perméabilités calculées avec les deux méthodes sont similaires.

Après avoir calculé la perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine par rapport au sodium à l'aide de ces deux méthodes, on a ensuite comparé les valeurs moyennes obtenues avec la perméabilité de canaux sodiques dépendants du voltage [Hille and al., 1992]. Cette comparaison est présentée dans le tableau 2. En effet, puisque le courant généré par des variations de la  $[Na^+]_{ext}$  était porté uniquement par des ions sodium, il paraissait logique qu'un canal sodique soit impliqué. Comme les perméabilités de référence des canaux sodiques dépendants du voltage variaient selon le type de cellules étudiées (cellules musculaires, axones, etc.), une incertitude a été ajoutée sur les valeurs de référence. Par exemple, la perméabilité à la guanidine pour les canaux sodiques est de 0,093 dans une cellule musculaire de grenouille [Campbell and al., 1976] tandis qu'elle est de 0,17 dans un axone géant de *Myxicola* [Binstock, 1976]. Ainsi, à l'aide d'un test statistique (pour le lithium : *One simple t-test*,  $n=8$ ,  $P>0,05$ ; pour la guanidine : *One simple t-test*,  $n=5$ ,  $P>0,05$ ), on a déterminé que les moyennes expérimentales de la perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine étaient comparables aux valeurs de perméabilité des canaux sodiques pour ces ions.

## Tableau 2

### Comparaison de la perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine avec celle de référence pour les canaux sodiques

	Ratio de courant ( $\pm$ SD)	Ratio de perméabilité ( $\pm$ SD)	Référence Ratio de perméabilité pour les canaux Na <sup>+</sup>
$P_{Li^+}/P_{Na^+}$	0,94 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,08	0,98 $\pm$ 0,05
$P_{Guanidine}/P_{Na^+}$	0,23 $\pm$ 0,16	0,20 $\pm$ 0,14	0,15 $\pm$ 0,06

**Tableau 2 :** La perméabilité du canal pour le lithium ( $P_{Li^+}/P_{Na^+}$ ) et la guanidine ( $P_{Guanidine}/P_{Na^+}$ ) par rapport au sodium a été obtenue de deux façons. Le ratio de courant a été calculé à partir du maximum du courant causé par l'application d'une solution extracellulaire contenant du lithium ou de la guanidine divisé par le maximum de courant dû à l'application d'une solution hypertonique (150 mM NaCl). Pour sa part, le ratio de perméabilité a été déterminé en utilisant l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz modifié tel que décrit dans l'Annexe I. Le ratio de courant et le ratio de perméabilité sont comparables pour le lithium et pour la guanidine (pour le lithium : *Paired t-test*,  $P > 0,05$ ,  $n=8$ ; pour la guanidine : *Paired t-test*,  $P > 0,05$ ,  $n=5$ ). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD. La perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine, calculée expérimentalement avec ces deux méthodes, s'est avérée identique à celle trouvée en référence pour les canaux sodiques (pour le lithium : *One simple t-test*,  $n=8$ ,  $P > 0,05$ ; pour la guanidine : *One simple t-test*,  $n=5$ ,  $P > 0,05$ ). L'incertitude sur la perméabilité de référence des canaux sodiques est due à la divergence des valeurs données dans la littérature selon le type de cellules testées.

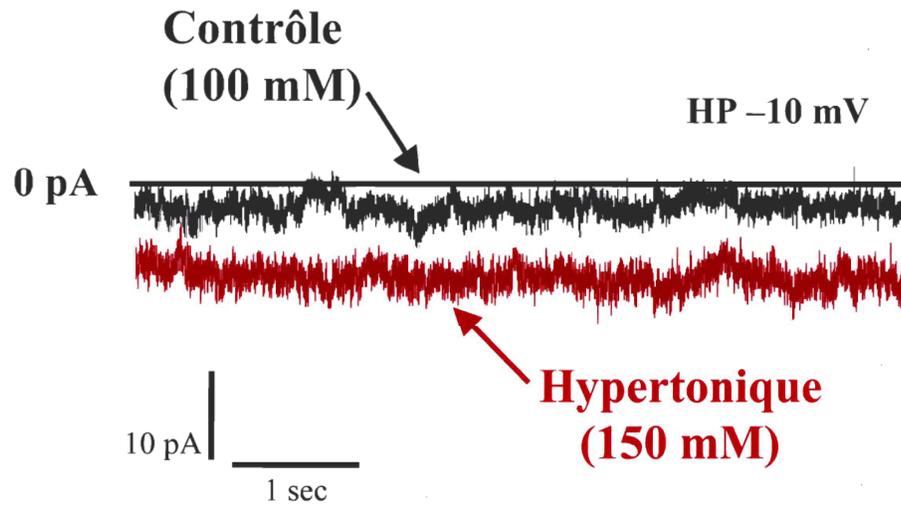
#### 4.2.4 Obstruction du canal par le rubidium

On a également voulu calculer la perméabilité du canal pour le rubidium ( $\text{Rb}^+$ ) de la même manière que précédemment. Le courant entrant, généré par l'application de la solution hypertonique (150 mM NaCl), était présent dans la majorité des neurones dissociés du MnPO avant l'application du rubidium [Figure 4.10(A)]. Pour les six neurones testés, la moyenne du courant entrant était de  $-6,5 \pm 2,5$  pA. Toutefois, lorsque la solution hypertonique était à nouveau appliquée en présence de rubidium, pratiquement aucun courant causé par le changement de la concentration de sodium n'était observé [Figure 4.10(B)], et ce, pour tous les neurones testés. L'amplitude du courant entrant généré par la solution hypertonique était alors de  $-0,5 \pm 0,8$  pA. L'obstruction du canal par le rubidium durait au moins 6 minutes car celui-ci restait bloqué jusqu'à la fin des enregistrements. La figure 4.10 illustre le blocage du canal sodique par le  $\text{Rb}^+$ . Il est à noter qu'en présence de rubidium, le tracé représentant le courant sodium de fuite pendant l'application de la solution témoin (100 mM NaCl) s'est déplacé vers des valeurs plus positives. Ce déplacement indique clairement le blocage du canal quelle que soit la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ .

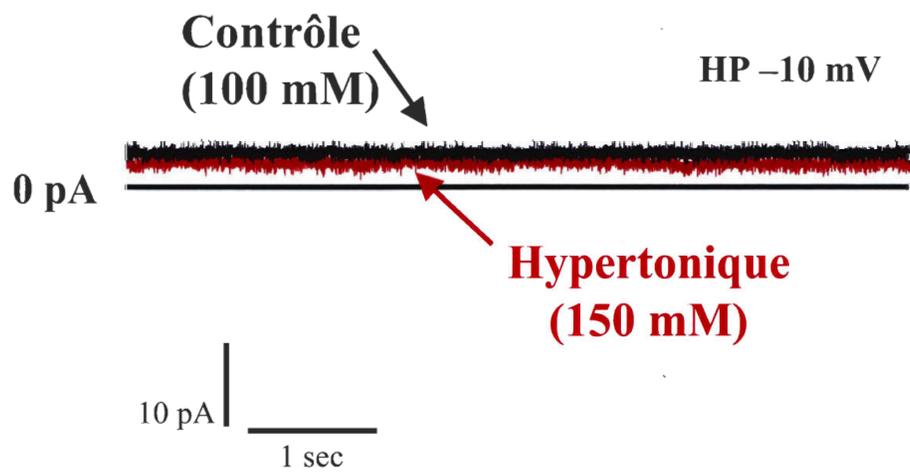
Figure 4.10

## Obstruction du canal par le rubidium

A



B



**Figure 4.10 :** (A) Avant l'application de 50 mM de rubidium, un courant entrant de  $-9,0$  pA était généré par l'application d'une solution hypertonique (150 mM NaCl) suite à l'application de la solution témoin (100 mM NaCl) sur un neurone dissocié du MnPO. Le neurone était maintenu à un potentiel de  $-10$  mV et aucun courant de fuite n'a été soustrait. (B) Après l'application du rubidium (de 3 à 4 minutes) sur le même neurone, l'application de la solution hypertonique ne générait plus de courant entrant ( $-1,6$  pA).

# **CHAPITRE 5**

## **DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

## 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans tout le CNS, les mécanismes de détection de la  $[Na^+]_{ext}$  sont variés, complémentaires et relativement complexes. Ils diffèrent généralement selon la structure du cerveau où ils se trouvent. Les régions de la lame terminale, dont le MnPO qui est un acteur important dans la régulation de la soif et de l'appétit pour le sel, sont particulièrement impliquées dans cette détection. L'ensemble des résultats de ce mémoire démontrent la spécificité des neurones du MnPO dans la détection de la concentration en sodium extracellulaire, la nature du courant généré par des variations de la  $[Na^+]_{ext}$  et caractérisent le canal qui laisse passer les ions responsables de ce courant à travers la membrane neuronale.

### 5.1 Spécificité des neurones du MnPO dans la détection du sodium

Il existe quatre mécanismes importants pour la détection du sodium dans les fluides extracellulaires du CNS (plasma sanguin, CSF), tels que décrits dans le chapitre 1. Deux de ces mécanismes impliquent directement des canaux sur les neurones qui sont soit sensibles à l'osmolarité du milieu extracellulaire, soit sensibles à la  $[Na^+]_{ext}$ . Les autres mécanismes impliquent la participation de cellules gliales qui libèrent du lactate en réponse à un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  ou qui sécrètent de la taurine lorsque l'osmolarité du milieu extracellulaire change. On a donc déterminé lequel de ces mécanismes, impliqués dans la détection du sodium, était présent dans le MnPO.

#### 5.1.1 Sensibilité des neurones aux variations de la $[Na^+]_{ext}$

La sensibilité spécifique aux changements de  $[Na^+]_{ext}$  d'une grande population de neurones dans le MnPO a pu être démontrée à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques. Ces enregistrements ont été faits dans des conditions très rapprochées de celles physiologiques, puisque les neurones étaient enregistrés dans une tranche de cerveau immédiatement après la décapitation de l'animal et que cette tranche était immergée dans une solution mimant le CSF. La majorité des neurones du MnPO enregistrés dans une tranche de cerveau étaient à la fois sensibles à l'application d'une solution hypotonique et hypertonique dont les concentrations variaient autour de celle physiologique du sodium. Les neurones

présentaient donc une hyperpolarisation membranaire lorsque la solution extracellulaire avait une  $[Na^+]_{ext} < 145$  mM et une dépolarisation membranaire lorsque la solution contenait une  $[Na^+]_{ext} > 145$  mM. Ceci démontre que la majorité des neurones répondent de manière opposée aux deux stimuli appliqués. Tel que montré dans la section 4.2.2, les changements du potentiel de membrane des neurones du MnPO suite à une variation de la  $[Na^+]_{ext}$  n'étaient pas causés uniquement par la différence entre les potentiels de jonction de chacune des solutions appliquées. En effet, l'amplitude du courant généré par la différence entre les potentiels de jonction était négligeable par rapport à celle du courant généré par les variations de la  $[Na^+]_{ext}$ . En conséquence, cela confirme la sensibilité du même neurone du MnPO à une augmentation et à une diminution de la  $[Na^+]_{ext}$ . Cette sensibilité va dans le même sens que les résultats obtenus par Grob en 2004 [Grob and al., 2004]. Son étude avait aussi montré que la diminution ou l'augmentation du potentiel de membrane, pendant l'application d'une solution hypotonique ou hypertonique contenant les mêmes  $[Na^+]_{ext}$  que celles que nous avons utilisées, était suffisante pour respectivement inhiber ou provoquer l'apparition de potentiels d'action dans les neurones testés. Cela indique que les changements de la  $[Na^+]_{ext}$  que nous avons induits sont en mesure d'affecter rapidement l'excitabilité des neurones du MnPO et, de ce fait, les signaux électriques qu'ils envoient. Mais, qu'en est-il des variations de l'osmolarité du milieu extracellulaire ?

### 5.1.2 Insensibilité des neurones du MnPO à un stimulus hyperosmotique

Plusieurs études effectuées par Bourque et son équipe ont mis en évidence des mécanismes de détection de l'osmolarité dans le CNS [Ciura and Bourque, 2006; Naeini and Bourque, 2006; Oliet and Bourque, 1993]. La présence d'osmorécepteurs de type TRPV a donc été décrite dans les neurones de l'OVLT et du SON. Ces osmorécepteurs réagissent aux changements de volume des neurones causés par une variation de l'osmolarité du milieu extérieur. Il existe également un autre type d'osmorécepteur sensible à l'étirement membranaire décrit dans le SON : le SIC. Ce canal s'ouvre en condition d'hyperosmolarité et se ferme en condition d'hypo-osmolarité. Les deux types de canaux sensibles à l'osmolarité du milieu extracellulaire ont des effets semblables sur le potentiel de membrane, bien que leur mécanisme d'action diffère (voir sections 1.2.2 et 1.2.4). Ainsi, l'application d'une solution hypernatriurique hyperosmotique et hyponatriurique hypo-

osmotique est en mesure respectivement de dépolariser et d'hyperpolariser les neurones par l'intermédiaire des osmorécepteurs TRPVs ou des SICs. De ce fait, la réponse des neurones du MnPO aux variations de la  $[Na^+]_{ext}$  pourrait être causée par un changement de l'osmolarité des solutions extracellulaires puisque celles-ci n'étaient pas iso-osmotiques (100 mM NaCl et 270 mOsm/l; 170 mM NaCl et 330 mOsm/l). Le changement d'osmolarité induit par la variation de la  $[Na^+]_{ext}$  privilégierait la présence de TRPVs ou de SICs dans les neurones du MnPO comme effecteurs du changement du potentiel membranaire. Cependant, les résultats que l'on a obtenus démontrent la spécificité de la réponse des neurones du MnPO aux changements de la  $[Na^+]_{ext}$  et non, aux variations d'osmolarité des solutions extracellulaires. En effet, l'application de deux solutions hyperosmotiques isonatriuriques (330 et 350 mOsm/l), dont l'hyperosmoticité est due à l'ajout de mannitol et non de NaCl dans la solution témoin, ne provoquait aucune réponse des neurones du MnPO. Cependant, ces mêmes neurones répondaient à une solution rendue hyperosmotique par l'augmentation de la  $[Na^+]_{ext}$ . Ainsi, aucune variation du potentiel de membrane causée uniquement par un changement d'osmolarité n'était perçue ni par les neurones dissociés du MnPO ni par ceux enregistrés dans une tranche de cerveau.

De plus, la rampe de potentiel dépolarisant générée pendant l'application de la solution hyperosmotique par rapport à celle générée pendant l'application d'une solution témoin iso-osmotique a permis de conclure que l'insensibilité des neurones à l'osmolarité était indépendante du potentiel de membrane. Une étude précédente du laboratoire avait aussi démontré l'insensibilité des neurones du MnPO, enregistrés dans une tranche de cerveau de rat, à une augmentation d'osmolarité [Grob and al, 2004]. Cette étude avait montré, par l'intermédiaire du  $Gd^{3+}$  (une molécule connue pour bloquer les SICs), que les SICs n'étaient pas impliqués dans la réponse des neurones du MnPO à un changement de la  $[Na^+]_{ext}$ . En effet, l'application de gadolinium dans une solution hypotonique et hypertonique ne changeait rien à la réponse des neurones. Ces résultats démontraient ainsi qu'il n'y avait pas d'osmorécepteurs de types TRPVs ou de SICs impliqués dans la réponse des neurones du MnPO, mais que ceux-ci répondaient plutôt aux changements de la  $[Na^+]_{ext}$  via des senseurs de sodium. Nos résultats complètent ceux de certaines études qui ont mis

en évidence la présence de senseurs de sodium dans le CNS, indépendants de l'osmolarité du milieu extracellulaire [Osborne and al., 1987; Andersson and Olsson, 1973].

### 5.1.3 Implication des cellules gliales dans la détection du $\text{Na}^+$ ?

Bien que les neurones du MnPO ne répondent pas aux changements d'osmolarité, mais plutôt aux variations directes de sodium dans le milieu extracellulaire, il était possible que les cellules gliales soient impliquées dans la réponse des neurones aux variations de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ . En effet, Noda et son équipe ont démontré récemment que les cellules gliales du SFO détectaient une augmentation de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  par l'intermédiaire de canaux sodiques  $\text{Na}_x$  [Noda and al., 2007]. Il s'ensuivait une cascade enzymatique qui aboutissait à la sécrétion de lactate par les cellules gliales (voir section 1.2.3). Le lactate capté par les neurones avoisinants avait alors pour effet de dépolariser les neurones, démontrant l'effet indirect de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  sur les neurones du SFO. Pour vérifier la présence de ce mécanisme dans le MnPO, on a appliqué directement du lactate sur des neurones du MnPO, enregistrés dans une tranche de cerveau afin de conserver les astrocytes dans la préparation. Cette expérience avait pour but de tester l'effet de ce neuromodulateur sur les neurones du MnPO. Toutefois, l'application de lactate n'avait aucun effet sur les neurones du MnPO, contrairement à l'augmentation de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  dans la solution qui dépolarisait presque immédiatement les neurones. Ce résultat démontre que le mécanisme décrit par Noda, impliquant la libération de lactate par les cellules gliales, n'est pas impliqué dans la réponse des neurones du MnPO à une augmentation de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$ .

Cependant, les cellules gliales n'affectent pas seulement les neurones par l'intermédiaire du lactate dans le CNS. En condition hypotonique, les cellules gliales du SON et du PVN vont libérer de la taurine en réponse à une augmentation de leur volume causée par une entrée massive d'eau [Hussy and al., 2000]. La libération de taurine par les cellules gliales va ainsi leur permettre de retrouver leur volume initial (voir section 1.2.1). Ce neuromodulateur va ensuite être capté par les neurones avoisinants. Il va ainsi activer les récepteurs glycinergiques des neurones, ce qui va résulter en une entrée d'ions chlorures. Cette entrée d'ions négatifs va alors provoquer l'hyperpolarisation de la membrane du neurone. L'application de taurine sur les neurones du MnPO enregistrés dans une tranche de cerveau

de rat cause en effet une hyperpolarisation semblable à celle obtenue avec une solution hypotonique [Thèse de Magali Grob (2005), données non publiées]. Cette réponse est inhibée par l'application de strychnine, un antagoniste compétitif des récepteurs glycinergiques. Ces résultats préliminaires pourraient indiquer que la réponse des neurones du MnPO à une solution extracellulaire hypotonique est due à la libération de taurine par les astrocytes présents dans la tranche.

Cependant, la taurine n'est pas impliquée dans le mécanisme de détection de la  $[Na^+]_{ext}$  mis en évidence dans nos recherches. En effet, l'application de strychnine, testée par Grob sur les neurones en tranche du MnPO, n'a pas changé la réponse des neurones pendant l'application d'une solution hypotonique (100 mM NaCl / 270 mOsm/l). De plus, nos résultats ont montré que l'application d'une solution hyponatriurique iso-osmotique (50 mM NaCl / 300 mOsm/l) sur les neurones dissociés du MnPO entraînait une hyperpolarisation membranaire. Comme la taurine est libérée par les cellules gliales en condition hypo-osmotique, ceci indique que l'hyperpolarisation causée par la solution hyponatriurique iso-osmotique est due à un autre mécanisme. Ainsi, la taurine n'est pas responsable de la réponse à un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  que nous observons dans les neurones du MnPO. Cependant, la taurine pourrait agir sur les neurones sensibles au sodium en condition hypotonique prolongée et accentuer l'hyperpolarisation membranaire des neurones.

Ainsi, les mécanismes qui impliquent la libération de lactate ou de taurine par les cellules gliales, affectant le potentiel membranaire des neurones, ne sont pas responsables des réponses des neurones du MnPO induites par différentes concentrations en sodium (hyponatriurique ou hypernatriurique). De plus, la réponse au sodium des neurones enregistrés en tranche dans le MnPO est très rapide et les neurones dissociés du MnPO, très distants des cellules gliales par rapport aux neurones présents dans une tranche de cerveau, répondent également à des changements de  $[Na^+]_{ext}$ . Ces observations sont donc en faveur de la présence de « senseurs » de sodium directement sur les neurones plutôt que sur les cellules gliales du MnPO.

En conséquence, la réponse des neurones du MnPO à un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  est due à la présence de « senseurs » de sodium. Ces senseurs seraient présents essentiellement sur les neurones. Ainsi, tel que démontré dans les chapitres précédents, les réponses observées lors d'une variation de la  $[Na^+]_{ext}$  sont causées uniquement par la présence de « senseurs » de sodium sur les neurones tel que suggéré dans l'hypothèse 1 et ne sont pas générés par les autres mécanismes cellulaires de détection du sodium présentés dans le chapitre 1.

## 5.2 Nature du courant généré par une variation de la $[Na^+]_{ext}$

Les senseurs de sodium dans le MnPO sont responsables de la dépolarisation et de l'hyperpolarisation des neurones causées par une variation de la  $[Na^+]_{ext}$ . Ces modifications dans le potentiel de membrane des neurones du MnPO sont causées par un courant entrant ou sortant à travers la membrane. Afin de vérifier si les ions sodium sont les uniques porteurs de charges de ce courant, nos expériences électrophysiologiques ont mis en évidence le potentiel d'inversion du courant généré par l'application de solutions extracellulaires avec différentes concentrations en sodium. Ainsi, nos résultats montrent que le potentiel d'inversion du courant généré par l'application d'une solution hypotonique (100 mM NaCl) et par deux solutions hypertoniques (150 mM et 180 mM NaCl) sur des neurones dissociés du MnPO est le même que celui calculé avec l'équation de Nernst pour les ions sodium. Le sodium est donc responsable du courant généré par l'application de stimuli hypertonique et hypotonique sur les neurones du MnPO.

De plus, comme on utilisait des solutions hypotoniques et hypertoniques dont la concentration en sodium, mais aussi en ions chlorures variait, on a calculé le potentiel d'inversion du courant, qui serait produit par cet ion, à l'aide de l'équation de Nernst. On a ainsi remarqué que la valeur du potentiel d'inversion du courant généré par les ions chlorures était loin de celui produit par le sodium (plus de 10 mV de différence), et ce, dans les trois solutions testées. Grob et al. avaient également montré que les ions chlorures n'étaient pas responsables de la réponse provoquée par l'application de différentes concentrations de NaCl dans les neurones du MnPO [Grob and al, 2004]. En effet, l'application de choline chloride sur ces neurones ne produisait aucune modification du

potentiel de membrane. De ce fait, les ions chlorures ne sont pas responsables des courants générés pendant les changements de la concentration extracellulaire de NaCl. On peut donc conclure que les ions sodium sont les uniques charges responsables du courant généré par une variation de la  $[Na^+]_{ext}$  sur les neurones du MnPO.

### 5.3 Caractéristiques du canal responsable du courant $Na^+$ étudié

Le courant causé par l'application d'une solution hypotonique ou hypertonique sur les neurones du MnPO est généré par des ions sodium qui traversent un canal spécifique de la membrane cellulaire. Cependant, même si ce courant est causé uniquement par des ions sodium, le canal qu'ils traversent peut être perméable à d'autres types d'ions. Par exemple, en plus d'être très perméables au sodium, les canaux sodiques sont perméables au lithium et au thallium, mais presque imperméables à la guanidine, au potassium, au césium et au calcium [Hille, 2001]. Comme le courant étudié est porté uniquement par des ions sodium, il paraît logique que le canal responsable de ce courant fasse partie de la famille des canaux sodiques. En effet, ce canal possède des caractéristiques communes aux canaux sodiques dépendants du voltage.

Tel que démontré dans les résultats, la perméabilité de ce canal pour le lithium et la guanidine est semblable à celle des canaux sodiques dépendants du voltage répertoriée dans la littérature. L'amplitude des courants générés par le lithium, la guanidine et le sodium ainsi que l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz, utilisant la valeur du potentiel d'inversion du courant produit par ces ions, ont permis de déterminer la perméabilité du canal pour le lithium et la guanidine. Ainsi, l'amplitude du courant généré par le lithium est similaire à celle du courant produit par la même concentration d'ions sodium. Il en est de même pour le potentiel d'inversion du courant généré par le  $Li^+$ . Le canal étudié est donc autant perméable aux ions lithium qu'aux ions sodium. Toutefois, ce canal est très peu perméable à la guanidine. En effet, le courant généré par cet ion est très faible en comparaison avec celui produit par la même concentration d'ions sodium. L'ajout de guanidine dans la solution témoin n'a pratiquement aucun effet sur l'amplitude du courant. De ce fait, le potentiel d'inversion du courant produit par la guanidine est beaucoup plus près de celui de

la solution témoin que de celui de la solution hypertonique. Ces résultats ont permis de calculer la perméabilité du canal étudié pour le lithium et la guanidine à l'aide de deux méthodes différentes équivalentes et de comparer cette perméabilité avec celle des canaux sodiques dépendants du voltage répertoriée dans la littérature. La perméabilité du canal étudié pour le lithium et la guanidine étant semblables à celles des canaux sodiques dépendants du voltage et le courant causé par un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  étant porté uniquement par des ions sodium, on peut alors conclure qu'un canal sodique est responsable de ce courant, tel que suggéré dans la deuxième hypothèse de ce travail.

#### 5.4 Le canal sodique $Na_X$ , responsable du courant $Na^+$ étudié ?

Le canal sodique responsable du courant généré par un changement de la  $[Na^+]_{ext}$  est donc directement impliqué dans le mécanisme de détection du sodium dans les neurones du MnPO. Beaucoup d'indices laissent croire qu'il s'agit d'un canal sodique récemment mis en évidence par Noda et son équipe : le canal  $Na_X$  [Noda and al., 2007]. Ce canal est classé dans la famille des canaux sodiques et est exprimé, entre autre, dans les structures de la lame terminale, dont le MnPO [Watanabe, Noda and al., 2006]. En effet, la présence du gène codant pour le canal  $Na_X$  dans les neurones du MnPO a été confirmée dans l'étude de Grob et al., à l'aide de la technique d'hybridation in situ [Grob and al, 2004]. Ils ont remarqué que les ARN messagers codant pour le gène  $Na_X$  étaient colocalisés avec la protéine NeuN, permettant d'identifier des neurones. Ainsi, le canal  $Na_X$  est présent dans les neurones du MnPO.

Ce canal, également présent dans le SFO, est responsable de la détection du sodium (voir chapitre 1) [Noda, 2006]. En effet, les souris KO pour le gène  $Na_X$  ne montrent pas d'aversion pour les solutions salées et n'ingurgitent pas de grande quantité d'eau après avoir reçu une injection intracérébrale d'une solution hypertonique (0.5 M NaCl), contrairement aux souris sauvages. Ainsi, tout comme le canal sodique étudié, le canal  $Na_X$  est directement impliqué dans la détection des changements de  $[Na^+]_{ext}$  du CSF. Noda a effectivement montré que ce canal permet au sodium d'entrer à l'intérieur des cellules lorsque la concentration extracellulaire de  $Na^+$  augmente (voir section 1.2.3). Comme son

mécanisme ne dépend pas du potentiel imposé à la cellule, on dit qu'il produit un courant « de fuite », dont l'amplitude dépend de la concentration extracellulaire de  $\text{Na}^+$ . On peut donc supposer que les canaux  $\text{Na}_X$  sont ouverts en permanence et que le courant qui passe au travers est régi par la loi de Nernst pour le sodium. Il en est de même pour le canal sodique responsable de la détection du sodium dans le MnPO qui laisse passer uniquement les ions sodium. Ceux-ci génèrent un courant dont le potentiel d'inversion est, effectivement, prédit par l'équation de Nernst.

De plus, contrairement à la majorité des canaux sodiques dépendants du voltage, les canaux  $\text{Na}_X$  sont insensibles à la TTX [Noda and al., 2007]. Les canaux sodiques responsables de la détection du sodium dans les neurones du MnPO possèdent également cette propriété. En effet, nos résultats ont démontré que les canaux sodiques présents dans le MnPO laissaient passer un courant lors d'un changement de  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  même en présence de TTX. Ceci met en évidence l'insensibilité des canaux sodiques étudiés à la TTX. Il existe également des canaux sodiques dépendants du voltage insensibles à la TTX dans le CNS [Scholz, 1998]. Toutefois, ces canaux ne sont pas impliqués dans la réponse au changement de sodium observé dans le MnPO. En effet, nos résultats ont démontré que, contrairement aux canaux sodiques dépendants du voltage insensibles à la TTX [Braü, 2000], les canaux présents dans les neurones du MnPO, qui sont impliqués dans la détection du  $\text{Na}^+$ , laissaient toujours passer la même amplitude de courant quelle que soit la valeur du potentiel imposé. Ceci indique que ce courant sodique doit passer à travers un canal sodique indépendant du potentiel. Par conséquent, le courant sodique de fuite généré par un changement de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  n'est pas dû à la présence de canaux sodiques dépendants du voltage dans le MnPO. Ainsi, tout comme le canal  $\text{Na}_X$ , le canal impliqué dans la détection du sodium dans les neurones du MnPO est un canal sodique de fuite insensible à la TTX.

Récemment, Noda a également indiqué que le fonctionnement des canaux sodiques de fuite  $\text{Na}_X$  semblait affecté par le rubidium sans donner plus de précisions [Noda and al., 2007]. Cette propriété a aussi été observée dans les canaux sodiques étudiés, présents dans le MnPO. En effet, nos résultats démontrent que l'application de rubidium inhibait la réponse des neurones du MnPO à une variation de sodium dans le milieu extracellulaire. Ceci

implique que le canal sodique responsable de la détection du sodium dans le MnPO est non seulement affecté par le rubidium, mais il est complètement bloqué par la présence de cet ion dans la solution extracellulaire. En plus du canal  $Na_X$ , à la connaissance de l'auteure, il existe seulement un autre type de canal, présent dans les neurones [Galvan, 1992], qui est affecté de cette manière par le rubidium : le canal potassique dépendant de l'ATP (*K<sub>ATP</sub> channel*) [Sala and al. 1991].

Ce canal potassique est présent dans les cellules pancréatiques [Ashcroft and al., 1990], dans les muscles du squelette [Wareham, 1992] et les muscles cardiaques [Noma and al., 1991]. Le canal potassique dépendant de l'ATP possède une perméabilité au sodium extracellulaire de 0,007 et intracellulaire de 0,39 par rapport à celle du potassium [Ashcroft and al., 1989]. Ainsi, bien qu'il ne soit pas très perméable au sodium, ce canal pourrait également être responsable des réponses observées lors des changements de la  $[Na^+]_{ext}$ . Toutefois, la présence de TEA [Davies and al., 1989] ou de 4-AP extracellulaire [Kakei and al., 1985] suffit pour bloquer le canal. Puisque ces deux agents pharmacologiques étaient utilisés en concentration suffisante pendant l'application transitoire de solutions contenant différentes concentrations en sodium sur les neurones du MnPO et que ces neurones réagissaient tout de même à une variation de la  $[Na^+]_{ext}$ , on peut en conclure que le canal potassique dépendant de l'ATP n'est pas impliqué dans la réponse observée. Ainsi, l'obstruction par le rubidium du canal sodique de fuite présent dans le MnPO et son insensibilité à la TTX sont d'autres indices en faveur du fait qu'il s'agirait du canal  $Na_X$ .

En conséquence, la présence du canal  $Na_X$  dans les neurones du MnPO ainsi que la similitude entre les propriétés de ce canal et du canal de fuite responsable du courant sodium généré par un changement de  $[Na^+]_{ext}$  dans le MnPO laissent fortement croire que le canal  $Na_X$  serait impliqué dans la détection du sodium dans le MnPO. En effet, le canal étudié est également un canal sodique de fuite impliqué dans la détection du  $Na^+$  extracellulaire dans le CNS, insensible à la TTX et affecté par l'application de rubidium. Toutefois, afin de valider qu'il s'agit du canal  $Na_X$ , il reste à déterminer que les neurones senseurs de sodium du MnPO, enregistrés à l'aide de la technique du patch-clamp, expriment le gène codant pour le canal  $Na_X$  tandis que les neurones insensibles à une

variation de la  $[\text{Na}^+]_{\text{ext}}$  ne possèdent pas ce gène. Pour ce faire, des neurones dissociés du MnPO pourront être récoltés après avoir fait des enregistrements électrophysiologiques afin de déterminer si ces neurones étaient ou non des senseurs de sodium. Ensuite, on pourra utiliser la technique de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) pour déterminer si le gène codant pour le canal  $\text{Na}_x$  est présent seulement dans les neurones du MnPO qui détectent le  $\text{Na}^+$ . Ainsi, cette démonstration confirmerait l'implication du canal sodique de fuite  $\text{Na}_x$  dans le mécanisme de détection du sodium des neurones du MnPO.

## **CHAPITRE 6**

### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

## 6. CONCLUSION GÉNÉRALE

Le MnPO est une région de l'hypothalamus relativement complexe qui reçoit et envoie des projections à plusieurs autres noyaux dans cette structure du cerveau. Il fait notamment partie intégrante du réseau impliqué dans la régulation de l'homéostasie hydrominérale. En plus d'intégrer des informations neurosensorielles provenant des autres organes de la lame terminale, le MnPO possède un mécanisme de détection spécifique pour le sodium. Les influx électriques provenant du MnPO influencent la libération d'hormones synthétisées par les neurones magnocellulaires du SON et du PVN, telles que la vasopressine et l'ocytocine qui sont directement impliquées dans l'osmorégulation et l'appétit pour le sel [Mckinley, 1999; Tanaka 1989]. Ainsi, la détection du sodium dans le CSF par les neurones du MnPO joue un rôle dans l'osmorégulation et dans les comportements motivés, comme la soif et l'appétit pour le sel. Notre étude avait donc pour but d'étudier les mécanismes responsables de la détection du sodium dans le MnPO.

Nos recherches ont mis en avant-plan la participation de neurones « senseurs » de sodium dans le MnPO qui réagissent spécifiquement à une variation de la  $[Na^+]_{ext}$  du CSF. On a également démontré que la détection du sodium dans le CSF est une propriété intrinsèque de ces neurones et qu'elle se fait par l'intermédiaire d'un canal sodique de fuite qui serait possiblement le  $Na_x$ . Le canal sodique  $Na_x$  est, en effet, impliqué dans la détection du sodium par le CNS et dans un mécanisme inhibant l'appétit pour le sel. En effet, les souris KO pour le gène  $Na_x$  consomment une quantité excessive de sodium lorsqu'elles sont privées d'eau [Watanabe and al., 2003]. En condition d'équilibre hydrominérale, les souris KO pour le gène  $Na_x$  démontrent également une plus grande préférence pour une solution contenant 150 mM de NaCl que pour l'eau, contrairement aux souris sauvages. Toutefois, aucune préférence pour des solutions contenant des concentrations de NaCl entre 3,75 mM et 100 mM par rapport à l'eau n'a été détectée chez les souris KO et les souris sauvages en condition normale. On peut alors considérer que le mécanisme responsable de la suppression de la surconsommation de sel ne fonctionne plus adéquatement chez les souris KO, qui ne possèdent plus le canal  $Na_x$ . Ce canal est donc impliqué dans un mécanisme qui inhibe la surconsommation de sel.

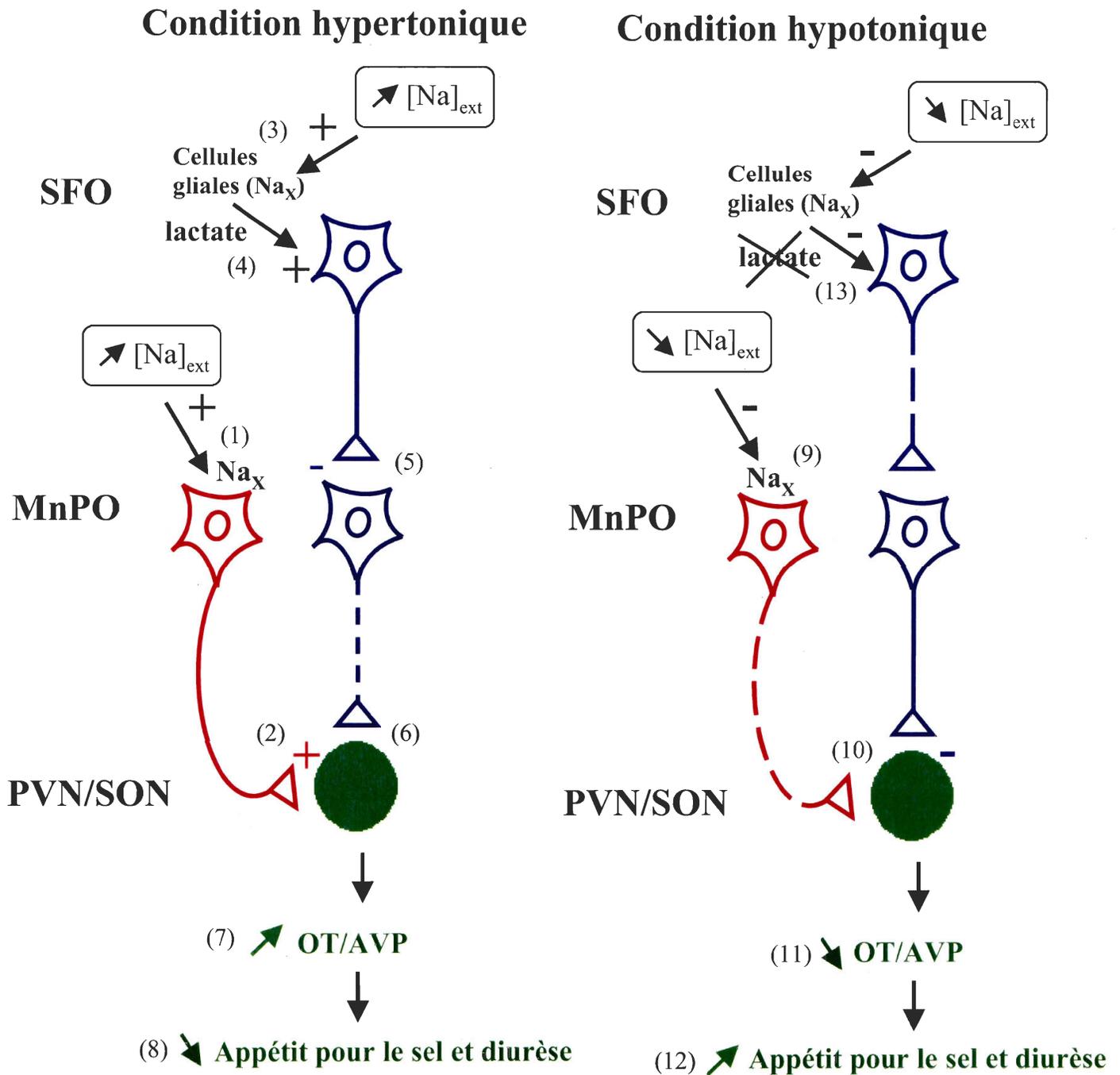
On peut ainsi supposer qu'en condition d'hypertonie, le courant sodique entrant généré par la présence des canaux  $\text{Na}_x$  [Figure 6.1(1)], exprimés dans les neurones du MnPO, permettrait l'activation de neurones excitateurs (en rouge) de ce noyau projetant vers le SON et le PVN. En effet, notre étude a montré que les neurones du MnPO se dépolarisent lorsqu'on applique différentes solutions hypertoniques extracellulaires sur le MnPO. Ceci aurait pour effet d'augmenter l'excitabilité des neurones magnocellulaires du SON et du PVN [Figure 6.1(2)] responsables de la libération d'ocytocine (OT) et de vasopressine (AVP) [Figure 6.1(7)]. L'appétit pour le sel serait donc inhibé par la libération d'OT et la diurèse diminuée par la sécrétion d'AVP [Figure 6.1(8)]. Dans des conditions d'hypotonie, la diminution de l'entrée de  $\text{Na}^+$  via les canaux  $\text{Na}_x$  a pour effet d'hyperpolariser les neurones du MnPO [Figure 6.1(9)], entraînant une baisse d'excitabilité des neurones du SON et du PVN [Figure 6.1(10)] responsables de la libération d'OT et d'AVP. Ceci aurait pour effet de lever l'inhibition de l'appétit pour le sel et d'augmenter la diurèse [Figure 6.1(12)] puisque l'OT et l'AVP ne seraient plus libérées [Figure 6.1(11)]. La présence d'un canal sodique de fuite dans le MnPO, possiblement le  $\text{Na}_x$ , serait ainsi très importante pour réguler adéquatement l'appétit pour le sel et la diurèse.

Pour compléter le fonctionnement du réseau neuronal impliqué dans le contrôle de l'homéostasie hydrominérale, Noda a également montré que l'excitabilité des neurones GABAergiques du SFO augmentait en condition d'hypertonie. En effet, le canal  $\text{Na}_x$  permet au sodium d'entrer à l'intérieur des cellules gliales en condition d'hypertonie [Figure 6.1(3)]. Le lactate est alors libéré par les cellules gliales produisant en retour la dépolarisation des neurones GABAergiques du SFO [Figure 6.1(4)]. On peut alors supposer que cette projection inhibitrice vers le MnPO inhiberait des neurones GABAergiques du MnPO [Figure 6.1 (5)]. Ces neurones pourraient projeter à leur tour vers les neurones magnocellulaires du SON et du PVN. Ainsi, la projection des neurones GABAergiques du SFO, activés par une hypertonie du plasma, vers le MnPO aurait pour effet d'empêcher l'inhibition des neurones magnocellulaires du SON et du PVN, augmentant la libération d'OT et d'AVP [Figure 6.1(6)]. L'augmentation de la sécrétion de ces hormones [Figure 6.1(7)] renforcerait donc l'inhibition de l'appétit pour le sel ainsi que de la diurèse [Figure 6.1(8)]. Toutefois, en conditions d'hypotonie, ce contrôle ne pourrait s'exercer, car

l'excitabilité des neurones GABAergiques du SFO ne serait pas augmentée par la présence du lactate secrété par les cellules gliales uniquement en conditions d'hypertonie [Figure 6.1(13)]. L'absence de ce contrôle inhibiteur des neurones GABAergiques du MnPO provoquerait une inhibition de la libération d'OT et d'AVP [Figure 6.1(11)]. Cette hypothèse est soutenue par des données neuro-anatomiques qui ont montré que le MnPO possède une population neuronale inhibitrice qui s'active lors d'un déficit en  $\text{Na}^+$  dans les compartiments liquidiens extracellulaires [Grob and al., 2003]. La figure 6.1 schématise le fonctionnement du mécanisme cellulaire qui pourrait impliquer le canal sodique de fuite, possiblement de type  $\text{Na}_x$ , responsable de la détection du sodium dans le MnPO et le SFO. Ainsi, le canal sodique de fuite présent dans les neurones du MnPO pourrait avoir un rôle important à jouer dans le mécanisme de régulation de l'appétit pour le sel et dans la diurèse. Cela reste cependant à démontrer.

Figure 6.1

Hypothèse du mécanisme cellulaire impliquant les canaux  $\text{Na}_x$  dans la régulation de l'appétit pour le sel et de la diurèse



**Figure 6.1 :** Le MnPO possède deux populations de neurones : les neurones inhibiteurs (en bleu) et les neurones excitateurs (en rouge) qui seraient impliqués dans un mécanisme de régulation de l'appétit pour le sel et de la diurèse. Toutefois, dans le SFO, ce seraient uniquement les neurones GABAergiques (en bleu) qui seraient impliqués dans la détection du sodium permettant la régulation de l'appétit pour le sel. Dans ce mécanisme, des cellules de l'hypothalamus (neurones, cellules gliales) sont activées (+) tandis que d'autres sont inhibées (-). Les lignes verticales pleines représentent les projections neuronales actives, existant entre les neurones des différents noyaux impliqués dans ce mécanisme de régulation de l'appétit pour le sel et de la diurèse, tandis que les lignes pointillées montrent les projections qui sont inhibées. Le cercle vert représente les neurones du PVN et du SON responsables de la sécrétion de vasopressine (AVP) et d'ocytocine (OT).

## **BIBLIOGRAPHIE**

Ambard L, Beaujard E (1904) Causes de l'hypertention artérielle. Arch Gen Med 1 : 520-533.

Andersson B, Olsson K (1973) On central control of body fluid homeostasis. Cond Reflex 8: 147-149.

Andersson B, Leksell LG, Lishajko F (1975) Perturbations in fluid balance induced by medially placed forebrain lesions. Brain Res 99: 261-275.

Andersson B (1978) Regulation of water intake. Physiol Rev 58: 582.

Aradachi H, Honda K, Negoro H, Kubota T (1996) Median preoptic neurones projecting to the supraoptic nucleus are sensitive to haemodynamic changes as well as to rise in plasma osmolality in rats. J Neuroendocrinol 8: 35-43

Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP (1989) Rubidium and sodium permeability of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in single rat pancreatic  $\beta$ -cells. Journal of Physiology 408: 413-430.

Ashcroft SJH, Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. Cell Signal 2:197-214.

Association médicale du Canada (2003) Guide familial des symptômes- Tension basse (hypotension artérielle) Amc Ca

Bealer SL, Haywood JR, Gruber KA, Buckalew VM Jr, Fink GD and al. (1983) Preoptic-hypothalamic periventricular lesions reduce natriuresis to volume expansion. Am J Physiol 244: R51-R57.

Beauchamp GK (1987) The human preference for excess salt. American Scientist 75: 27-33.

Binstock L (1976) Permeability of the sodium channel in *Myxicola* to organic cation. J Gen Physiol 68: 551-562.

Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG (1993) Central oxytocin inhibition salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. Proc Natl Acad Sci USA 90 (21): 10380-10384.

Bourque CW, Oliet SH, Richard D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. Front Neuroendocrinol 15: 231-274.

Braü ME, Branitzkit P, Olshewiski A, Vogel W, Hempelmann G (2000) Block of neuronal tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents by stereoisomers of piperidine local anesthetics. Anesth Analg 91: 1499-1505.

Brimble MJ, Dyball REJ, Forsling ML (1978) Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. *J Physiol* 278: 69-78.

Buggy J, Johnson AK (1977) Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: Thirst deficits and hypernatremia. *Am J Physiol* 233: R44-R52.

Burke AP, Farb A, Liang YH, Smialek J, Virman R (1996) Effect of hypertension and cardiac hypertrophy on coronary artery morphology in sudden cardiac death. *Circulation* 94(12): 3138-3145.

Bursey RJ, Watson ML (1983) The effect of sodium restriction during gestation of offspring brain development in rats. *Am J Clin Nutr* 37, 43-51.

Campbell DT (1976) Ionic selectivity of the sodium channel of frog skeletal muscle. *J Gen Physiol* 67: 295-307.

Chiraraviglio E, Perez Guaita MF (1986) The effect of intracerebroventricular hypertonic infusion on sodium appetite in rats after peritoneal dialysis. *Physiol Behav* 37: 695-699.

Ciura S, Bourque CW (2006) Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *The Journal of Neuroscience* 26(35): 9069-9075.

Cunningham JT, Beltz TG, Johnson RF, Johnson AK (1992) The effects of ibotenate lesions of the median preoptic nucleus on experimentally induced and circadian drinking behaviours in rats. *Brain Res* 653: 305-314.

Davies NW, Spruce AE, Standen NB, Standfield PR (1989) Multiple blocking mechanisms of ATP-sensitive potassium channels of frog skeletal muscle by tetraethylammonium ions. *J Physiology* 413: 31-48.

Decavel C, Hatton GI (1995) Taurine immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus: prominent localization in glial cells. *J Comp Neurol* 354: 13-26.

Deleuze C, Duvoid A, Hussy N (1998) Properties and glial origin of osmotic-dependent release of taurine from the rat supraoptic nucleus. *J Physiol Lond* 507: 463-471.

Doi Y, Nose H, Morimoto T (1992) Changes in Na concentration in cerebrospinal fluid during acute hypernatremia and their effect on drinking in juvenile rats. *Physiol Behav* 52: 499-504.

Dorn J, Rothballer AB (1973) Essential hypernatremia. The experimental model. *Arch Neurol* 28: 83-90.

Ferguson AV, Bains JS (1996) Electrophysiology of the circumventricular organs. *Front Neuroendocrinol* 17: 440-475.

Fine BP, Ty A, Lestrangle N, Levine OR (1987) Sodium deprivation growth failure in the rat: alterations in tissue composition and fluid spaces. *J Nutr* 117: 1623-1628.

Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78: 583-686.

Galvan M (1992) Potassium channels in mammalian neurones: their properties and prospects for pharmacological manipulation. *Blackwell Sci* : 204-236.

Gardiner TW, Stricker EM (1985) Hyperdipsia in rats after electrolytic lesions of nucleus medianus. *Am J Physiol* 248: R214-R223.

Geerling JC, Loewy AD (2008) Central regulation of sodium appetite. *Exp Physiol* 93.2: 177-209.

Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB and al. (2000) Nomenclature of voltage-gated Na channels. *Neuron* 28: 365-368.

Greene G (1977) *La puissance et la gloire. Le livre de Poche* : 319 p.

Grob M, Trottier JF, Drolet G, Mougnot D (2003) Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge. *Neuroscience* 122: 247-257.

Grob M, Drolet G, Mougnot D (2004) Specific Na<sup>+</sup> sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 24: 3974-3984.

Guyton C, Hall E (2003) *Précis de Physiologie Médicale. Deuxième édition française.*

Hermann A, Gorman LF (1981) Effects of 4-aminopyridine on potassium currents in a molluscan neuron. *J Gen Physiol* 78: 63-86.

Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes, third edition.* Sinauer Associates 441-471.

Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, Noda M (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat Neurosci* 5: 511-512.

Hussy N, Deleuze C, Desarmenien MG, Moos FC (2000) Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Prog Neurobiol* 62: 113-134.

Hussy N, Bres V, Rochette M, Duvoid A, Alonso G, Dayanithi G, Moos FC (2001) Osmoregulation of vasopressin secretion via activation of neurohypophysial nerve terminals glycine receptors by glial taurine. *J Neurosci* 21: 7110-7116.

Joffres MR, Campbell NR, Manns B, Tu K (2007) Estimate of the benefits of a population-based reduction in dietary sodium additives on hypertension and its related health care costs in Canada. *Can J Cardiol* 23: 437-443.

Johson AK (1985) Role of the periventricular tissue surrounding the anteroventral third centricule (AV3V) in the regulation of body fluid homeostasis. *Vasopressin New York Ravens* 506: 319-331.

Takei M, Noma A, Shibasaki T (1985) Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 363: 441-462.

Kolaj M, Renaud LP (2001) Norepinephrine acts via  $\alpha_2$  adrenergic receptors to suppress N-type calcium channels in dissociated rat median preoptic nucleus neurons. *Neuropharmacology* 41: 472-479.

Kumar S, Berl T (1998) Sodium. *Lancet* 352: 220-228.

Lassonde A (2005) L'hypernatrémie une conséquence salée de la déshydratation. *Le Médecin du Québec* 40 (12) : 59-62.

Liedtke W, Friedman JM (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13698-13703.

Liedtke W (2007) Role of TRPV ion channels in sensory transduction of osmotic stimuli in mammals. *Exp Physiol* 92.3: 507-512.

Makhanova N, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Kim HS, Smithies O (2006) Disturbed homeostasis in sodium-restricted mice heterozygous and homozygous for aldosterone synthase gene disruption. *Hypertension* 48: 1151-1159.

Mangiapane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF (1983) Deficits in drinking and vasopressin secretion after lesion of the nucleus medianus. *Neuroendocrinol* 37: 73-77.

Mangiapane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF (1984) Role for the subfornical organ in vasopressin release. *Brain Res Bull* 13: 43-47.

Marazziti D, Bani A, Casamassima F, Catena M, Consoli G, Gesi C, Iovieno N, Masei JG, Muti M, Ravani L, Romano A, Roncaglia I, Scarpellini P (2006) Oxytocin: an old hormone for new avenues. *Clinical Neuropsychiatry* 3 (5): 302-321.

Mckinley MJ, Denton DA, Leksell LG and al. (1982) Osmoregulatory thirst in sheep is disrupted by ablation of the anterior wall of the optic recess. *Brain Res* 236: 210-215.

McKinley MJ, Denton DA, Levender M and al. (1986) Adipsia in sheep caused by cerebral lesions. The physiology of thirst and sodium appetite. New York. Plenum Press 321-326.

McKinley MJ, Denton DA, Coghlan JP, Harvey RB, McDougall JG and al. (1987) Cerebral osmoregulation of renal sodium excretion-A response analogous to thirst and vasopressin release. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 1724-1729.

McKinley MJ (1992) Common aspects of the cerebral regulation of thirst and renal sodium excretion. *Kidney Int* 41(Suppl.37): S102-S106.

McKinley MJ, Hards DK, Oldfield BJ (1994) Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. *Brain research* 653: 305-314.

McKinley MJ, Mathai ML, Pennington G, Rundgren M, Vivas L (1998) The effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol* 276: R673-R683.

McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H (1999) The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *Journal of Clinical Neuroscience* 6(4): 289-301.

McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield BJ (2003) The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. Sunfornical organ, OVLT and area postrema. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 172: 1-127.

Meneton P (2001) Le chlorure de sodium dans l'alimentation : un problème de santé publique non résolu. *NAFAS Science* 5 : 1-19.

Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93: 829-838.

Naeini RS, Ciura S, Bourque CW (2006) Les TRPV, des canaux qui vous donnent soif! *M/S* no 12, 22 : 1035-1037.

Narahashi T, Moore JW, Scott WR (1964) Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *The journal of general physiology* 47: 965-974.

Noda M (2006) The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. *The Neuroscientist* 12: 80-91.

Noma A, Takano M (1991) The ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol* 41: 177-187.

Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Takemoto F, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I (1997) Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid volume depletion. *J Clin Invest* 99: 855-860.

Oliet SH, Bourque CW (1993) Mechanosensitive channels transducer osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 364: 341-343.

Oliet SH, Bourque CW (1994) Osmoreception in magnocellular neurosecretory cells: from single channels to secretion. *Trends Neurosci* 17: 340-344

Oliet SH, Bourque CW (1997) Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 59: 601-619

Orent-Keiles E, Robinson A, McCollum EV (1937) The effects of sodium deprivation on the animal organism. *Am J Physiol* 119: 651-661.

Orlov SN, Mongin AA (2007) Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2039-H2053

Osborne PG, Denton DA, Weisinger RS (1987) Effect of variation of the composition of CSF in the rat upon drinking of water and hypertonic NaCl solutions. *Behav Neurosci* 3: 371-377.

Riaz K (1996) Excerpt from hypertensive heart disease. WebMD ([www.emedicine.com](http://www.emedicine.com))

Rundgren M, Fyhrquist F (1978) A study of permanent adiposia induced by medial forebrain lesions. *Acta Physiol Scand* 103: 463-471.

Sala S, Matteson DR (1991) Voltage-dependent slowing of K channel closing kinetics by  $Rb^+$ . *J Gen Physiol* 98: 535-554.

Scholz A, Appel N, Vogel W (1998) Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive  $Na^+$  channel in rat dorsal root ganglion neurons and their blockade by halothane. *Eur J Neurosci* 10(8): 2547-2556.

Sharif-Naeini R, Ciura S, Zhang Z, Bourque CW (2008) Contribution of TRPV channels to osmosensory transduction, thirst, and vasopressin release. *Kidney International* 73: 811-815.

Shimizu H, Watanabe E, Takeshi YH, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M (2007) Glial  $Na_x$  channels control lactate signalling to neurons for brain  $[Na^+]$  sensing. *Neuron* 54: 59-72.

Skott O (2003) Body sodium and volume homeostasis *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R14-R18.

Svoboda KR, Lupica CR (1998) Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I<sub>h</sub>) currents. *The Journal of Neuroscience* 18(18): 7084-7098.

Tanaka J (1989) Involvement of the median preoptic nucleus in the regulation of paraventricular vasopressin neurons by the subfornical organ in the rat. *Exp Brain Res* 76: 47-54.

Thrasher NT, Brown CJ, Keil LC, Ramsay DJ (1980) Thirst and vasopressin release in the dog : an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 238: R333-R339.

Thrasher TN, Keil LC, Ramsay DJ (1982) Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically induced drinking and vasopressin secretion in dog. *Endocrinology* 110: 1837-1839.

Thunhorst RL, Ehrlich KJ, Simpson JB (1990) Subfornical organ participates in salt appetite. *Behav Neurosci* 104: 637-642.

Torp R, Haug FM, Tonder N, Zimmer J, Ottersen OP (1992) Neuroactive amino acids in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical study of the distribution of GABA, glutamate, glutamine and taurine. *Neuroscience* 46: 807-823.

Tsushima H, Mori M (2006) Antidipsogenic effects of a TRPV4 agonist, 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate, injected into the cerebroventricle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1736-R1741.

Verbalis JG (2003) Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17: 471-503.

Voisin DL, Chakfe Y, Bourque CW (1999) Coincident detection of CSF Na<sup>+</sup> and osmotic pressure in osmoregulatory neurons of the supraoptic nucleus. *Neuron* 24:453-460.

Wareham AC (1992) Skeletal muscle potassium channels and their relevance to muscle disease. *Blackwell Sci* : 237-271.

Watanabe E, Hiyama TY, Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, Yanagawa Y, Obata K, Noda M (2006) Na-level-sensitive Na channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R568-R576.

Watanabe U, Shimura T, Sako N, Kitagawa J, Shingai T, Watanabe E, Noda M, Yamamoto T (2003) A comparison of voluntary salt-intake behavior in Na<sub>x</sub>-gene deficient and wild-type mice with reference to peripheral taste inputs. *Brain research* 967: 247-256.

Weisinger RS, Considine P, Denton DA, McKinley MJ (1979) Rapid effect of change in cerebrospinal fluid sodium concentration on salt appetite. *Nature* 280: 490-491.

Weisinger RS, Considine P, Denton DA, Leksell L, McKinley MJ, Mouw DR, Muller AF, Tarjan E (1982) Role of sodium concentration of the cerebrospinal fluid in the salt appetite of sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 242: R51-R63.

Whitworth JA and al. (2003) World Health Organization/International Society of Hypertension statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21(11): 1983-1992.

Wissenbach U, Bodding M, Freichel M, Flockerzi V (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* 485: 127-134.

Zadertto-Smith AM, Johnson AK (1995) Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. *Neuroscience Letters* 199: 215-219.

Zhang Z, Bourque CW (2006) Calcium permeability and flux through osmosensory transduction channels of isolated rat supraoptic nucleus neurons. *Eur J Neurosci* 23: 1491-1500.

**ANNEXE**

## ANNEXE I

### Équation modifiée de Goldman-Hodgkin-Katz

Afin de calculer l'équation donnant directement la perméabilité du canal pour un ion spécifique (X) par rapport au sodium ( $P_X/P_{Na^+}$ ), on a utilisé l'équation générale de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) qui donne le potentiel d'inversion ( $E_{Xi}$ ) d'une solution composée des ions  $X_1$  et  $X_2$ :

$$E_{Xi} = \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{X1} [X_1]_{ext} + P_{X2} [X_2]_{ext} + \dots}{P_{X1} [X_1]_{int} + P_{X2} [X_2]_{int} + \dots} \right) \quad (1)$$

où R représente la constante des gaz parfaits, T la température en Kelvin, Z la charge de l'ion, F la constante de Faraday,  $P_{Xi}$  la perméabilité du canal à l'ion ainsi que  $[X_i]_{ext}$  et  $[X_i]_{int}$  (avec  $i = 1, 2, \dots$ ) qui représente respectivement la concentration extracellulaire et intracellulaire de l'ion.

On a d'abord déterminé expérimentalement le potentiel d'inversion du courant généré par une solution hypertonique ( $E_{Na^+}$ ). Comme il y avait un seul ion d'impliqué, l'équation 1 est devenue celle de Nernst pour le sodium ( $Na^+$ ):

$$E_{Na^+} = \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}}{P_{Na^+} [Na^+]_{int}} \right) \quad (2)$$

où  $P_{Na^+}$  est la perméabilité du canal au sodium,  $[Na^+]_{int}$  et  $[Na^+]_{ext1}$  sont respectivement la concentration intracellulaire (100 mM) et extracellulaire (150 mM) de sodium.

On a ensuite testé une nouvelle solution pour trouver expérimentalement le potentiel d'inversion de l'ion X ( $E_X$ ), soit le lithium ou la guanidine, alors l'équation 1 est devenue :

$$E_X = \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext2} + P_X [X]_{ext}}{P_{Na^+} [Na^+]_{int}} \right) \quad (3)$$

où  $P_X$  est la perméabilité du canal à l'ion X,  $[X]_{ext}$  la concentration extracellulaire de l'ion X (50 mM),  $[Na^+]_{int}$  et  $[Na^+]_{ext2}$  sont respectivement la concentration intracellulaire (100 mM) et extracellulaire (100 mM) de sodium. La concentration intracellulaire de l'ion X n'apparaît pas dans l'équation puisqu'elle était de zéro.

En soustrayant l'équation (2) de (3), on a obtenu :

$$E_X - E_{Na^+} = \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext2} + P_X [X]_{ext}}{P_{Na^+} [Na^+]_{int}} \right) - \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}}{P_{Na^+} [Na^+]_{int}} \right) \quad (4)$$

À l'aide de la propriété de soustraction des logarithmes,

$$\ln\left(\frac{a}{b}\right) = \ln(a) - \ln(b)$$

on a trouvé:

$$E_X - E_{Na^+} = \left( \frac{RT}{ZF} \right) \ln \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext2} + P_X [X]_{ext}}{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}} \right) \quad (5)$$

Comme la concentration intracellulaire de sodium est la même dans l'équation 2 et 3, on a pu simplifier ces termes. On a ensuite isolé  $P_X/P_{Na^+}$  :

$$e^{\frac{E_X - E_{Na^+}}{\left(\frac{RT}{ZF}\right)}} = \left( \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext2} + P_X [X]_{ext}}{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}} \right) \quad (6)$$

$$e^{\frac{E_X - E_{Na^+}}{\left(\frac{RT}{ZF}\right)}} - \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext2}}{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}} = \frac{P_X [X]_{ext}}{P_{Na^+} [Na^+]_{ext1}} \quad (7)$$

$$\frac{P_X}{P_{Na^+}} = \frac{[Na^+]_{ext1}}{[X]_{ext}} e^{\frac{E_X - E_{Na^+}}{\left(\frac{RT}{ZF}\right)}} - \frac{[Na^+]_{ext2}}{[X]_{ext}} \quad (8)$$

On est finalement arrivé à l'équation de GHK modifiée :

$$\frac{P_X}{P_{Na^+}} = \frac{[Na^+]_{ext1}}{[X]_{ext}} \left[ e^{\frac{E_X - E_{Na^+}}{\left(\frac{RT}{ZF}\right)}} - \frac{[Na^+]_{ext2}}{[Na^+]_{ext1}} \right] \quad (9)$$

Lors de l'étude, les concentrations utilisées étaient de:

$$[Na^+]_{ext1} = 150 \text{ mM}$$

$$[X]_{ext} = 50 \text{ mM ou X représente le lithium ou la guanidine}$$

$$[Na^+]_{ext2} = 100 \text{ mM}$$

En insérant ces chiffres dans l'équation, on a trouvé :

$$\frac{P_X}{P_{Na^+}} = 3 e^{\frac{E_X - E_{Na^+}}{RT/ZF}} - 2 \quad (10)$$

La valeur de (RT/ZF) a été déterminée à l'aide des valeurs de chaque constante:

$$R = 8,31447 \text{ J/K.mol}$$

$$F = 96485 \text{ C/mol}$$

$$Z = +1 \text{ (pour le sodium, le lithium et la guanidine)}$$

$$T = 25^\circ\text{C} = 298,15 \text{ K}$$

Donc,  $RT/ZF = 0,025692 \text{ eV}$

Ainsi, en connaissant la différence entre le potentiel d'inversion de l'ion X et celui du sodium ( $E_X - E_{\text{Na}^+}$ ), on a été en mesure de déterminer le ratio de perméabilité pour l'ion X. Toutefois, l'équation 10 s'applique uniquement dans le cas où on utilise les valeurs de concentration indiquées ci dessus et où la concentration de sodium dans la solution intracellulaire ne change pas.