

LOUIS NADEAU

**Simulations informatiques dans le contexte de
l'homéostasie hydrominérale chez le rat**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat neurobiologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)

Faculté de Médecine
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Merci à Élyse qui m'a encouragé et aidé tout au long de mes études et dans ma vie, à Francis, Karel et Fred qui m'ont aidé moralement et scientifiquement et à ma famille qui m'a soutenu pendant mes études. Merci aussi à Didier Mouginot, mon directeur de thèse, pour m'avoir supporté tout au long de mon doctorat et pour avoir pris un risque en se lançant dans le domaine de la simulation.

Résumé

L'homéostasie hydrominérale (HH) est un système essentiel à la survie des mammifères. Un des mécanismes principaux de l'HH est le contrôle du volume et de la concentration de l'urine au niveau du rein par plusieurs systèmes hormonaux dont celui de la vasopressine (AVP). L'AVP est l'hormone anti-diurétique principale, sa concentration plasmatique augmente en situation d'hypernatrémie ou d'hypovolémie pour conserver l'eau de l'organisme. L'AVP est synthétisée par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques (MCNs) du noyau supraoptique et paraventriculaire, et, en fonction de l'activité électrique des MCNs, elle est sécrétée par la neurohypophyse. Dans cette thèse, des simulations ont été utilisées dans le contexte de l'HH pour atteindre trois objectifs : (1) la création d'une simulation de l'HH du rat, (2) la création d'une simulation de l'osmodétection utilisant un modèle de MCN individuel et (3) la création d'une population simulée de MCNs et d'une dynamique de la concentration d'AVP. Plusieurs prédictions ont été faites grâce à ces simulations pendant l'atteinte des objectifs : (1) la simulation a mis en lumière trois périodes dans le cycle circadien de l'HH. Elle a aussi montré l'importance de l'ingestion d'eau au début de la période de sommeil et de l'effet tampon du compartiment intracellulaire sur les fluctuations quotidiennes de l'HH. Finalement, l'utilité de la simulation comme un outil pratique pour établir un protocole expérimentale a été démontrée par la simulation d'une déplétion en sodium utilisant un composé pharmacologique : le furosémide. (2) L'étude du comportement du neurone simulé soumis à une augmentation d'osmolarité nous a permis de proposer une addition au mécanisme régulant la longueur des bouffées de potentiels d'action (PAs), une fatigue de la sécrétion de dynorphine, et nous a permis de réconcilier des données *in vivo* et *in vitro* incohérentes au sujet de l'impact des synapses sur les bouffées de PAs. (3) L'implémentation de la population de MCNs nous a permis de découvrir que c'est une hétérogénéité dans la sensibilité à la dynorphine autocrine qui cause les différences de comportement électrique observées expérimentalement. Finalement, la simulation nous a permis d'analyser l'importance relative des mécanismes de facilitation et de fatigue du couplage stimulus-sécrétion de l'AVP.

Table des matières

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	xi
Table des figures	xii
Glossaire	xvi
1 Introduction	1
1.1 Contexte de cette thèse	1
1.1.1 Pourquoi utiliser des simulations informatiques en biologie? . .	2
1.1.2 Pourquoi simuler les principaux mécanismes constituant l'homéostasie hydrominérale, ainsi que l'activité électrique des neurones magnocellulaires vasopressinergiques?	2
1.2 Introduction au concept d'homéostasie	4
1.2.1 Définition de l'homéostasie	4
1.2.2 Les réservoirs d'eau et d'ions du corps et principe d'osmolarité .	6
1.2.2.1 Voies d'entrée pour l'eau et les ions : Appétit et soif .	8
1.2.2.2 Voies de sortie de l'eau et des ions : Urine, sueur, respiration et excréments	9
1.2.3 L'hormone antidiurétique principale : la vasopressine	9
1.2.3.1 Autres hormones de l'homéostasie hydrominérale . . .	10
1.2.4 Les noyaux supraoptiques et paraventriculaires synthétisent et sécrètent la vasopressine	11
1.2.4.1 Détection intrinsèque de l'osmolarité par les neurones magnocellulaires	12
1.2.4.2 Signaux extrinsèques du niveau osmolarité qui sont transmis aux neurones magnocellulaires	12
1.3 Introduction aux simulations	13
1.3.1 Définition des termes	13
1.3.2 Principes de modélisation et de simulation	14

1.4	Introduction au neurone et à sa modélisation mathématique	16
1.4.1	Anatomie et fonctionnement général du neurone	16
1.4.2	Traitement du signal fait par les dendrites	17
1.4.3	Propagation électrique passive	18
1.4.4	Propriétés électriques actives	20
1.4.5	Effet de la géométrie 3D des composantes des neurones sur leurs modélisations électriques	24
1.4.5.1	Propagation saltatoire	24
1.4.5.2	Propagation des signaux dans un arbre dendritique com- plexe	25
1.4.6	Éléments de physiologie essentiels pour modéliser un neurone magnocellulaire vasopressinergique	26
1.4.7	Les modèles déjà existant et leurs fonctions	27
1.4.8	Modifications du modèle de MCN de Roper et al.	31
1.5	Objectifs de la thèse	35
1.5.1	Objectif 1 : Création d’une simulation de l’homéostasie hydromi- nérale du rat	36
1.5.2	Objectif 2 : Création d’une simulation de l’osmodétection utilisant un modèle de MCN individuel	37
1.5.3	Objectif 3 : Création d’une population simulée de neurones ma- gnocellulaires et d’une dynamique de la [AVP] simulée	37
2	Simulation de l’homéostasie hydrominérale du rat : article 1	39
2.1	Résumé de l’article traduit en français	39
2.2	Abstract	40
2.3	Background	41
2.4	Methods	42
2.4.1	Biological parameters	42
2.4.2	Software	43
2.4.3	The model architecture	43
2.4.3.1	System 1; the meta-box “body fluids”	44
2.4.3.2	System 2; the meta-box “AVP secreting magnocellular neurons”	44
2.4.3.3	System 3; the meta-box “Kidney”	45
2.4.3.4	System 3; the meta-box “Digestive system”	47
2.4.3.5	System 3; the box “Unregulated water balance”	48
2.4.3.6	System 3; the meta-box “Hydromineral challenge”	49
2.4.3.7	Challenge 1 : intracellular dehydration	49
2.4.3.8	Challenge 2 : extracellular dehydration	49
2.5	Experimental measurements	49
2.6	Results	51

2.6.1	Computed predictions under control hydromineral conditions . . .	51
2.6.2	Validation of the model by experimental data	52
2.6.3	Role of early water intake in reducing variability of ECF [Na+] and circulating AVP level	53
2.6.4	Role of the ICF compartment in reducing variability of ECF [Na+] and circulating AVP level	55
2.6.5	Challenge 1 : Intracellular (osmotic) dehydration	55
2.6.6	Challenge 2 : Extracellular (hypovolemic) dehydration	56
2.7	Discussion	58
2.7.1	Assumptions on the inputs to the body fluid compartments . . .	58
2.7.2	Assumptions on the outputs to the body fluid compartments . .	63
2.7.3	Focus on the long-term simulation of hydromineral balance . . .	64
2.7.4	Focus on the simulations of hydromineral challenges	65
2.8	Conclusion	66
2.9	Acknowledgements	67
2.10	References	67
2.11	Fichiers additionnels du premier article	71
2.11.1	Fichier additionnel 1	71
2.11.2	Fichier additionnel 2	72
2.11.3	Fichier additionnel 3	72
2.12	Informations supplémentaires au sujet des travaux effectués	72
2.12.1	Scilab - Scicos	72
2.13	Liens avec les objectifs suivants de la thèse	73
3	Simulation des neurones magnocellulaires : article 2	74
3.1	Résumé français	74
3.2	Abstract	75
3.3	Introduction	76
3.4	Methods	77
3.4.1	Model of the mechanosensitive channel	77
3.4.2	Osmotic dependence of the activation function m_{MSC}	77
3.4.3	Calculation of g_{MSC} and update of g_{Na} and g_K	78
3.4.4	Reversal potential of I_{MSC}	78
3.4.5	Synaptic transmission afferent to the SON	79
3.4.6	EPSP and IPSP frequencies used in the MCN model	80
3.4.7	EPSP and IPSP amplitude and time constant	80
3.5	Results	81
3.5.1	IV Curves of the MCN under hypo- and hyperosmotic CSF . . .	81
3.5.2	IV Curves of the MCN under hypo- and hypernatriuric CSF . .	84
3.5.3	MSC and synaptic impact on osmolality-induced changes in the MCN firing pattern	84

3.5.4	Prediction of a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal	85
3.5.5	Prediction of the impact of the synaptic events on burst generation	86
3.5.6	Prediction of the impact of synaptic events on firing rate and spiking behavior	88
3.6	Discussion	88
3.6.1	Insight from the simulation : dynorphin release is controlled by a frequency-dependent fatigue mechanism	92
3.6.2	Insight from the simulation : impact of synaptic inputs on both the MCN firing rate and firing pattern	93
3.7	Acknowledgement	94
3.8	References	94
3.9	Fichiers additionnels du deuxième article	97
3.9.1	Fichier additionnel 1	97
3.9.2	Fichier additionnel 2	98
3.9.3	Fichier additionnel 3	98
3.9.4	Fichier additionnel 4	98
3.10	Informations supplémentaires au sujet des travaux effectués	98
3.10.1	Code Scilab	98
3.10.2	Erreurs numériques	99
3.10.2.1	Équation « stiff »	100
3.11	Liens avec les objectifs	101
4	Population de MCNs simulée et dynamique de la [AVP] : article 3	102
4.1	Résumé français	102
4.2	Abstract	103
4.3	Introduction	104
4.4	Methods	105
4.4.1	Quantitative method to categorize the MCN firing pattern . . .	105
4.4.2	Implementation of the stimulus-secretion coupling in the MCNs	106
4.4.2.1	1) Implementation of the spike train propagation . . .	106
4.4.2.2	2) Implementation of the facilitation mechanism of AVP release	107
4.4.2.3	3) Computation of the mean AVP release per spike . . .	108
4.4.3	Implementation of the AVP concentration dynamics simulation	108
4.5	Results	110
4.5.1	Predicted mechanisms underlying the firing behavior of individual MCNs	110
4.5.1.1	Impact of the amplitude and frequency of the postsynaptic potentials	110
4.5.1.2	Impact of the current injection (membrane potential) . . .	112
4.5.1.3	Impact of the dynorphin secretion	112

4.5.2	Simulating the actions of the κ -opioid receptor agonist and antagonist unravels the determinant of the MCN firing behavior . . .	114
4.5.3	Validation of the MCN population using osmotic challenges . . .	116
4.5.4	Quantitative secretion of AVP predicted from the simulated MCN population	118
4.6	Discussion	120
4.6.1	Insight from the simulation : autocrine Dynorphin secretion and distribution of the resting membrane potential are the two critical determinants underlying the variety of firing behaviors in the MCN population	120
4.6.2	Insight from the simulation : spike propagation failure and facilitation of vesicular release are critical determinants underlying the overall [AVP]	123
4.6.3	Insight from the simulation : The large theoretical range of mean AVP release per spike introduces flexibility into the model . . .	125
4.6.4	Further development of the model implementing AVP dynamics	125
4.7	Acknowledgement	126
4.8	References	126
4.9	Fichiers additionnels du troisième article	129
4.9.1	Fichier additionnel 1	129
4.9.2	Fichier additionnel 2	131
4.9.3	Fichier additionnel 3	134
4.9.4	Fichier additionnel 4	136
4.10	Informations supplémentaires	139
4.10.1	MySQL	139
4.10.2	Parallélisation	141
4.11	Liens avec les objectifs	142
5	Discussion et conclusion	143
5.1	Atteinte des objectifs	143
5.2	Mise en valeur des prédictions	143
5.2.1	Premier article : Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis .	144
5.2.1.1	Existence de trois périodes dans le cycle circadien de l'homéostasie hydrominérale chez le rat	144
5.2.1.2	Fluctuations quotidiennes de la balance hydrominérale	145
5.2.1.3	Importance de l'ingestion d'eau en début de nuit . . .	145
5.2.1.4	Le compartiment intracellulaire comme tampon	146
5.2.1.5	Utilité de la simulation pour établir un protocole expérimental	147

5.2.2	Deuxième article : New determinants of firing rates and patterns of vasopressinergic magnocellular neurons : predictions using a mathematical model of osmodetection.	147
5.2.2.1	Quatre types de patrons de décharge de potentiels d'action	148
5.2.2.2	Présence d'un mécanisme de fatigue de la sécrétion de dynorphine	148
5.2.2.3	Les bouffées de potentiels d'action peuvent être intrinsèquement régénératives	149
5.2.2.4	Effet des entrées synaptiques sur l'activité électrique des MCNs	150
5.2.3	Troisième article : Quantitative prediction of vasopressin secretion using a computational population model of rat magnocellular neurons	150
5.2.3.1	Isolation du mécanisme causant l'hétérogénéité comportementale des neurones magnocellulaires vasopressinergiques	151
5.2.3.2	La distribution des potentiels membranaires au repos des neurones magnocellulaires est un paramètre critique	152
5.2.3.3	Importance des mécanismes de facilitation de la sécrétion d'AVP et des échecs dans la conduction axonale des potentiels d'action	153
5.3	Continuité du projet	154
5.3.1	Objectif 4 : insertion de la simulation créé à l'objectif 3 dans le banc-d'essai créé à l'objectif 1	154
5.3.2	Logiciel et performance	156
5.3.2.1	Utilisation d'un autre intégrateur et de pas variables	157
5.3.2.2	Simulation basée sur une librairie	158
5.3.3	Améliorations de l'aspect physiologique des modèles présentés	159
5.4	Pertinence de la simulation en physiologie	160
5.4.1	Productivité liée à la simulation dans le contexte d'étude de cette thèse	160
5.4.2	Difficulté de maintenance des modèles biologiques	161
5.4.3	Difficulté d'obtenir des données expérimentales pour créer les modèles et simulations	163
5.4.4	Limitations des simulations	164
5.4.5	Relation avec l'expérimentation	165
5.5	Conclusion	165
	Bibliographie	167
	6 Annexes	176

6.1	Version finale du premier article publié	176
6.2	Versions finales des fichiers additionnels du premier article publié . . .	195
6.3	Version finale du deuxième article publié	204
6.4	Versions finales des fichiers additionnels du deuxième article publié . . .	216

Liste des tableaux

- 1.1 Constantes et équations nécessaires pour le modèle de neurone vasopressinergique. Quand les termes m_∞ et h_∞ sont utilisés au lieu de m ou h c'est que la dynamique du canal est rapide et qu'il est toujours à son état d'équilibre. Les cases vides peuvent signifier deux choses : (1) la valeur n'est pas nécessaire (voir case « noms et équations ») ou (2) la fonction est définie dans les équations qui suivent (1.12 à 1.4.8). g est exprimé en $mS \cdot cm^{-2}$ et les autres valeurs numériques du tableau sont exprimées en mV

Table des figures

1.1	Principe de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes. L'osmolarité extracellulaire est gardées à un point d'équilibre par différents mécanismes ayant des effets opposés : excrétion ou rétention de sodium, appétit ou aversion pour le sodium, soif ou aversion pour l'eau et sécrétion de vasopressine (rétention d'eau) ou diminution de la vasopressine (excrétion d'eau). Figure tirée de Bourque (2008)[1].	5
1.2	Schéma de la répartition des volumes d'eau chez l'homme. Ces valeurs sont estimés à partir d'un homme normal de 70 kg. TBW = total de l'eau du corp (« total body water »); ICF = fluide intracellulaire (« intracellular fluid »); ECF = fluide extracellulaire (« extracellular fluid »); ISF = fluide interstitiel (« interstitial fluid »); IVF = fluide intravasculaire (« intravascular fluid »). Figure tirée de Verbalis 2003 [2].	7
1.3	Schéma d'un neurone et de ses parties. Image tirée de [3]	17
1.4	Schéma électrique équivalent du circuit RC formé par la membrane cellulaire. (A) Circuit passif représentant le comportement de la membrane au repos. Ce circuit a seulement une résistance (canaux ioniques de fuites) et une capacitance (capacitance de membrane) et néglige les canaux voltage-dépendant (propriété active). (B) Circuit actif pouvant être utilisé pour modéliser des potentiels d'action. Ce circuit est composé d'un courant ionique entrant (possiblement Na^+ ; source + résistance variable), d'un courant ionique sortant (possiblement K^+), d'un courant de fuite (résistance non variable) et de la de membrane capacitance. In et Out sont respectivement l'intérieur et l'extérieur du neurone. Les deux rangées de points gris pâles représentent les phospholipides formant la membrane cellulaire : le côté rond est le côté hydrophile de la molécule et le côté en ligne représente la partie hydrofuge de la molécule. Image tirée de [4].	21

1.5	Arbre décisionnel pour déterminer le type de comportement d'un neurone magnocellulaire. « mofr » est la fréquence moyenne des potentiels d'action. « V/mofr » est la variance de l'histogramme de la distribution de la fréquence des potentiels d'action divisée par la fréquence moyenne. Figure tiré de [5].	28
1.6	Schéma des réserves de calcium des neurones magnocellulaires ainsi que de leur courant associé. Les canaux SK correspondent au courant I_{AHP} , les canaux K_{leak}^+ correspondent au courant de fuite potassique dépendant du calcium et de la dynorphine et les canaux BK correspondent au courant I_C . Les lignes pointillées représentent les domaines (réservoirs) de calcium associés aux canaux. Le canal potassique de fuite (K_{leak}^+) n'a pas de ligne pointillée et est représenté artificiellement au centre du neurone car son réservoir est le neurone complet. Figure tirée de [6].	30
1.7	Schéma de l'imbrication des trois objectifs de cette étude	38
4.1	Putative factors underlying the transition between one to the other firing behavior in individual MCN. The two curves illustrated in the four panels represent the mean of firing rate (mofr; continuous black line) and the variance to mean ratio (V/mofr; dotted black line). Those two parameters are sufficient to quantitatively determine the firing behavior of individual MCN according to Poulain et al. (1988; see method) and the grey zones define the distinct firing behaviors : silence (S), irregular (I), phasic (P) and fast continuous (F) firing. The white zones indicate the transitional states. The evolution of the firing behavior is studied by varying only one parameter at a time : the synaptic amplitude factor (a multiplicative factor for the amplitude of the synaptic events; Panel A), the synaptic frequency factor (a multiplicative factor for the frequency of synaptic events, $1 = 3.53$ Hz, Panel B), the injection of current (i.e. the membrane depolarization; Panel C) and the dynorphin (DYN) secretion factor (a multiplicative factor for the increased DYN signal D per spike; see Roper (2004); Panel D). Each symbol represents the average of 3 simulations of 200 sec. Error bars are standard deviation.	111

- 4.2 Simulations of the impact of kappa-opioid receptor agonist and antagonist on the MCN firing frequency. All the traces illustrate the impact of the pharmacological simulation on the instantaneous firing frequency of the same MCN using a 1 sec bin. (A) the firing patterns (continuous, phasic and irregular spike discharge) was implemented using current injection (depolarisation of 3.4, 1.7 and 1.1 $\mu A/cm^2$, respectively). (B) the firing patterns were implemented using distinct DYN secretion factors (0.25, 0.75 and 4, respectively). In the last 50 sec of the simulation (last half), control (left column), Nor- BNI application (κ -opioid receptor antagonist ; middle column) and U50,488H application (kappa-opioid receptor agonist ; right column) were simulated. Note that only the maximum effect of the drugs was simulated to improve the contrast between control and drug application (at $t = 50$ sec, 100% of the of the drug effect was illustrated). 113
- 4.3 Simulated and experimental mean firing rate of the MCN population during osmotic challenges. Black squares represent the simulated mean firing rate of the overall MCN population and dotted line illustrate a linear regression fit of the data (0.249 Hz/mosmol/l; equation on the figure). The slope of this fit is identical to the slope obtained from the experimental data (continuous line ; Bourque 1998). Note that the experimental relationship was translated by +10 mosmol/l to facilitate slope comparison. 115
- 4.4 Simulated and experimental [AVP]-to-osmolality relationships. Black squares represent the simulated mean [AVP] and the continuous line illustrates the linear regression fit of the data (see equation on the figure). Black diamonds represent the experimental data (Bourque 1998 and Weisinger et al. 1993). The mean [AVP] was also simulated either without the frequency-dependent facilitation of AVP release (triangles), or without the spike propagation failure mechanism (hourglasses). 117
- 4.5 Impact of various mAVP/spike on the [AVP]-to-osmolality relationships. Black squares represent the simulated mean [AVP] and the continuous line illustrates the linear regression fit of the data using a mAVP/spike of $1.30 \cdot 10^{-5} pg$ (see method). Black diamonds represent the experimental data (Bourque 1998 and Weisinger et al. 1993). The mean [AVP] was also simulated by implementing a mAVP/spike of $0.62 \cdot 10^{-5} pg$ (triangles) and of $5.67 \cdot 10^{-5} pg$ (hourglasses). 119

- 4.6 Structure de la base de données MySQL utilisée pour emmagasiner les résultats des simulations. « Osmo » est le changement de l'osmolalité. « Time » est la longueur de la simulation en milliseconde. « Current » est la valeur du courant injecté dans le neurone pendant la simulation. « Ratio_D » est un facteur multiplicatif modulant l'augmentation du signal D à chaque spike. « Ratio_PSP_Freq » est un facteur multiplicatif de la fréquence des évènements synaptiques excitateurs et inhibiteurs. « Ratio_PSP_Amp » est un facteur multiplicatif du pulse de courant causé par un évènement synaptique excitateur et inhibiteur. « Seed » est la valeur de départ du générateur pseudo-aléatoire. « Record » est le fichier binaire Scilab contenant le train de potentiel d'action 140

Glossaire

AHP « After hyperpolarizing potentiel ». Le potentiel après hyperpolarisation.

ANP « Atrial natriuretic peptide ». Il s'agit de peptides natriurétiques sécrétés par l'atria après, entre autres, une stimulation hyperbarométrique ou hypernatrémique.

ALD Aldosterone. Il s'agit d'une hormone minéralocorticoïde sécrétée par les glandes surrénales en réponse à une hypovolémie et qui stimule la conservation du sodium et la sécrétion du potassium de façon à rétablir la pression sanguine.

AVP « Arginine vasopressine ». Il s'agit d'une des hormones les plus importantes pour l'homéostasie hydrominérale. Elle est produite par les neurones magnocellulaires et est sécrétée par la glande pituaire. Son effet principal est d'être antidiurétique. Sa sécrétion est augmentée en condition hyperosmotique ou hypovolémique.

Bouffées de potentiels d'actions intrinsèquement régénératives Il s'agit de bouffées de potentiel d'actions qui sont générées uniquement par les mécanismes biologiques internes (intrinsèques) d'un neurone et qui n'ont pas besoin de mécanisme extérieur (stimulations synaptiques) pour être démarrées ou arrêtées.

DAP « Depolarizing after potential », il s'agit d'une dépolarisation ayant un temps de vie relativement long apparaissant après une dépolarisation (comme un potentiel d'action) de courte durée. Dans le cas des neurones magnocellulaires, le DAP est le plateau de dépolarisation causé par une série de potentiel d'action.

HAP « Hyperpolarizing after potential », hyperpolarisation après potentiel d'action.

Hypernatrémie Concentration de sodium plus élevée qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier que la concentration sodique du liquide extracellulaire est plus élevée qu'en condition normale.

Hyperosmotique Concentration ionique (et donc pression osmotique) plus élevée qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier que la concentration ionique (principalement du sodium) du liquide extracellulaire est plus élevée qu'en condition normale.

Hypervolémie Volume plus grand qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier

que le volume du liquide extracellulaire est plus grand qu'en condition normale.

Hyponatrémie Concentration de sodium plus basse qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier que la concentration sodique du liquide extracellulaire est plus basse qu'en condition normale.

Hypoosmotique Concentration ionique (et donc pression osmotique) plus basse qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier que la concentration du liquide extracellulaire est plus basse qu'en condition normale.

Hypovolémie Volume plus bas qu'en condition normale. Dans cette thèse, ce mot est utilisé fréquemment pour caractériser le liquide extracellulaire et pour signifier que le volume du liquide extracellulaire est plus bas qu'en condition normale.

Implémentation Action de mettre en oeuvre (ou d'implanter) un modèle sous forme de code exécutable dans un ordinateur.

Osmolalité Pression osmotique exprimée en osmoles (Osm) ou en milliosmoles (mOsm) par kilogramme d'eau d'une solution.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Contexte de cette thèse

Cette thèse s'intéresse à l'utilisation de simulations informatiques dans le cadre d'une fonction vitale chez les mammifères : l'homéostasie hydrominérale (HH) . Une attention particulière a été portée sur les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique de l'hypothalamus puisqu'ils sont un pivot important de l'homéostasie hydrominérale. La simulation informatique, l'outil choisi ici pour étudier les systèmes complexes et non-linéaires représentés par les régulations sous-jacentes à l'homéostasie hydrominérale et par les neurones magnocellulaires, permet de faire des prédictions de mécanismes encore inconnus, de tester des hypothèses, d'augmenter la compréhension et les connaissances en parallèle avec les expérimentations sur les animaux. Historiquement, c'est dans un contexte semblable impliquant des systèmes complexes et non-linéaires que les premières simulations avec les machines numériques (entre autres la machine M.A.N.I.A.C. située à Los Alamos [7]) ont fait des prédictions surprenantes qui ont aidé la physique non-linéaire à faire de grands pas en avant. En effet, les prédictions de ces premières simulations ont permis d'augmenter les connaissances dans le domaine de la physique et, plus particulièrement, elles ont permis de mieux comprendre les phénomènes d'initiation des réactions en chaîne nucléaires. Éventuellement, ces simulations en physique ont ouvert la voie au développement d'un nouveau domaine scientifique distinct : la simulation informatique. Ce domaine est en croissance et suit le développement des ordinateurs. Initialement, seuls de rares groupes de scientifiques avaient accès à des machines à calculer (éventuellement des ordinateurs) et à la simulation alors que de nos jours, l'accès aux ordinateurs et aux simulations est plus aisé. De plus, les domaines d'utilisation de la simulation se sont étendus. La simulation n'est plus l'exclusivité des physiciens et des mathématiciens, car toutes les disciplines des sciences naturelles et certaines des sciences

humaines et sociales l'utilisent (pour exemple voir : Journal of Artificial Societies and Social Simulation). Les prochaines sections décrivent plus en détails nos motivations à utiliser la simulation dans un domaine précis de la biologie et comment, comme ce fut le cas pour la physique, la simulation est un outil puissant pouvant mener à l'avancement des connaissances dans le domaine de l'homéostasie hydrominérale.

1.1.1 Pourquoi utiliser des simulations informatiques en biologie ?

En biologie, les systèmes étudiés sont majoritairement des systèmes complexes, et ce, à tous les niveaux (écosystème, être vivant, organe, cellule ou cascade moléculaire). Ces systèmes sont composés de nombreuses parties en interactions et ont souvent des propriétés émergentes. L'étude des systèmes complexes en biologie a beaucoup à gagner par l'utilisation des ordinateurs. En effet, les systèmes biologiques, ainsi que les systèmes complexes en général, doivent être étudiés expérimentalement de façon fragmentaire : des expériences sont faites sur un élément du système, dans certaines conditions et par un laboratoire tandis qu'un autre élément est étudié dans d'autres conditions et par d'autres personnes. Ces données fragmentaires peuvent être combinées grâce à la simulation quantitative et une réplique globale et cohérente du système peut être produite numériquement. Une simulation globale d'un système permet de prédire la présence d'éléments ou d'interactions inconnus dans le système étudié. De plus, la simulation peut permettre d'expliquer les mécanismes sous-jacents à des propriétés émergentes du système qui n'étaient pas déductibles à partir de l'analyse d'éléments isolés.

1.1.2 Pourquoi simuler les principaux mécanismes constituant l'homéostasie hydrominérale, ainsi que l'activité électrique des neurones magnocellulaires vasopressinergiques ?

L'homéostasie hydrominérale est un système biologique complexe qui comprend de nombreux éléments, il doit donc être étudié de façon fragmentaire. Depuis plusieurs décennies, des données biologiques variées ont été accumulées suite aux expérimentations animales sur ce système de régulation de l'eau et des ions des compartiments liquides de l'organisme. Chez l'humain ou chez d'autres espèces de mammifère, il y a des réponses régulatrices spécifiques qui sont déclenchées en réaction à des changements du « milieu intérieur » défini par Claude Bernard. Par exemple, un manque d'eau ou une grande consommation excessive de sel entraîne la soif. D'autres types de réponse physiolo-

gique sont déclenchés, comme la sécrétion de l'hormone anti-diurétique (vasopressine ; AVP) par les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique quand les compartiments de liquide de l'organisme sont hypernatrémique, hyperosmotique ou à la suite d'une hémorragie. De plus, il y a d'autres hormones régulant ce système dont l'angiotensin II (ANGII), les facteurs natriurétiques auriculaires (ANF) et l'oxytocine (OT) par exemple. Certaines de ces hormones ont des effets opposés ou des effets synergiques et leur impact quantitatif varie. Il est donc très difficile de conceptualiser et d'évaluer quantitativement l'effet d'une hormone sur la dynamique globale de l'homéostasie sans tenir compte simultanément de tous les autres éléments du système. Par exemple, les facteurs natriurétiques auriculaires favorisent l'excrétion de sodium quand le plasma est hypernatrémique alors que l'aldostérone favorise la conservation de sodium quand le plasma est hypovolémique. Que se passe-t-il quantitativement lorsque le plasma est dans ces deux conditions (hypernatrémie et hypovolémie) et que ces deux hormones ayant des effets opposés sont sécrétées simultanément ? Est-ce qu'une hormone a priorité absolue sur l'autre ou est-ce qu'il y a un régime où les propriétés non-linéaires de sécrétion des deux hormones favorisent les facteurs natriurétiques auriculaires et un régime où c'est l'aldostérone qui est favorisée ? Il serait possible de faire des expériences pour isoler l'effet de ces deux hormones. Par contre, si on considère plus de deux hormones à la fois, l'expérimentation deviendra plus complexe et l'analyse des résultats mènera plus difficilement à une conclusion simple quant à l'effet de ces hormones. Indubitablement, l'utilisation de la simulation dans de telles situations pourrait être utile pour comprendre l'impact quantitatif de chaque hormone ainsi que leurs interactions non-linéaires et non-intuitives.

Une partie des connaissances sur les hormones et les mécanismes non-hormonaux de régulation de l'homéostasie hydrominérale du rat a été intégrée dans une simulation cohérente faisant l'objet du premier article présenté dans cette thèse. Les deux autres articles présentés ont pour sujet des simulations de neurones magnocellulaires vasopressinergiques (MCN) du rat : ces neurones sont cruciaux pour l'homéostasie hydrominérale puisque ce sont eux qui sécrètent l'hormone antidiurétique principale (l'AVP). Il est pertinent de modéliser ces neurones, puisqu'ils sont les acteurs principaux de l'homéostasie hydrominérale et que leur étude augmentera, à plusieurs niveaux, les connaissances à ce sujet. La simulation a été choisie ici comme outil privilégié pour étudier ces neurones puisqu'ils sont des systèmes complexes et qu'ils ont des dynamiques non-linéaires qui combinent plusieurs courants, plusieurs réservoirs d'ions et/ou d'hormones qui interagissent ensembles. Bien qu'il est parfois possible de simplifier les dynamiques des neurones (ex. en composantes lentes et rapides) et de les formaliser en équations analytiques mathématiquement (ex : modèle Morris-Lecar et FitzHugh-Nagumo ; chap.3 de [8]), ceci n'est pas approprié dans notre contexte d'étude. En effet, un des avantages de simplifier les dynamiques biologiques est de réduire le nombre de paramètres de la simulation (afin de minimiser le temps de calcul ou de faciliter l'analyse mathématique.

). En revanche, cet avantage devient un inconvénient pour nous qui nous intéressons plus particulièrement à la biologie sous-jacente. La réduction du nombre de paramètres a pour effet d'inclure plusieurs paramètres biologiques réels en un seul paramètre mathématique abstrait. Cette simplification qui facilite l'analyse de la dynamique, rend le parallèle entre le modèle et la réalité plus difficile à établir. Nous avons donc décidé d'utiliser un modèle de MCN contenant 23 variables dynamiques ayant toutes un pendant biologique réel. On peut difficilement évaluer quantitativement les contributions de chacune des parties de ce système. La simulation est donc, dans ce contexte, un outil d'analyse de choix pour nous aider à mieux comprendre ce système.

1.2 Introduction au concept d'homéostasie

1.2.1 Définition de l'homéostasie

Dans cette thèse et dans les articles inclus, il sera souvent question de l'homéostasie hydrominérale. L'homéostasie en biologie est, selon l'Office québécois de la langue française :

Tendance d'un individu ou d'un organisme à garder ou à reprendre son équilibre, menacé par l'action de facteurs physiques ou chimiques, grâce au mécanisme de systèmes régulateurs.

Les mammifères ont plusieurs paramètres physiologiques homéostatiques : la température, l'apport énergétique, le pH, le débit sanguin, la tension artérielle, le volume sanguin, la concentration de différents ions, etc. Plusieurs des systèmes de régulation homéostatique sont en interactions. En effet, il y a un lien direct entre, par exemple, le volume sanguin et la tension artérielle ou entre le volume sanguin et la concentration ionique du sang. Dans cette thèse, il sera question des composantes principales de l'homéostasie hydrominérale. Les termes « homéostasie hydrominérale », « homéostasie de l'eau et des électrolytes » ou « balance hydrominérale » sont utilisés de façon interchangeable pour faire référence au maintien de l'osmolarité des compartiments liquides de l'organisme. La figure 1 tiré de [1] présente un résumé des régulations physiologiques qui contribuent à l'homéostasie hydrominérale.

Plusieurs acteurs sont impliqués dans l'homéostasie hydrominérale, les prochaines sous-sections les décriront brièvement.

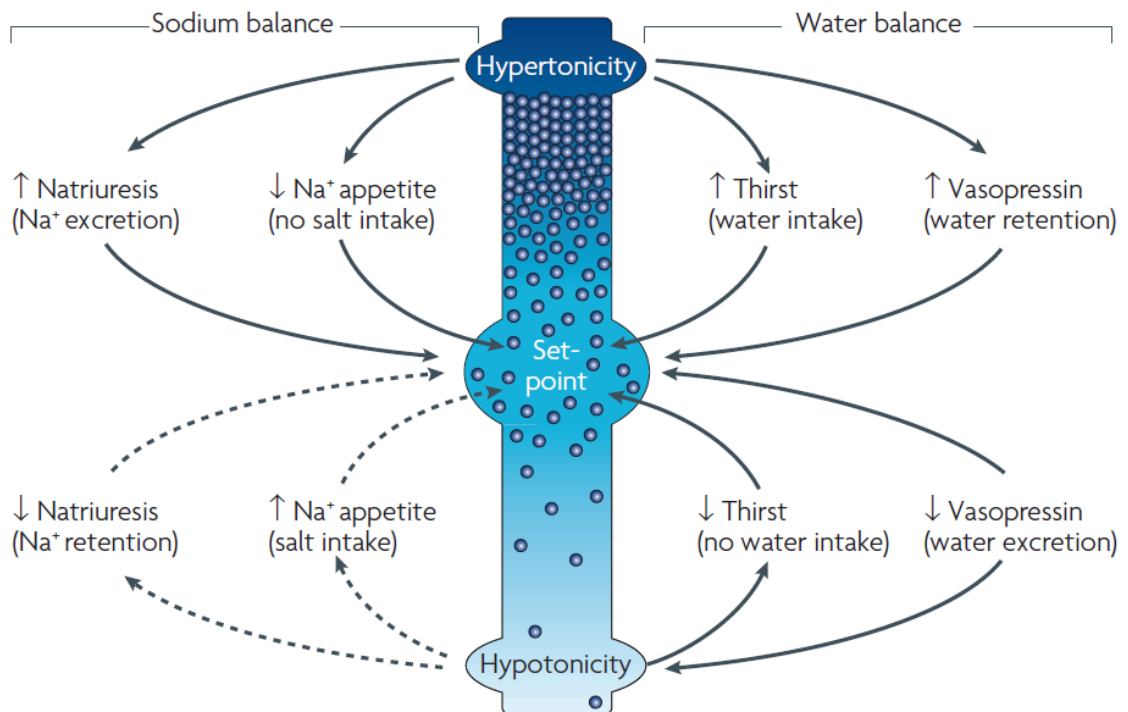


FIGURE 1.1 – Principe de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes. L'osmolarité extracellulaire est gardée à un point d'équilibre par différents mécanismes ayant des effets opposés : excrétion ou rétention de sodium, appétit ou aversion pour le sodium, soif ou aversion pour l'eau et sécrétion de vasopressine (rétention d'eau) ou diminution de la vasopressine (excrétion d'eau). Figure tirée de Bourque (2008)[1].

1.2.2 Les réservoirs d'eau et d'ions du corps et principe d'osmolarité

Pour bien comprendre l'homéostasie hydrominérale, il faut commencer par bien comprendre la variable impliquée dans cet équilibre : l'osmolarité. L'osmolarité est définie comme étant le nombre de particules osmotiquement actives par litre d'eau. Physiologiquement, l'osmolarité, ou la concentration osmotique, représente l'équilibre entre le nombre des différents ions d'un organisme et son volume d'eau. Ces deux quantités doivent être régulées simultanément pour conserver l'équilibre osmotique. Le corps des mammifères contient un grand pourcentage d'eau, par exemple, le corps d'un humain moyen est composé (en poids) de 55 à 65% d'eau [2] et cette eau est répartie en deux réservoirs principaux : le compartiment extra-cellulaire (environ un tiers de l'eau ; sous-divisé en compartiment vasculaire, plasma, liquide cérébraux-rachidien, etc) et le compartiment intra-cellulaire (environ deux tiers de l'eau ; voir figure 1.2). Ces liquides contiennent un ensemble d'électrolytes utiles pour la survie de l'organisme : sucres, sodium, potassium, magnésium, calcium, chlore, urée, etc. Le liquide extra-cellulaire a comme cation principal le sodium (avec une concentration de 140 mmol/L chez le rat ; voir tableau 1 du premier article) et le liquide intra-cellulaire a comme cation principal le potassium (concentration de 112 mmol/L). Cette différence est due principalement à la présence de pompes et d'échangeurs dans les parois cellulaires et à la perméabilité sélective des parois cellulaires. Ces pompes et échangeurs vont créer un gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Pour les neurones, ce gradient est d'autant plus important car il est la source de la signalisation électrique (voir « introduction au neurone » à la section 1.4). De plus, ce gradient contribue au maintien du volume sanguin et de la pression artérielle. Il est essentiel pour la survie d'un organisme de garder les concentrations ioniques intra- et extra-cellulaire dans une fourchette très étroite. Un changement d'à peine 2% du volume d'eau peut avoir des effets nuisibles sur les performances physiques ou mentales [9]. Or, un changement de volume d'eau va influencer les concentrations intra- et extra-cellulaires d'électrolytes et inversement, un changement d'une des concentrations d'ions (en particulier le sodium) a un impact sur l'osmolarité et donc sur la répartition de l'eau entre les deux compartiments liquides de l'organisme (intra- et extra-cellulaire) et sur la concentrations des autres molécules. Il est donc essentiel pour l'organisme d'avoir un système de contrôle complexe pouvant moduler conjointement la quantité d'eau et la concentration du principal cation extracellulaire, le sodium, pour maintenir l'homéostasie hydrominérale.

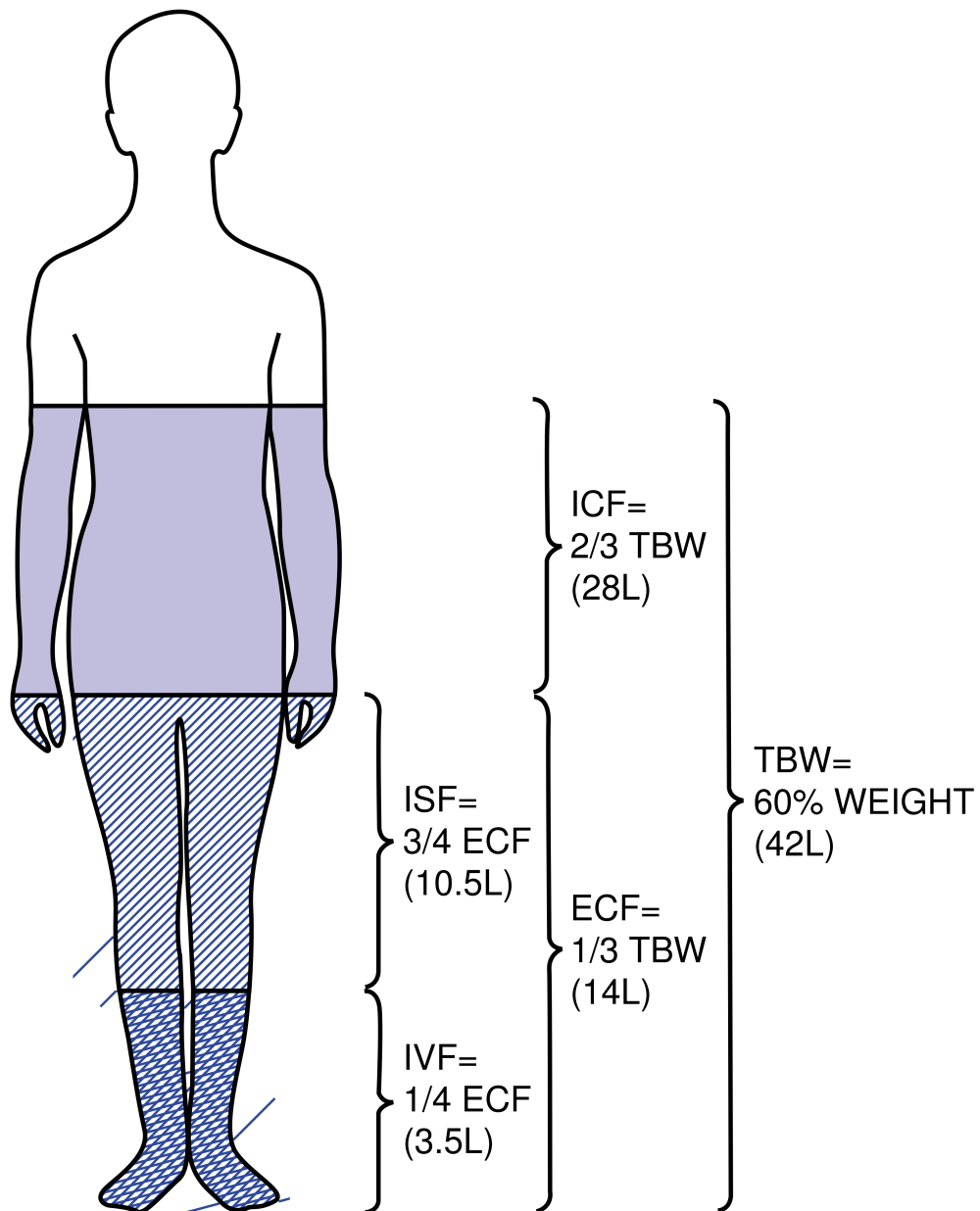


FIGURE 1.2 – Schéma de la répartition des volumes d'eau chez l'homme. Ces valeurs sont estimés à partir d'un homme normal de 70 kg. TBW = total de l'eau du corp (« total body water »); ICF = fluide intracellulaire (« intracellular fluid »); ECF = fluide extracellulaire (« extracellular fluid »); ISF = fluide interstitiel (« interstitial fluid »); IVF = fluide intravasculaire (« intravascular fluid »). Figure tirée de Verbalis 2003 [2].

1.2.2.1 Voies d'entrée pour l'eau et les ions : Appétit et soif

L'eau et le sel peuvent seulement entrer dans l'organisme par le tube digestif. L'eau peut évidemment être absorbée sous forme liquide mais peut aussi être absorbé par l'ingestion de molécules complexes. Cet eau est appelé « eau métabolique », certaines familles de molécules complexes (ex. lipides), une fois métabolisées, peuvent relâcher une ou plusieurs molécules d'eau et ces molécules peuvent être utilisées par l'organisme. Pour un humain, cette entrée d'eau est peu importante, mais chez un rat cette entrée d'eau peu devenir non-négligeable dans la balance hydrominérale [10][11]. Dans le modèle physiologique présenté dans cette thèse, la soif a été divisée en deux types : la soif de régulation et la soif non-réglée. La « soif de régulation » est liée à la sensation que l'on ressent quand on a un besoin d'eau : quand on mange trop de sel ou qu'on est déshydraté par exemple. Le terme « soif non-réglée » fait référence à toutes les autres raisons pour lesquelles nous buvons (plaisir, bouche sèche, ennui, etc). Cette classification ne s'applique pas juste pour les humains mais aussi pour le rat. Il a été démontré que même si un rat est infusé (en court-circuitant le système digestif) avec un volume d'eau plusieurs fois supérieur à ses besoins physiologiques, il continue à boire une quantité non-négligeable d'eau pour d'autres raisons que ses besoins physiologiques [12].

De son côté, le sel est absorbé uniquement par la nourriture ingérée ou par des liquides salés (rat en laboratoire). Il existe aussi un appétit pour le sodium mais cet appétit a moins d'importance quantitative dans le contexte de l'homéostasie hydrominérale près du point d'équilibre. D'une part, cet appétit n'est exprimé qu'en condition pathologique pour les humains et ce n'est pas encore bien défini s'il s'agit bien d'un appétit ou s'il s'agit d'un apprentissage par association ou d'une augmentation du plaisir hédonique associé à la consommation de sel [13][14]. D'autre part, même si les experts s'accordent sur le fait que l'appétit pour le sel semble exister chez les rats [13][14], les rats de laboratoire absorbent déjà une quantité de sodium supérieure à leur besoin physiologique dans leur alimentation habituel [15]. La consommation de sodium pour les rats dans des conditions normales de laboratoire peut donc être subdivisée en deux types : hédonique ou habituel ; l'appétit de régulation peut être exclue. La consommation hédonique fait référence à la consommation d'aliments ou de liquide salés pour la « récompense » ou pour le plaisir obtenue tandis que la consommation habituelle fait référence à l'ingestion de sel venant de l'alimentation habituelle, qui elle, n'est pas régulée par l'homéostasie hydrominérale mais par l'homéostasie de l'énergie. Ainsi, la quantité de sodium ingérée n'est pas dépendante des besoins physiologiques en sel mais corrèlerait plutôt avec les besoins en énergie [15].

1.2.2.2 Voies de sortie de l'eau et des ions : Urine, sueur, respiration et excréments

Chez les mammifères, les pertes d'eau et de sel se font principalement par l'urine, la sueur (et la respiration) et les excréments. Chez les humains, l'urine est la première source de perte et domine toutes les autres, tandis que chez le rat, les pertes d'eau par vapeur (sudation, évaporation, respiration) ont une importance relative plus grande dans des conditions normales. Les pertes dans les excréments chez le rat et l'humain sont minimales en condition normale (sans diarrhée). Le contrôle de l'excrétion d'eau et de sel est très important pour l'homéostasie hydrominérale. Or, les pertes par la vapeur et les excréments sont peu ou pas modulables en condition normale : les pertes par vapeur sont principalement fonction de la température ambiante et sont gérées par l'homéostasie thermique et les pertes par les excréments sont déjà minimisées. La seule sortie variable dans le cadre de l'homéostasie hydrominérale est donc l'urine. L'urine est produite par les reins. Les reins ont deux fonctions principales : la filtration et la réabsorption [16]. La filtration est majoritairement auto-régulée. Par contre, la réabsorption de l'eau et du sodium est modulable par des hormones (AVP, ANGII, l'aldostérone, etc) et est impliquée plus activement dans l'homéostasie. Une partie de la réabsorption est « obligatoire » (environ 99% dans des conditions normales) et une autre est « facultative » (environ 1%). Cette fraction facultative peut sembler minime, mais les reins filtrent une quantité de liquide relativement grande : en moyenne 180 L par jour. De plus, un homme en santé produit 1.5 L d'urine par jour alors en comparaison, 1% (1.8 L) est une quantité acceptable (ce n'est pas une quantité « minime »). La réabsorption est répartie dans les différentes parties du néphron : le tube contourné proximal (65% de la réabsorption), le tubule droit distal (20%), le tube contourné distal (10%) et le tube collecteur (4%). Les modulations hormonales de la réabsorption ne se font pas toutes au même niveau : par exemple l'AVP module principalement la quantité d'aquaporines dans le tube collecteur, l'ANGII stimule l'échangeur $Na^+ - H^+$ dans le tube contourné proximal et augmente le flot glomérulaire (via la vasoconstriction) et l'aldostérone inhibe les pompes $Na^+ - K^+ - ATPase$ dans le tube droit ascendant, le tube contourné distal et dans le tube collecteur [16] Tous ces mécanismes sont essentiels pour le bon fonctionnement de l'homéostasie hydrominérale.

1.2.3 L'hormone antidiurétique principale : la vasopressine

La vasopressine (arginine vasopressine ; AVP) est probablement l'hormone la plus importante pour l'homéostasie hydrominérale. C'est une hormone qui contrôle la quantité d'eau dans l'urine. Elle est anti-diurétique : plus il y a de vasopressine dans le sang

moins il y a d'eau dans l'urine et plus l'urine est concentrée. De plus, cette hormone a d'autres fonctions homéostatiques qui sortent du cadre de l'homéostasie hydrominérale. Par exemple et comme son nom l'indique, elle est impliquée dans l'homéostasie cardiovasculaire car elle favorise la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. C'est cette hormone qui est probablement responsable du teint pâle du visage (vasoconstriction) avant de vomir puisque la nausée est un stimulus puissant pour la sécrétion de vasopressine[2]. L'arginine vasopressine (la vasopressine des humains et des rats) est un court peptide qui consiste de neuf acides aminés : Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly. Cette hormone a une structure très similaire à l'oxytocin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly) qui est aussi produite par les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique et du noyau paraventriculaire. Son mécanisme d'action principal est de moduler la présence d'aquaporines, un canal transmembranaire permettant le passage de l'eau, au niveau du rein et ainsi d'augmenter ou de diminuer la réabsorption d'eau au niveau du tube collecteur (voir [17] pour une revue sur ce sujet). Plusieurs facteurs peuvent influencer la sécrétion de vasopressine : la concentration du plasma en sodium ou en sucre, l'hypovolémie due à une déshydratation ou une hémorragie, la température ambiante ou la position [18][19][2][20] [21]. Pour les humains et les rats, la concentration moyenne normale de vasopressine est d'environ 2 ± 1 pg/ml. La concentration d'AVP dans le plasma est le paramètre principal qui a été étudié dans la première et de la dernière simulations présentées dans les articles joints à cette thèse.

1.2.3.1 Autres hormones de l'homéostasie hydrominérale

En plus de la vasopressine, d'autres hormones ont des rôles importants dans la balance hydrominérale. Dans cette thèse, deux systèmes hormonaux seront traités : le système oxytocine (OT)-facteurs natriurétiques auriculaires (ANF) et le système rénine-angiotensine (ANG)-aldostérone (ALD). Le premier système (OT-ANF) s'active en réponse à une hypernatrémie ou une hypervolémie et a comme effet d'augmenter l'excrétion de sodium par les reins [22]. C'est ce système qui est probablement impliqué dans la diurèse en excès quand un humain est submergé dans l'eau (diurèse d'immersion). En effet, l'augmentation de la pression transmurale cardiaque et de la pression en général (plus de pression dans les pieds et moins dans le torse) dû à l'immersion dans l'eau donne l'impression au coeur qu'il est en situation d'hypervolémie et ainsi la production d'ANF est augmentée[23]. Cette sécrétion anormale d'ANF stimule l'excrétion de sodium et, pour maintenir l'isotonie du milieu intérieur, stimule aussi l'excrétion d'eau en excès en diminuant la sécrétion de vasopressine. Le deuxième système est la boucle rénine-ANG-ALD. Cette boucle s'active en réponse à une hypovolémie ou hyponatrémie et favorise la conservation du sodium ainsi que l'appétit pour le sel [24]. Ces deux systèmes ont des effets opposés et sont essentiels pour l'homéostasie hydrominé-

rale, en particulier, quand le volume et la concentration de sodium sont en compétition. Par exemple, quand les fluides corporelles sont en hypernatrémie hypervolémiques ou en hyponatrémie hypovolémique, la vasopressine seule ne peut pas restaurer l'équilibre en ajustant le volume d'urine. En effet, en situation d'hypernatrémie hypervolémique, le système de contrôle de la vasopressine va donner priorité à l'hypernatrémie et va essayer de conserver de l'eau pour rétablir l'équilibre du milieu intérieur. Par contre, cette conservation d'eau va accentuer l'hypervolémie et l'état d'équilibre ne sera jamais atteint. De la même façon, la vasopressine va accentuer l'hypovolémie en situation d'hyponatrémie hypovolémique. Il faut donc qu'au minimum un autre système de contrôle interagisse avec la vasopressine pour avoir un système stable et c'est ce que font les systèmes OT-ANF et rénine-ANG-ALD en modulant l'excrétion et l'absorption de sodium et d'eau.

1.2.4 Les noyaux supraoptiques et paraventriculaires synthétisent et sécrètent la vasopressine

C'est dans le noyau supraoptique, ainsi que dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus que les neurones magnocellulaires vasopressinergiques sont situés et c'est donc dans ces noyaux que la vasopressine est synthétisée. Ces deux noyaux hautement vascularisés se situent dans la partie antérieure de l'hypothalamus et le noyau supraoptique est adjacent au chiasma optique tandis que le noyau paraventriculaire est adjacent au troisième ventricule. Il y a deux types de neurones magnocellulaires pouvant être observés dans ces noyaux : les neurones oxytocinergiques qui produisent l'ocytocine et les neurones vasopressinergiques qui produisent la vasopressine. Il y a environ 18000 neurones magnocellulaires dans l'hypothalamus et environ 9000 sont vasopressinergiques. Les axones des neurones du noyau paraventriculaire projettent dans l'éminence médiane (rat seulement) et ceux du noyau supraoptique dans la glande pituitaire postérieure (rat et humain). Chaque axone se divise approximativement en 2000 terminaisons (chez le rat) sécrétant des vésicules de vasopressine. Ces terminaisons nerveuses emmagasinent les vésicules de vasopressine qui sont synthétisées dans le soma des neurones magnocellulaires et qui sont transportées le long des axones en attente de leur relâchement. Cette sécrétion de vésicules est contrôlée principalement par la fréquence des potentiels d'action des neurones vasopressinergiques. La fréquence de leurs potentiels d'action est dépendante de l'osmolarité dans le plasma [25] et du volume du sérum. La population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques peut être subdivisée en quatre types de neurones en se basant sur le nombre de 9000 neurones [26] et sur la distribution des comportements observées expérimentalement [27] dans des conditions isotoniques : 2400 neurones ont un comportement silencieux, 1200 neurones font des potentiels d'ac-

tion irréguliers, 2400 neurones font des potentiels d'action de façon phasique et 3000 neurones font des potentiels d'action rapides et de façon continue. Cette distribution de comportement change selon les conditions osmotiques. Par exemple, une déshydratation de 24 heures chez le rat cause une augmentation de la fréquence de décharge moyenne des potentiels d'action des neurones magnocellulaire et un changement de la distribution des comportements. Ces deux changements causent une augmentation de la sécrétion de vasopressine pour conserver un maximum d'eau[28].

1.2.4.1 Détection intrinsèque de l'osmolarité par les neurones magnocellulaires

Ces changements de comportements et d'excitabilité électrique des neurones magnocellulaire en fonction des changements osmotiques sont opérés par différents mécanismes intrinsèques et extrinsèques des neurones magnocellulaires. Les neurones vasopressinergiques sont intrinsèquement capables, à l'aide d'un canal ionique particulier, le canal mécanosensitif (MSC), de mesurer eux-mêmes l'osmolarité du liquide interstitiel les entourant. Le canal MSC fait la transduction du signal osmotique en signal électrique en utilisant la tension membranaire des neurones[29]. En effet, la paroi neuronale est très perméable à l'eau et n'est pas perméable aux ions, alors quand l'osmolarité du milieu entourant le neurone augmente, le volume du neurone diminue car l'eau sort par osmose. Cette diminution de volume réduit la tension membranaire et augmente l'ouverture des canaux mécanosensitifs qui eux laissent entrer des ions positifs ce qui a pour effet de dépolariiser le neurone. Il est intéressant de noter que ce mécanisme peut être modulé. Par exemple, il est possible d'augmenter cette réponse en appliquant de l'ANGII sur un neurone avant de le soumettre à un changement d'osmolarité [30]. Par contre, ce mécanisme de potentialisation n'a été que partiellement expliqué. En effet, Zhang et Bourque (2008) ont démontré que cet effet est médié par la phospholipase-C et la protéine kinase C qui augmentent rapidement la densité des filaments d'actines dans les neurones. Ils ont aussi montré qu'un composé pharmacologique (cytochalasin D) qui dépolymérise l'actine bloque cette modulation. Par contre, le lien entre l'actine et les MSC n'est pas encore connu.

1.2.4.2 Signaux extrinsèques du niveau osmolarité qui sont transmis aux neurones magnocellulaires

En plus d'une dépolariisation médiée par les MSC, les neurones vasopressinergiques peuvent recevoir des signaux extrinsèques qui affectent leur comportement électrique.

La taurine sécrétée en conditions hypoosmolaire par les glies entourant les neurones magnocellulaires est un exemple d'un tel signal. Cette élévation de la concentration de taurine active des récepteurs glycines inhibiteurs sensibles à la strychnine, ce qui a pour effet d'hyperpolariser les neurones et de réduire la sécrétion de vasopressine [31]. Les entrées synaptiques excitatrices (glutamatergiques [32]) et inhibitrices (gabaergiques[33]) sont d'autres facteurs importants régulant le nombre de potentiels d'action des neurones vasopressinergiques. En effet, le noyau supraoptique reçoit des afférences synaptiques provenant de plusieurs autres noyaux. Parmi ces afférences, la majorité provient de noyaux hypothalamiques aussi impliqués dans la balance hydrominérale. Il s'agit de : l'organum vasculosum de la lame terminale (OVLT), l'organe subfornical (SFO) et le noyau préoptique median (MnPO). L'OVLT et le SFO sont situés à une position privilégiée dans le système nerveux central leur permettant, grâce à des fenêtres dans la barrière hémato-encéphalique, de mesurer directement l'osmolarité du sang et du liquide du troisième ventricule. De son côté, le MnPO a bien une barrière hémato-encéphalique mais n'a pas de tancytes, ce qui permet la diffusion des ions du LCR dans le MnPO. Ces noyaux n'ont pas les mêmes capacités de détection, ainsi leurs signaux afférents aux neurones magnocellulaires sont donc possiblement complémentaires ou additifs. Par exemple, les neurones du MnPO peuvent détecter différenciellement les changements de sodium et les changements osmotiques causés uniquement par le sucre[34] et ils peuvent aussi être modulés par les agonistes μ -opioïd [35]. Les neurones du SFO, en plus d'être modulés par la concentration osmotique, sont aussi influencés par l'angiotensine II [36] et ceux de l'OVLT ont des canaux TRPV leur permettant de mesurer l'osmolarité [37]. Finalement, le noyau supraoptique est lui aussi modulé de façon autocrine et paracrine par plusieurs autres molécules : vasopressine, oxytocine, dynorphine, galanine, apeline, adénosine, NO, etc [38]. Tous ces signaux convergeant vers le SON servent à informer ce dernier de l'état de l'homéostasie hydrominérale et contribuent à ajuster très finement les niveaux de vasopressine dans le sang.

1.3 Introduction aux simulations

1.3.1 Définition des termes

Dans cette thèse, le mot « simulation » réfère implicitement à une simulation numérique utilisant un ordinateur : il ne fait pas référence à d'autres types de simulation (ex : analogique). De plus, il est important de bien distinguer les mots « simulation » et « modèle ». La définition du mot « modèle » utilisée dans cette étude est tirée du dictionnaire terminologique de l'Office de la langue française[39] :

Représentation, physique ou graphique, mais plus généralement mathématique, des relations qui existent réellement ou qui, par hypothèse, semblent exister entre des phénomènes ou entre les différents éléments d'un système, en vue d'études analytiques ou expérimentales (simulations) propres à faciliter la compréhension de certains mécanismes, notamment par la validation d'hypothèses, et à mieux éclairer les fonctions de prévision (modèles prévisionnels) ou de décision (modèles décisionnels).

Ainsi, le modèle est une représentation de nos connaissances. À partir de cette représentation, il est possible de faire une simulation. Pour cela, le modèle doit être implémenté, c'est à dire converti sous une forme compréhensible par l'ordinateur, dans un langage de programmation par exemple, et le programme de simulation résultant doit être exécuté par un ordinateur pour obtenir par calcul les résultats de la simulation.

1.3.2 Principes de modélisation et de simulation

Nous avons vu que les simulations utilisées dans chacun des objectifs de cette thèse ne sont pas identiques. Bien que, les principes généraux de construction des simulations sont les mêmes, qu'il s'agisse d'une simulation de systèmes basés sur des modèles de type « black-box » (premier objectif; homéostasie hydrominérale) ou qu'il s'agisse de simulations neuronales basées sur des équations différentielles de canaux ioniques (objectifs 2 et 3), plusieurs difficultés peuvent survenir pendant le processus de modélisation et de simulation. Ce processus n'est pas toujours simple, mais les principales difficultés sont amoindries ou éliminées en étant méthodique et en respectant certains principes. Des exemples de principes aidant à la modélisation et à la simulation ont été identifiés dans l'article de Pidd (1996) [40]. La prochaine section présente ces principes suivie d'une brève explication sur leur application dans notre contexte d'étude.

« **Model simple, think complicated** » Il faut être conscient que les résultats produits par la simulation sont simplifiés et que « la carte n'est pas le territoire » (Alfred Korzybski [41]). Il faut s'en rappeler chaque fois que les prédictions de la simulation sont analysées. De plus, il faut réfléchir attentivement aux résultats de la simulation pour en sortir un maximum d'informations malgré le fait qu'il s'agisse d'une simplification. Par exemple, dans notre simulation de l'homéostasie hydrominérale du rat, la quantité d'eau perdue par sueur et la quantité d'eau acquise par la nourriture est fixe même si dans la réalité ces valeurs peuvent varier. Il faut donc garder cette information en tête quand on observe les prédictions de la simulation.

« **Be parsimonious, start small and add** » Un modèle doit être construit progressivement en commençant par un petit modèle fonctionnel et, par la suite, en

ajoutant de plus en plus de composantes. Il faut commencer avec le minimum de composantes pouvant représenter l'objet de notre modèle. Une fois que la simulation basée sur ce modèle fonctionne et qu'il n'y a plus de bogue, on peut aller de l'avant et ajouter des composantes et de la complexité pour mieux refléter la réalité. Si on ne respecte pas ce principe, l'implémentation d'un trop grand nombre d'éléments en parallèle risque de compliquer la tâche et il se peut qu'il n'y ait jamais de simulation fonctionnelle. En effet, plus on ajoute de composantes, plus il est difficile de les ajuster car le nombre de variables libres devant être ajustées simultanément est augmenté significativement. Dans notre contexte, ce principe a été appliqué quand nous avons commencé par modéliser un seul neurone (article 2) avant de se lancer vers la simulation de la population et de sa sécrétion de vasopressine (article 3).

- « **Divide and conquer, avoid mega-models** » Ce principe, qui, sur le fond, est semblable au précédent, dicte qu'il faut avoir des modèles qui sont de nature modulaire. Cette modularité facilite l'implémentation, mais est aussi utile pour la compréhension de la réalité sous-jacente au modèle. Par exemple, dans cette thèse, il y a trois modèles distincts et fonctionnels qui auraient pu être imbriqués les uns dans les autres dès le début de la planification du projet mais ça n'a pas été la façon de faire qui a été retenue ici. Ainsi, en plus d'avoir des projets plus facilement réalisables, ce choix a permis de construire des modèles modulaires et distincts permettant d'en apprendre d'avantage sur chacun des mécanismes spécifiques modulant la vasopressine et ce, à des niveaux d'abstractions différents.
- « **Do not fall in love with the data** » Ce principe signifie, entre autres, qu'il ne faut pas se faire arrêter par le manque de données. Dans le contexte de cette thèse, ce principe signifie aussi qu'il ne faut pas se faire arrêter par les données expérimentales incohérentes. Ces données dépendent souvent de conditions expérimentales très différentes. De plus, un manque ou un problème avec les données peut devenir une occasion d'utiliser le pouvoir prédictif de la simulation pour combler ce manque ou pour expliquer les différences entre les données expérimentales. Dans cette thèse, nous avons par exemple réconcilié des données *in vivo* et *in vitro* contradictoires au sujet de l'effet des entrées synaptiques sur la persistance du comportement phasique chez les neurones magnocellulaires (article 2).
- « **Model building may feel like modelling through** » Ce principe fait référence au fait qu'il est normal qu'un bon modèle ne soit pas construit de façon « linéaire » : voulant que l'on trouve des données, crée un modèle et fasse une simulation. Il doit y avoir des retours en arrière et des essais erreurs (l'auteur utilise les termes : « muddle through »). Par exemple, nous avons du revenir en arrière et réviser notre modèle pendant la création de la simulation de l'article 3. En effet, nous croyions initialement que l'hétérogénéité des comportements observés dans la population était dûe à une distribution des potentiels de membrane au repos

mais, après plusieurs tests, nous nous sommes rendus à l'évidence qu'il s'agissait en fait d'une disparité dans la sécrétion et la dynorphine et que notre point de vue initial devait être changé.

Je tiens à dire aux lecteurs que, bien que cela ne soit pas écrit directement dans la méthode de chacun des articles présentés dans cette thèse, tous ces principes ont été respectés pendant la construction des modèles et des simulations qui y font référence.

1.4 Introduction au neurone et à sa modélisation mathématique

Le premier article présenté dans cette thèse traite uniquement d'une modélisation globale de l'homéostasie hydrominérale. En revanche, les deux articles subséquents ont comme sujet les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. Il faut donc bien comprendre le fonctionnement d'un neurone pour pouvoir aller de l'avant avec l'analyse de modèles mathématiques et de simulations informatiques de neurones. Cette section s'attardera à décrire : l'anatomie et le fonctionnement général des neurones, le fonctionnement électrique détaillé du neurone et, finalement, les particularités des neurones magnocellulaires importantes pour la modélisation et la simulation.

1.4.1 Anatomie et fonctionnement général du neurone

Les neurones sont avant tout des cellules spécialisées servant à recevoir et transmettre des influx électriques. Un neurone n'est généralement pas sphérique comme la plupart des cellules, il est polarisé et est divisé en 4 parties principales (voir 1.3) : l'arborisation dendritique, le corps cellulaire (ou soma), l'axone et les boutons terminaux.

L'arborisation dendritique correspond aux entrées (« input ») du neurone. Les dendrites ont comme fonction de recevoir et de convertir les informations chimiques (neurotransmetteur) venant d'autres neurones par les synapses en signal électrique. Ils peuvent être très simple (quelques branches) ou très complexe (jusqu'à 50 000 synapses pour les neurones moteurs [42]). Les signaux des dendrites sont transmis au corps cellulaire et sont intégrés (au sens de gestion de l'information, pas au sens mathématique) par celui-ci. Si la stimulation reçue est adéquate alors le corps cellulaire produira généralement une impulsion électrique (potentiel d'action) au cône d'émergence. Cette impulsion est transmise par l'axone jusqu'aux boutons terminaux pré-synaptiques. Finalement, le pulse électrique arrivant dans les boutons terminaux déclenche la sécrétion

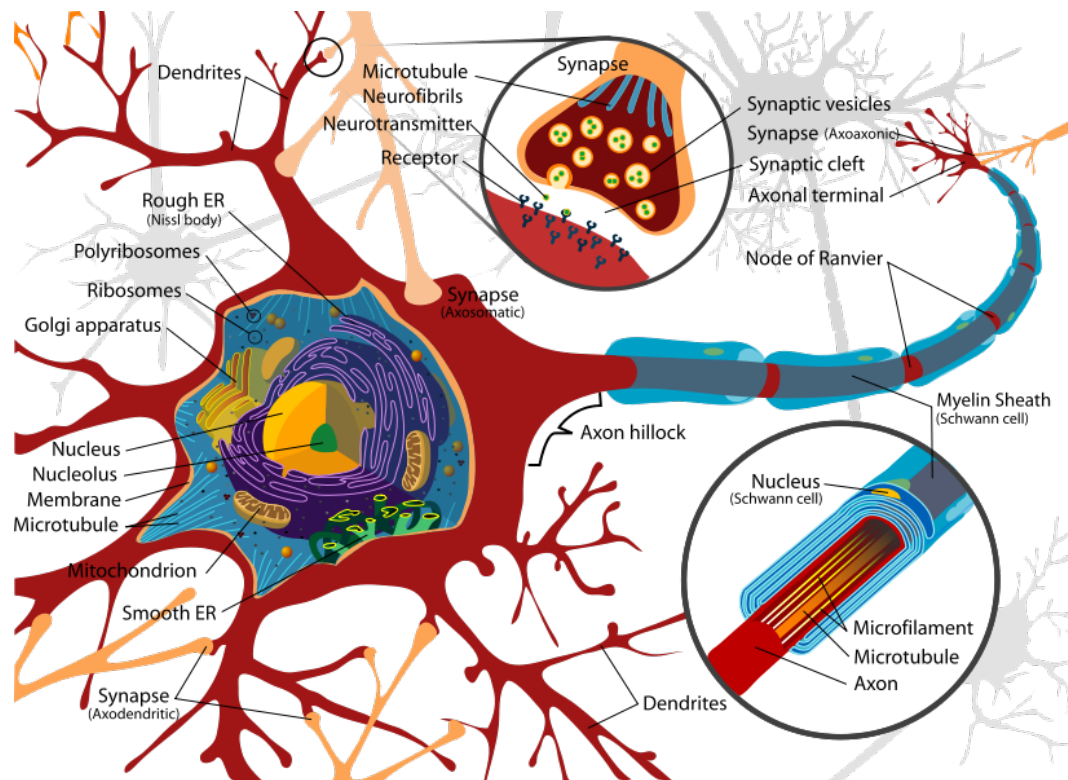


FIGURE 1.3 – Schéma d'un neurone et de ses parties. Image tirée de [3]

de neurotransmetteurs dans l'espace très étroit entre les boutons terminaux de l'axone pré-synaptique et les dendrites post-synaptiques, cet espace étroit est appelé la fente synaptique et c'est la sortie (« output ») du neurone. Les neuropeptides comme la vasopressine sont aussi sécrétés de cette façon.

1.4.2 Traitement du signal fait par les dendrites

Le résumé simplifié du fonctionnement des neurones décrit au paragraphe précédent n'inclue évidemment pas tous les éléments et les mécanismes sous-jacents au fonctionnement et à la régulation de l'activité électrique des neurones. Les neurones sont beaucoup plus complexes et ils sont tous des unités de traitement de l'information qui fonctionnent d'une façon analogique et digitale simultanément. Toutes les parties d'un neurone ont une influence sur le traitement de l'information. Les dendrites qui reçoivent l'information et génèrent des potentiels synaptiques peuvent, grâce à leurs propriétés électriques passives, à leurs propriétés électriques actives et à leur géométrie complexe, faire des opérations logiques simples (ET, OU et NON) et même des combinaisons de ces opérations simples. Par exemple, un ET peut être implémenté quand deux dendrites de petit diamètre fusionnent vers un dendrite de plus grand diamètre (tout dépendant du ratio

des diamètres ; voir théorie des câbles dans [43]). Dans ce type d'implémentation, un 1 en entrée correspond à une impulsion électrique (potentiel postsynaptique) dans un des dendrites de petit diamètre et un 0 correspond à un dendrite inactif. À cette intersection, si un seul des dendrites de petit diamètre envoie une impulsion électrique et que l'autre est inactif (1 et 0), la dépolarisation électrique résultante dans le dendrite de grand diamètre peut être insuffisante (0 en sortie) pour causer une activation de la propagation active de l'impulsion, il faut donc que les deux dendrites de petit diamètre envoient une impulsion simultanée (1 et 1) pour obtenir une impulsion active en sortie (1) c'est à dire la propagation du potentiel post-synaptique dans le dendrite de grand diamètre. Les dendrites peuvent aussi faire de la détection de coïncidences qui est nécessaire pour l'apprentissage par association, puisque l'implémentation de « simultané » dans l'implémentation du ET décrit à la phrase précédente correspond, en réalité, à une fenêtre temporelle de taille variable d'une intersection à une autre. Ainsi, il est possible d'implémenter une détection de coïncidence (selon différentes tolérances temporelles) entre deux branches dendritiques convergentes et de signaler cette détection en envoyant une impulsion dans le dendrite de grand diamètre (le dendrite proximal). En plus de la détection de coïncidence inter-dendrite, il est possible de détecter la coïncidence entre une entrée synaptique et un potentiel d'action dans le soma quand ce dernier peut remonter à « contre-courant » dans l'arbre dendritique (on parle dans ce cas de « back-propagation »). Il est aussi intéressant de noter que dans l'arborisation dendritique, il est possible d'implémenter des opérateurs conditionnels (SI - ALORS), d'implémenter des filtres en fréquence, d'implémenter des amplificateurs ou des atténuateurs de signal [44].

1.4.3 Propagation électrique passive

Tous ces potentiels postsynaptiques initiés au niveau des dendrites se déplacent en direction du corps cellulaire en descendant l'arborisation dendritique à partir des synapses distales vers des embranchements plus proximaux au corps cellulaire. Par une combinaison des propriétés passives (voir théorie des câbles [43]), comme la résistance et la capacitance du dendrite (ou de l'axone), une impulsion électrique peut se propager. Il est possible de modéliser facilement la propagation électrique des impulsions dans les câbles biologiques (axones et dendrites). Pour ce faire, nous devons modéliser les câbles comme étant un continuum de circuits RC simples. Les équations qui suivent sont toutes tirées de [43] et de l'article « Neuronal_cable_theory » de *Scholarpedia*. L'équation différentielle obtenue pour représenter la dynamique de la tension électrique

dans un câble biologique est la suivante :

$$\tau \frac{\partial V}{\partial t} - \lambda^2 \frac{\partial^2 V(x)}{\partial x^2} = V_L - V \quad (1.1)$$

V est la tension électrique membranaire, V_L est le potentiel à l'équilibre de la membrane, λ est la longueur caractéristique, τ est la constante de temps, x est la position dans le câble et t est le temps.

En fonction des conditions aux limites, cette équation peut être résolue de différentes façons. Par exemple, si nous nous intéressons à une condition où la tension électrique membranaire dans un câble est à l'équilibre (sans changement temporel), nous pouvons poser $\frac{\partial V}{\partial t} = 0$ et obtenir une équation simple sans dérivée dans le temps qui a comme solution :

$$V(x) = V_0 e^{-x/\lambda} \quad (1.2)$$

Ici V_0 correspond à la valeur du potentiel à $x = 0$. Cette équation permet de mieux comprendre pourquoi λ est appelé la longueur caractéristique. En effet, ce paramètre est un indice de la distance de propagation passive du signal dans le câble. Il correspond à la distance où le potentiel de départ est réduit à 37% de son amplitude. Nous voyons donc que pour augmenter la distance parcourue par le signal électrique, il faut augmenter λ . Comme $\lambda = \sqrt{1/g_L \rho_i}$, il s'en suit qu'il faut diminuer g_L (la conductance transmembranaire par unité de longueur) ou ρ_i (la résistance longitudinale par unité de longueur). Cette augmentation de λ équivaut à augmenter le diamètre du câble biologique pour réduire ρ_i , ou ajouter une gaine de myéline autour du câble biologique afin de diminuer g_L .

Si, au lieu d'une situation à l'équilibre, nous voulons modéliser l'évolution temporelle de la tension électrique membranaire pendant en réponse à une injection d'un pulse de courant en un point ($x = 0$ par exemple) du câble. La solution à l'équation différentielle 1.1 est la suivante quand le courant est appliqué :

$$V(t) = \frac{I_{pulse}}{g_L} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1.3)$$

et est la suivante quand le courant injecté est stoppé :

$$V(t) = V_{max} e^{-t/\tau} \quad (1.4)$$

V_{max} étant la tension membranaire maximale obtenue pendant la période d'injection de courant (ici il faut prendre pour acquis que $V_L = 0$).

Cette propagation d'un courant électrique est bien sûr idéalisée. En effet, les câbles biologiques associés aux neurones, comme les axones et les dendrites, sont beaucoup plus complexes que la description faite ici. La complexité des câbles réels peut être due à leur géométrie particulière (arbres dendritiques et noeuds de Ranvier) ou à leurs comportements électriques actifs (les modèles précédents traitent seulement de propriétés passives). Les sections suivantes présenteront brièvement tous ces mécanismes.

1.4.4 Propriétés électriques actives

Les propriétés actives discutées à la fin du dernier paragraphe sont causées par un ensemble de canaux ioniques transmembranaires causant des courants électriques et ayant des dynamiques complexes (voir eq. 1.5 à 1.11). La résultante de ces dynamiques ne régénèrent pas le signal électrique de façon parfaite : elles vont modifier l'information transmise par l'impulsion électrique. En effet, la forme du potentiel d'action peut être élargie dans l'espace et dans le temps et son amplitude peut être diminuée, les fréquences des impulsions peuvent être filtrées et des délais peuvent être ajoutés dans le signal [45][46]. Ces modifications sont parfois utiles : l'utilisation de filtres et de lignes de délai (delay lines) dans les axones du cortex auditif permet de localiser la source d'un son [47] avec une grande précision. En plus des modifications des signaux faites dans les dendrites et les axones, il y a, dans les boutons terminaux, plusieurs autres mécanismes dynamiques de fatigue ou de facilitation du relâchement des neurotransmetteurs et des neuropeptides pouvant modifier les signaux reçus. Ces mécanismes de fatigue et de facilitation de la propagation des potentiels d'action dans les axones et les boutons terminaux ne sont pas complètement compris pour le cas des neurones magnocellulaires vasopressinergiques. En revanche, il est connu que l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui permet l'ouverture des canaux potassiques calcium dépendent et que l'augmentation de la concentration extracellulaire de potassium sont possiblement impliqués dans ces phénomènes [48][49][50][51][46][52].

Le corps cellulaire contient aussi un ensemble de canaux ioniques transmembranaires ayant des dynamiques complexes (voir eq. 1.11). De cet ensemble de dynamiques complexes émerge une fonction traitant les influx électriques arrivant des dendrites. Cette fonction convertit ou encode, selon des conditions très précises, en potentiel d'action ou en une séquence de potentiels d'action les informations arrivant par les dendrites. Les propriétés électriques des corps cellulaires (ainsi que des axones et des dendrites)

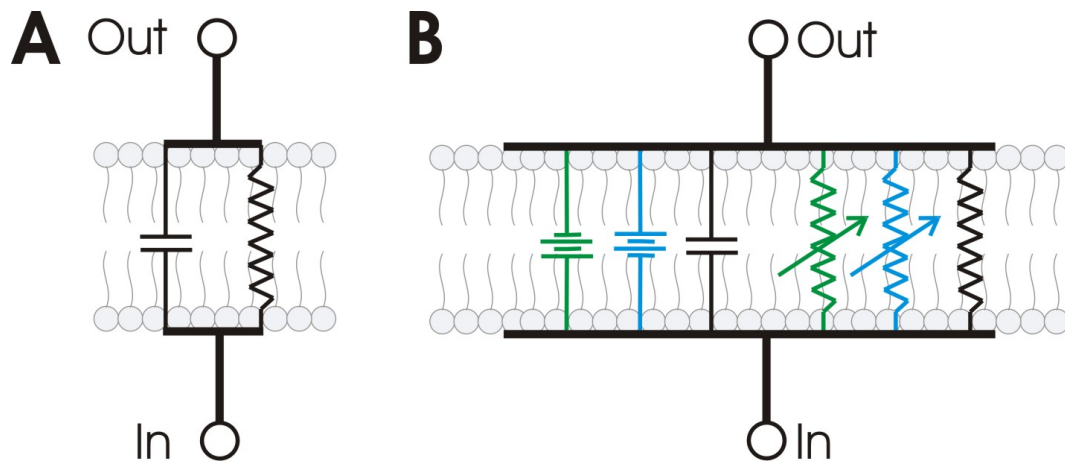


FIGURE 1.4 – Schéma électrique équivalent du circuit RC formé par la membrane cellulaire. (A) Circuit passif représentant le comportement de la membrane au repos. Ce circuit a seulement une résistance (canaux ioniques de fuites) et une capacitance (capacitance de membrane) et néglige les canaux voltage-dépendant (propriété active). (B) Circuit actif pouvant être utilisé pour modéliser des potentiels d'action. Ce circuit est composé d'un courant ionique entrant (possiblement Na^+ ; source + résistance variable), d'un courant ionique sortant (possiblement K^+), d'un courant de fuite (résistance non variable) et de la de membrane capacitance. In et Out sont respectivement l'intérieur et l'extérieur du neurone. Les deux rangées de points gris pâles représentent les phospholipides formant la membrane cellulaire : le côté rond est le côté hydrophile de la molécule et le côté en ligne représente la partie hydrofuge de la molécule. Image tirée de [4].

des neurones peuvent être modélisées comme un simple circuit RC (voir figure 1.4 et les équations 1.5 à 1.11) et les résultats de simulations basées sur ce type de modèle peuvent être très réaliste[6]. Un circuit RC est composé d'une source, d'une résistance et d'un condensateur : toutes ces composantes sont présentes dans un neurone. Par contre, dans un neurone, la résistance est fonction de la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur du neurone. La membrane double de lipide entourant le neurone est un isolant électrique et fait office de condensateur. Les canaux ioniques transmembranaires ont une conductance (ou résistance dépendemment du point de vue) sélective qui permettent à certains ions de passer, ce qui crée un courant. De plus, il y a une différence de potentiels entre l'intérieur et l'extérieur du neurone qui est causée par des concentrations ioniques différentes entre l'intérieur et l'extérieur du neurone et c'est ce qui cause les sources dans notre modèle. Cette différence de concentration est causée par les transporteurs ioniques transmembranaires actifs et passifs qui utilisent de l'ATP ou le gradient électrique pour réguler la concentration intracellulaire d'ions. Une fois que nous avons fait ces équivalences électriques entre une paroi neuronale et un circuit RC, il est possible d'écrire des équations représentant le schéma de la figure 1.4 en utilisant le formalisme de Hodgkin-Huxley[53] :

$$\zeta \cdot \frac{dV(t)}{dt} = \sum_i^L I_i \quad (1.5)$$

Équation du comportement d'une capacitance ζ .

$$I_i(t) = -g_i \cdot h_i^{\alpha_i}(t) \cdot m_i^{\beta_i}(t) \cdot (V(t) - E_i) \quad (1.6)$$

Définition du i -ième courant (I).

$$\frac{dh_i(t)}{dt} = \frac{h_i(t) - h_{\infty,i}}{\tau_{h,i}} \quad (1.7)$$

Dynamique du paramètre d'inactivation (h) du i -ième courant.

$$\frac{dm_i(t)}{dt} = \frac{m_i(t) - m_{\infty,i}}{\tau_{m,i}} \quad (1.8)$$

Dynamique du paramètre d'activation (m) du i -ième courant.

$$m_{\infty,i} = \left(1 + \exp \left(\frac{-V(t) - V_{m,i}}{k_{m,i}} \right) \right)^{-1} \quad (1.9)$$

Définition de l'état stable (m_{∞} ; « steady-state ») du paramètre d'activation du i -ième

courant.

$$h_{\infty,i} = \left(1 + \exp \left(\frac{V(t) + V_{h,i}}{k_{h,i}} \right) \right)^{-1} \quad (1.10)$$

Définition de l'état stable (h_{∞} ; « steady-state ») du paramètre d'inactivation du i -ième courant.

$$E_i = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_k^N P_{C_k^+} [C_k^+]_{\text{out}} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{\text{in}}}{\sum_k^N P_{C_k^+} [C_k^+]_{\text{in}} + \sum_j^M P_{A_j^-} [A_j^-]_{\text{out}}} \right) \quad (1.11)$$

Équation du potentiel d'inversion du i -ième courant.

Dans ces équations, ζ est la capacitance de la membrane. $V(t)$ est la différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur du neurone au temps t ; c est la valeur recherchée d'une intégration numérique (simulation) de ce modèle mathématique. $I_i(t)$ est la valeur du i -ième courant ionique au temps t (incidemment, L est le nombre de courants total implémentés dans le modèle). Chaque courant i est défini par une conductance g_i , une variable d'activation m_i , une variable d'inactivation h_i et un potentiel d'inversion E_i . Les paramètres d'activation et d'inactivation des courants (eq.1.8 et 1.7) peuvent être fonction de plusieurs autres paramètres (voir équations 1.4.8 à 1.12) comme, par exemple, la tension électrique, la concentration de calcium ou l'action d'hormones. Cependant, dans les équations 1.5 à 1.11, seul la dépendance temporelle a été explicitée. Les autres dépendances apparaissent dans les termes des définitions des états stables (« steady-state »; $h_{\infty,i}$ et $m_{\infty,i}$) de h_i et m_i . Les équations des états stables (eq.1.9 et eq.1.10) sont celles utilisées par Hodgkin et Huxley, mais il est possible d'avoir d'autres formes, comme, par exemple, les équations 1.13 et 1.14. Les constantes α_i , β_i , $V_{m,i}$, $k_{m,i}$, $V_{h,i}$ et $k_{h,i}$ sont les paramètres caractérisant le courant i et sont tirées d'expériences. Les $\tau_{h,i}$ et $\tau_{m,i}$ sont les paramètres de temps contrôlant la vitesse à laquelle les variables d'activation et d'inactivation tendent vers leur équilibre. Ces paramètres de temps peuvent être dépendants de la différence de potentielle ou des différences de concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Le potentiel d'inversion E_i , qui est la source du courant i , est créé par les différences dans les concentrations ioniques entre l'intérieur et l'extérieur du neurone (voir eq. 1.11). En effet, quand la différence de potentiel de membrane ($V(t)$) est égale à E_i alors le courant i est nul (voir eq.1.6). Quand $V(t)$ est plus petit que le potentiel d'inversion E_i alors le courant i est entrant (s'il s'agit de cation, on dit que le courant est « dépolarisant »). Finalement, si $V(t)$ est plus grand E_i alors le courant est sortant (dans ce cas, on utilise le terme « hyperpolarisant »). Les courants transmembranaires sont portés par des canaux ioniques sélectifs : certains canaux sont plus perméables au sodium, au potassium, au chlore ou à d'autres ions. C'est pour cette raison que les courants n'ont pas tous le même E_i , même si les concentrations ioniques intra et extracellulaire sont les mêmes. L'équation du potentiel d'inversion (nommée équation GHK ou Goldman-Hodgkin-Katz ; voir eq.

1.11) tient compte de ces différences de perméabilité par les termes P_{Ck+} et P_{Aj-} . P est la valeur de la perméabilité, C est le nom du k ième cation monovalent, N est le nombre de cations passant au travers du canal i . Les crochets $[]_{in}$ et $[]_{out}$ sont respectivement les concentrations ioniques à l'intérieur et à l'extérieur du neurone. En plus des cations, il y a aussi des anions qui peuvent passer : A est le nom du j ième anion monovalent et M est le nombre d'anions pouvant passer au travers du canal i . Les constantes R, T et F sont, respectivement, la constante des gaz ($8.314472(15) J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$), la température absolue et la constante de Faraday ($9.64853399(24) \cdot 10^4 \cdot C \cdot mol^{-1}$). Ainsi, à l'aide de l'équation simple caractérisant le mouvement d'ions à travers un canal sélectif (perméable) à ces ions et à l'aide des paramètres d'activations et d'inactivations, on peut modéliser l'ensemble des courants portés par les canaux (voir eq. 1.6) d'un neurone.

1.4.5 Effet de la géométrie 3D des composantes des neurones sur leurs modélisations électriques

1.4.5.1 Propagation saltatoire

À la section 1.4.3, nous avons discuté d'un modèle idéalisé de propagation dans les câbles biologiques. Or, la réalité est plus complexe. Par exemple, dans les axones périphériques myélinisés, la propagation active des potentiels d'action est « saltatoire », car celle-ci se propage par sauts [43]. La myéline est une membrane enroulée autour d'un axone qui améliore ses propriétés passives de conduction (diminution de la capacitance et augmentation de la résistance). La membrane de myéline est une extension de la membrane d'une cellule de Schwann (pour les axones périphériques) ou d'une cellule oligodendrocyte (pour les axones centraux). La couche de myéline n'est pas uniforme le long d'un axone car elle est ponctuée par des zones sans myéline où le nombre de canaux ioniques dans la membrane de l'axone est très élevé [43]. Ces zones sont appelées noeuds de Ranvier et ont pour fonction de régénérer un potentiel d'action se propageant le long de l'axone. À cet endroit, et si l'amplitude du potentiel d'action est suffisante pour dépolariser la membrane au-delà du seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendant, il y aura régénération du potentiel d'action. Ce nouveau potentiel d'action se propagera au prochain noeud et ainsi de suite jusqu'à atteindre le synapse. Souvent, la propagation passive d'un potentiel d'action généré à un noeud de Ranvier est non seulement suffisante pour activer le prochain noeud, mais peut aussi activer directement les noeuds de Ranvier subséquents. Dans ce cas, on parle de marge de sécurité de propagation. En effet, si, pour différentes raisons (maladies, blessures, inflammations, etc), un noeud de Ranvier est incapable de régénérer un potentiel d'action, un noeud subséquent le fera et la propagation sera tout de même assurée malgré un

problème dans l'axone. Cette sécurité rend la propagation axonale plus robuste. Un corollaire de cette observation est qu'en réalité, il y a toujours plusieurs noeuds de Ranvier qui régénèrent simultanément un potentiel d'action. Ceci permet d'assurer une intensité, une vitesse et une robustesse à ce type de propagation électrique qui peut être très important pour la continuité de la propagation d'un ou plusieurs potentiel d'actions.

1.4.5.2 Propagation des signaux dans un arbre dendritique complexe

Tout comme la propagation saltatoire dans les axones, la propagation dans les arbres dendritiques est plus complexe que le modèle présenté à la section 1.4.3. En effet, les dendrites ont une structure géométrique en trois dimensions qui ressemble à un arbre. Le tronc de l'arbre correspond à la jonction entre les dendrites proximaux (près du neurone) et le soma, les branches correspondent aux multiples divisions et subdivisions des segments des dendrites distaux (éloignés du soma). La propagation d'un signal électrique dans des arbres dendritiques devient rapidement difficile ou impossible à calculer analytiquement puisque chaque segment doit être couplé par ses extrémités avec ses segments voisins (ou couplé avec le corps cellulaire pour les troncs dendritiques ; ou avoir une extrémité scellée pour les dendrites les plus distaux). De plus, si on applique la loi de conservation des courants à tous les branchements, alors le courant entrant dans un branchement doit être égal aux courants sortant de cette intersection, ce qui a pour effet de coupler un très grand ensemble d'équations différentielles (une équation par segment). À moins de faire des simplifications mathématiques, il est nécessaire d'utiliser des simulations informatiques afin de comprendre les détails de la propagation électrique dans de tels arbres (voir article « Rall_Model » sur *Scholarpedia* ; cet article est maintenu par Rall). Une des simplifications mathématiques les plus intéressantes a été découverte par Rall en 1959[54]. Dans cet article, Rall démontre que si la somme des diamètres à la puissance $3/2$ de deux branches filles dans une intersection en Y est égale au diamètre de la branche parent à la puissance $3/2$, alors il est possible de faire l'approximation qu'il n'y a pas d'intersection mais plutôt un tube équivalent. Cette simplification permet, dans un arbre dendritique idéalisé où cette contrainte est appliquée à toutes les intersections, de faire l'approximation que l'arbre dendritique n'est qu'un long tube. Ainsi, il est possible d'utiliser l'équation simple de la propagation dans un câble pour estimer le comportement de l'arbre dendritique.

En plus de la forme géométrique en trois dimensions de l'arbre dendritique, une complexité supplémentaire est ajoutée à ce système dynamique puisque le nombre des différents types de canaux ioniques n'est pas uniformément réparti dans l'arbre. Ainsi, en plus d'avoir des propriétés passives différentes (diamètre, résistance, etc.) les segments

dendritiques ont aussi des propriétés actives qui peuvent être différentes. Dans le cas des neurones magnocellulaires, qui font l'objet de cette thèse, il n'y a qu'un seul article publié étudiant l'effet des gradients de canaux ioniques dans la structure en trois dimensions des neurones magnocellulaires [55].

1.4.6 Éléments de physiologie essentiels pour modéliser un neurone magnocellulaire vasopressinergique

Dans cette section, certaines particularités biologiques des neurones magnocellulaires vasopressinergiques du rat qui sont essentielles pour une modélisation réaliste de ces neurones, vont être détaillées. Tout d'abord, il est important de savoir quels sont les types de courants ioniques présents chez les neurones magnocellulaires. Il y a évidemment les courants sodiques rapides ubiquitaires (I_{Na} ; « fast ubiquitous sodium current ») qui sont responsables de la dépolarisation rapide du neurone et qui permettent la genèse des potentiels d'actions [56][57]. Il y a aussi plusieurs courants potassiques : le courant potassique rectifiant avec délais (I_K ; « Delayed rectifier ») [58][59], le courant potassique transitif de type A (I_A ; « transitif A-type current ») [60][58][59][61], le courant potassique responsable du potentiel après spike hyperpolarisant (I_{AHP} ; « after-hyperpolarizing potential ») qui est transporté par les canaux SK et qui est sensible à la concentration de calcium interne et au potentiel membranaire (« Small K ») [62][63][64][65][66] et un courant potassique dépendant de la concentration interne du calcium et du potentiel (I_C) qui est porté par les canaux BK [67]. De plus, il y a au moins deux types de courant calcique : $I_{Ca,N}$ et $I_{Ca,L}$ [68][69][70][59]. Les neurones magnocellulaires oxytocinergiques (mais pas les vasopressinergiques) ont un courant de fuites cationiques non-sélectifs non-inactivant I_{SOR} [71]. Finalement, les neurones magnocellulaires ont un courant de fuite non-sélectif (I_{leak}). Une contribution importante de ce courant vient d'un courant potassique ($I_{K,Leak}$) qui peut être modulé par le calcium [72][73] et par la dynorphine [74][75]. Une autre contribution importante du courant de fuite vient des canaux mécanosensitifs qui sont osmosenseurs et permettent aux neurones vasopressinergiques de mesurer directement l'osmolarité du plasma (la modélisation de ce canal est le sujet principal de l'article 2) [76][77][29].

En plus des courants ioniques, il est important de connaître les sous-groupes existant parmi la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques pour bien les modéliser individuellement. En effet, les neurones du SON peuvent être classifiés en quatre sous-populations en fonction de leur comportement électrophysiologique : silencieux, irrégulier, phasique ou continu. Poulain et al. (1988) ont établi une méthode quantitative simple pour déterminer avec certitude quel est le type de comportement

observé. Il est important d'avoir une méthode quantitative pour qualifier les comportements puisque l'évaluation subjective du comportement à partir des enregistrements électrophysiologiques peut être incertaine et peut changer d'un expérimentateur à un autre. La méthode de Poulain et al. se base sur deux paramètres : $mofr$ et $V/mofr$. Le premier paramètre ($mofr$) est la moyenne de la fréquence des potentiels d'action (« mean of firing rate ») et le deuxième paramètre ($V/mofr$) est la variance de l'histogramme (bin de 1 sec) de la distribution de la fréquence de décharge du neurone divisée par $mofr$. Poulain et al. suggèrent de calculer ces paramètres à partir d'un enregistrement électrophysiologique minimal de 10 minutes. À partir de ces deux paramètres, ils ont établi un arbre décisionnel quantitatif pouvant être utilisé pour déterminer le type de comportement d'un neurone magnocellulaire (voir figure 1.5).

1.4.7 Les modèles déjà existant et leurs fonctions

Il existe déjà plusieurs modèles des neurones magnocellulaires et leur degré de complexité est directement rattaché aux questions scientifiques auxquelles leurs créateurs voulaient répondre. Par exemple, Leng et al.(2001) [78] ont utilisé une simulation simple de type « integrate-and-fire » afin d'évaluer l'impact des entrées synaptiques sur la fréquence de décharge des neurones magnocellulaires. De leur côté, Roper et al.(2003)[6] ont utilisé un modèle de type Hodgkin-Huxley (avec un seul compartiment) des neurones oxytocinergiques pour évaluer l'impact de chacun des courants potassiques sur les comportements des potentiels d'action et sur l'AHP, HAP et le DAP. Ils ont plus tard réutilisé ce modèle afin d'étudier le rôle de la dynorphine dans l'initiation et la terminaison des bouffées de potentiel d'action des neurones vasopressinergiques[74]. Finalement, Komendantov et al.(2007)[55] ont créé une simulation de type Hodgkin-Huxley plus complexe que celle de Roper et al. qui inclue plusieurs compartiments ainsi que la structure géométrique des neurones magnocellulaires afin d'étudier l'effet de la distribution spatiale de différents canaux ioniques sur les propriétés des neurones magnocellulaires.

Pour cette thèse, nous avons évalué que le niveau de complexité nécessaire pour étudier les phénomènes qui nous intéressaient est celui du modèle élaboré par Roper et al. Ce niveau de complexité permet l'implémentation des modèles réalistes des courants mécanosensitifs et des courants synaptiques dans le modèle existant et la simulation des quatre types de comportements électrophysiologiques des neurones magnocellulaires (silencieux, irréguliers, phasiques et continus). Dans un modèle de type « integrate-and-fire » comme celui de Leng et al.[78], il est plus difficile de transférer les connaissances apprises de la simulation vers des connaissances biologiques. Ceci est dû au niveau de détail du neurone simulé et au fait que plusieurs paramètres biologiques sont fusionnés

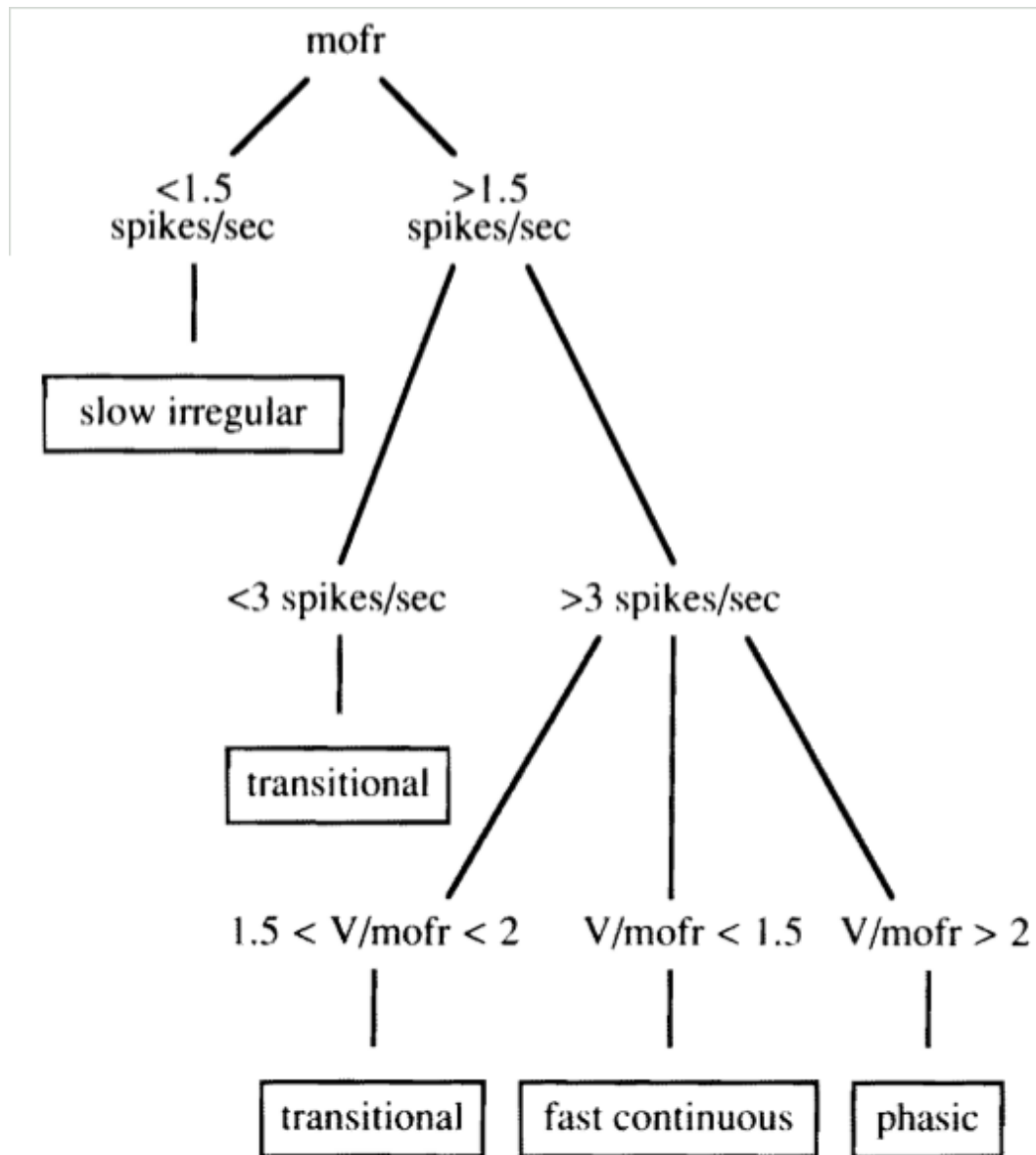


FIGURE 1.5 – Arbre décisionnel pour déterminer le type de comportement d'un neurone magnocellulaire. « mofr » est la fréquence moyenne des potentiels d'action. « V/mofr » est la variance de l'histogramme de la distribution de la fréquence des potentiels d'action divisée par la fréquence moyenne. Figure tiré de [5].

en un seul paramètre mathématique abstrait (voir section 1.1.2). Or, dans notre cas, les connaissances biologiques sous-jacentes sont d'un intérêt primordial, rejetant ainsi l'utilisation de ce type de modèle. D'un autre côté, le modèle multi-compartiments de Komendantov et al.[55] est plus complexe que nos besoins le nécessitent. Nous ne sommes pas intéressés par l'effet de la structure géométrique des neurones magnocellulaires, mais seulement par leurs activités électriques globales (bien qu'il y ait un lien entre les deux). Le modèle de Roper et al. s'intéresse justement bien à cette activité globale et inclut une méthode pour compenser le fait que ce modèle neuronal ne modélise pas tous les compartiments des neurones magnocellulaires[6] :

There appear to be (at least) three distinct compartments, each of which activates a single calcium dependent process - I_c, I_{AHP} or $I_{K,leak}$. Rather than investigating a complete spatial model for calcium diffusion in these cells, we model this compartmentalization with three distinct pools of calcium

. Les détails du comportement de ces compartiments de calcium sont présentés dans les équations 1.12. Grâce à la méthode d'imagerie du calcium Roper et al. ont pu modéliser fidèlement les dépendances au calcium de I_c, I_{AHP} et de $I_{K,leak}$ et ainsi obtenir un modèle très réaliste. La figure 1.6 présente un schéma des réservoirs de calcium ainsi que de leurs courants associés. Un autre avantage intéressant du modèle de Roper et al. (2004) est qu'il inclut un signal (D) de dynorphine (voir équations 1.15). Ce signal représente l'effet combiné des récepteurs κ -opioïde et de la concentration de son agoniste (dynorphine). C'est ce signal qui est principalement responsable de l'alternance entre des périodes de silence et des périodes de bouffées de potentiels d'action dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques phasiques. En effet, quand le signal D est élevé, il cause une désensibilisation du courant potassique de fuite à l'inhibition qui, elle, est causée par une haute concentration de calcium intracellulaire. Comme cette inhibition du courant de fuite par le calcium est responsable du DAP (qui lui cause les bouffées de potentiel d'action), l'augmentation de D cause un arrêt du DAP et des potentiels d'action jusqu'à temps que le signal D (qui a une décroissance lente) soit redevenu à un niveau assez bas pour permettre un DAP. Ce signal dans le modèle de Roper et al.(2004) est particulièrement intéressant car il explique et même prédit comment les bouffées de potentiels d'action sont générées. À l'aide de nos simulations (voir article 3) nous avons été encore plus loin et nous proposons dans cette thèse que ce signal de dynorphine est responsable des trois autres types de comportement des neurones magnocellulaires. Une confirmation partielle de cette fonctionnalité liée au modèle de Roper a été faite par Brown et al.(2006) [75]. Cette confirmation expérimentale des prédictions du modèle de Roper est très utile pour valider le réalisme de ce modèle, contrairement à la simulation de Komendantov qui elle, n'a pas été confirmée expérimentalement. Nous n'avons donc pas pris le risque d'utiliser cette simulation non-vérifiée comme base de notre simulation dans cette thèse.

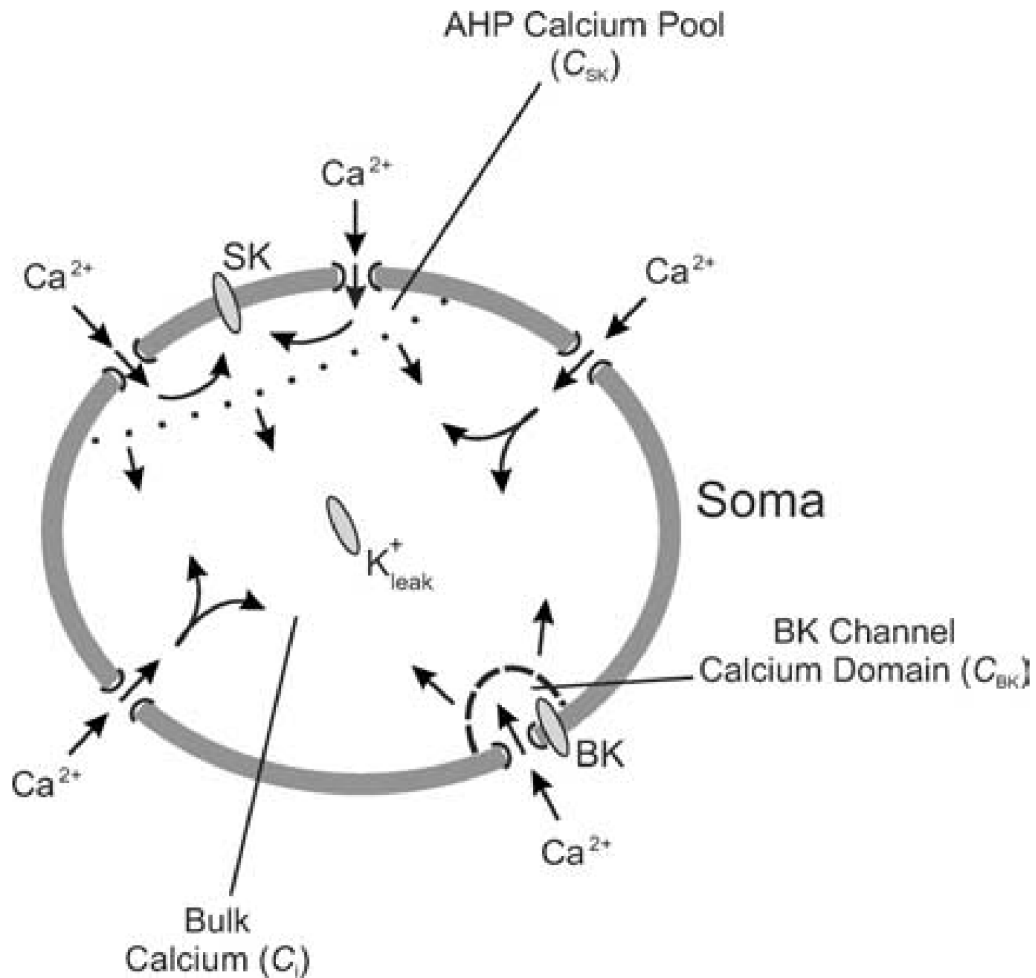


FIGURE 1.6 – Schéma des réserves de calcium des neurones magnocellulaires ainsi que de leur courant associé. Les canaux SK correspondent au courant I_{AHP} , les canaux K^+_{leak} correspondent au courant de fuite potassique dépendant du calcium et de la dynorphine et les canaux BK correspondent au courant I_C . Les lignes pointillées représentent les domaines (réservoirs) de calcium associés aux canaux. Le canal potassique de fuite (K^+_{leak}) n'a pas de ligne pointillée et est représenté artificiellement au centre du neurone car son réservoir est le neurone complet. Figure tirée de [6].

1.4.8 Modifications du modèle de MCN de Roper et al.

Les propriétés de ce modèle sont déjà bien présentées dans les articles de Roper et al. 2003 et Roper 2004 et al. [6, 74]. Par contre, dans ces articles, nous avons relevé plusieurs erreurs mathématiques et la description de plusieurs parties du modèle est erronée. Une version corrigée du modèle existant sera donc présentée ici. Toutes les valeurs numériques du modèle sont calculées par unité de surface. Par exemple, la capacitance a une valeur de $1 \mu F \cdot cm^{-2}$. Le modèle implémente 8 courants ioniques et leurs paramètres sont définis dans le tableau 1.4.8. Les équations 1.12 à 1.4.8 sont nécessaires pour définir les paramètres d'activation, les paramètres d'inactivation, les dynamiques des concentrations de calcium intracellulaire, la dynamique du signal de dynorphine et les constantes de temps du modèle de neurone magnocellulaire vasopressinergique de Roper et al.

Nom et Équation	Description des courants ioniques	g	V_m	k_m	V_h	k_h
$I_{Na} = g_{Na} m^3_{\infty, Na} h_{Na} (V - E_{Na})$	Sodique ubiquitaire	14	38	4	45	2
$I_{Ca} = g_{Ca} m^2_{Ca} (V - E_{Ca})$	Calcique haute tension non-inactivant	0.1	-10	7		
$I_{DR} = g_{DR} m^3_{DR} (V - E_k)$	Potassique rectifiant avec délai	14	-2	11		
$I_A = g_A m^4_A (V - E_k)$	Potassique transitoire de type-A	14	45	11	80	6.5
$I_{AHP} = g_{AHP} m^2_{\infty, AHP} (V - E_k)$	Potentiel d'après hyperpolarisation (canal SK)	0.19				
$I_C = g_C m_C (V - E_k)$	Potassique dépendant du calcium (canal BK)	1				
$I_{Leak_{Na}} = g_{Leak_{Na}} (V - E_{Na})$	Fuite sodique	0.018				
$I_{Leak_K} = g_{Leak_K} \cdot f(C_i, V) \cdot (V - E_K)$	Fuite potassique	0.066				

TABLE 1.1 – Constantes et équations nécessaires pour le modèle de neurone vasopressinergique. Quand les termes m_{∞} et h_{∞} sont utilisés au lieu de m ou h c'est que la dynamique du canal est rapide et qu'il est toujours à son état d'équilibre. Les cases vides peuvent signifier deux choses : (1) la valeur n'est pas nécessaire (voir case « noms et équations ») ou (2) la fonction est définie dans les équations qui suivent (1.12 à 1.4.8). g est exprimé en $mS \cdot cm^{-2}$ et les autres valeurs numériques du tableau sont exprimées en mV .

La dynamique des trois compartiments de calcium intracellulaire est définie par :

$$\frac{dC_\gamma}{dt} = -\nu_\gamma I_{Ca} - \frac{1}{\tau_\gamma} (C_\gamma - C_r) \quad (1.12)$$

avec les constantes : $\gamma = [i, BK, SK]$, $\nu_\gamma = [0.9, 100, 1.6]$, $\tau_\gamma = [2330, 1, 656]$ et les valeurs initiales $C_\gamma(t=0) = [113, 113, 113]$.

Les valeurs particulières (dépendantes du calcium) des paramètres d'activation des courants potassiques BK et SK sont définies par :

$$m_{\infty,C}(C_{BK}, V) = \left[1 + \frac{470}{C_{BK}^{2.38}} \right]^{-1} \left[1 + \exp \left(\frac{-V - 140 \log_{10} C_{BK} + 370}{7.4} \right) \right]^{-1} \quad (1.13)$$

$$m_{\infty,AHP}(C_{SK}) = \left[1 + \exp \left(-1.1204 - 2.508 \log_{10} \left(\frac{C_{SK} - C_r}{1000} \right) \right) \right]^{-1} \quad (1.14)$$

La dynamique du signal de dynorphine(D) est définie par :

$$\frac{dD}{dt} = -\frac{D}{\tau_D} + (\Delta + \theta D) \cdot \sum_i \delta(S_i - t) \quad (1.15)$$

avec $\Delta = 0.001$, $\tau_D = 5000$ et $\theta = 0.06$.

La dépendance du courant K_{leak}^+ au calcium intracellulaire et à la dynorphine est définie par :

$$f(C_i, V) = \lambda - \Gamma \cdot p(C_i) \cdot q_\infty(V) \quad (1.16)$$

$$p_\infty(C_i) = \tanh \left(\frac{C_i - C_r - \phi D}{k_p} \right) \quad (1.17)$$

$$q_\infty(V) = \left[1 + \exp \left(-\frac{V + V_q}{k_q} \right) \right]^{-1} \quad (1.18)$$

avec $\lambda = 0.6$, $\Gamma = 0.4$, $\phi = 20$, $k_p = 55$, $k_q = 7$, $V_q = -70$, $C_r = 113$ et $\tau_p = 75$.

Les équations des constantes de temps des courants Na , Ca , DR et A sont respectivement :

$$\tau_{h,Na} = \frac{20}{\left(1 + \exp\left(\frac{V-1}{14}\right)\right) \left(1 + \exp\left(\frac{V+30}{34}\right)\right)} - 0.075 \quad (1.19)$$

$$\tau_{m,Ca} = \left(0.19 \left(\frac{-V + 19.88}{\exp\left(\frac{-V+19.88}{10}\right) - 1}\right) + 0.046 \exp\left(\frac{-V}{20.73}\right)\right)^{-1} \quad (1.20)$$

$$\tau_{m,DR} = \frac{8}{\exp\left(\frac{V+40}{19}\right) + \exp\left(\frac{-V-40}{20}\right)} + 1 \quad (1.21)$$

$$\tau_{m,A} = \frac{35}{1.1 \exp\left(\frac{V+43}{17}\right) + \exp\left(\frac{-V-20}{13}\right)} \quad (1.22)$$

$$\tau_{h,A} = \frac{120}{\exp\left(\frac{V+75}{30}\right) + \exp\left(\frac{-V-45}{18}\right)} + 5 \quad (1.23)$$

$$\tau_{m,C} = 1.22 \quad (1.24)$$

Finalement, les potentiels d'inversions utilisés pour les différents ions sont : $E_{Na} = 50$, $E_K = -96$, $E_{Ca} = 12.5 \ln\left(\frac{C_o}{C_i}\right)$ et $C_0 = 4000000$.

Les variables C_i , C_{BK} et C_{SK} des équations précédentes représentent les trois réservoirs de calcium intracellulaire du neurone magnocellulaire. Chacun des réservoirs module respectivement un seul courant : I_C , I_{AHP} et I_{Leak_K} . Ces réservoirs se remplissent quand le courant calcique (I_{Ca}) est activé. Dans l'article de Roper et al. (2003), il est souligné que plusieurs types de courant calcique ont été observés dans les neurones magnocellulaires de plusieurs espèces. En revanche, chez le rat, un seul type de courants calcique est présent. Il s'agit d'un courant activé à seuil élevé de potentiel membranaire et ne s'inactive pas dans le temps. De plus, les autres courants calciques ont une importance quantitative moindre par rapport au courant à seuil élevé. Pour toutes ces raisons, Roper et al. ont donc décidé de n'inclure qu'un seul courant calcique générique (I_{Ca} ; voir tableau 1.4.8).

Quand m_∞ ou h_∞ n'est pas défini pour un courant donné dans la liste d'équations précédentes c'est que c'est la définition standard qui est utilisée (voir équations 1.9 et 1.10). La série S_i représente la position dans le temps des potentiels d'action du neurone, i est le i ème potentiel d'action et δ réfère à la distribution de Dirac. La fonction D est le signal de dynorphine introduit par Roper en 2004. Ce signal module

p_∞ et arrête une séquence de potentiels d'action après un certain nombre de potentiels d'action et de temps. La variable p a une dynamique identique aux variables m (voir équation 1.9), c'est pour cette raison qu'un p_∞ est défini. Les valeurs de potentiel sont toutes en mV , les valeurs de temps en ms et les valeurs de concentration de calcium en $nmol/L$. Quand une liste de constantes est précédée de « avec » cela signifie que ce sont les valeurs utilisées dans nos simulations (et dans celles de Roper) mais qu'elles peuvent être changées pour ajuster (« fine-tuner ») le modèle tandis que les valeurs numériques qui sont directement incluses dans les équations ne sont jamais changées.

En plus des corrections apportés au modèle de Roper et al., j'ai fais plusieurs ajouts critiques à ce modèle pendant mon doctorat : notamment un courant mécanosensitif qui implémente les fonctions d'osmosenseur et de senseur de sodium, ainsi que l'implémentation des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices, l'implémentation d'un mécanisme de fatigue du signal de la dynorphine et de la modulation de la sensibilité à la dynorphine dans la population des neurones magnocellulaires. Les détails de ces modifications sont explicités clairement dans la méthode des articles 2 et 3 présentés dans cette thèse.

1.5 Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de simuler quantitativement la sécrétion de vasopressine (AVP) lors de variations d'osmolalité extracellulaire dans un contexte physiologique c'est à dire lié au rythme circadiens, liés à l'alimentation ou dans un contexte physio-pathologiques. Cet objectif découle de notre hypothèse de travail qui est :

Est-ce que les connaissances actuelles sur la sécrétion de vasopressine et sur les neurones magnocellulaires permettent de créer un modèle informatique du système neuroendocrinien qui est assez informatif pour résoudre les controverses de la littérature et qui permet de faire des prédictions ?

. Trois articles de simulation ayant des buts différents mais complémentaires sont présentés dans cette thèse. Le travail fait pour chacune de ces simulations est utile et correspond à notre objectif global puisqu'il permet de faire des prédictions et augmentent notre compréhension dans un domaine spécifique. Le premier domaine, celui utilisant le niveau d'abstraction le plus bas, correspond au neurone vasopressinergique individuel. Le deuxième domaine (niveau d'abstraction intermédiaire) correspond à la population des neurones du SON ainsi qu'au couplage stimulation-sécrétion de l'AVP. Finalement, le dernier domaine (niveau d'abstraction le plus élevé) correspond au contrôle de l'homéostasie hydrominérale par la concentration de vasopressine. Le but ultime de faire ces trois simulations n'est pas seulement d'étudier séparément les mécanismes sous-jacents

au niveau d'abstraction mais de les combiner et ainsi d'obtenir une simulation globale qui fera le lien entre des changements au plus bas niveau d'abstraction (exemple : canaux ioniques impliqués dans l'osmodétection) et les répercussions de ces changements au niveau le plus élevé d'abstraction (exemple : influence de la consommation de sel sur les rythmes circadiens du volume). La figure 1.7, présente un schéma de la combinaison des trois simulations présentées dans cette thèse ainsi que de leur objectif respectif. Les sous-objectifs de cette thèse sont : la création d'une simulation de l'homéostasie hydrominérale du rat, la création d'une simulation de l'osmodétection utilisant un modèle de MCN individuel et la création d'une population simulée de neurones magnocellulaires et d'une dynamique de la [AVP] simulée. Ces objectifs seront décrits en détail dans les prochaines sections.

1.5.1 Objectif 1 : Création d'une simulation de l'homéostasie hydrominérale du rat

La simulation résultant de cet objectif a une abstraction élevée. On parle d'abstraction élevée car l'intérêt de cette simulation est moins porté sur les détails des mécanismes de l'homéostasie hydrominérale mais plutôt sur leurs fonctions globales et leurs interactions. Cette simulation repose de fait sur un modèle simplifié et permet d'avoir une vue d'ensemble afin de faire des prédictions et expliquer des phénomènes liés à l'homéostasie hydrominérale. Par rapport aux deux autres simulations et dans le contexte général de cette thèse, cette simulation est équivalente à un banc d'essai (« test-bed »). De façon analogique avec la construction d'un simulateur d'avion pour entraîner des pilotes, avant de programmer l'avion, il est nécessaire de programmer le « monde virtuel » dans lequel évoluera l'avion (le terrain, la météo, etc). Par contre, ce monde virtuel n'a pas besoin d'inclure, par exemple, une simulation météorologique détaillée pour atteindre son objectif (entraîner le pilote) mais seulement de bien représenter l'effet global de la météo sur l'avion. Dans notre cas, le monde est l'homéostasie hydrominérale et notre avion est la population des neurones vasopressinergiques. Dans cette simulation, la concentration plasmatique de vasopressine est simulée seulement par quelques équations mathématiques simples. Dans le future, l'équation mathématique régissant la sécrétion de vasopressine dans ce « test-bed » sera remplacée par une simulation de la population de neurones magnocellulaires (simulation qui aura été implémentée à l'objectif 3).

1.5.2 Objectif 2 : Création d'une simulation de l'osmodétection utilisant un modèle de MCN individuel

Pour atteindre cet objectif, une simulation d'un seul neurone magnocellulaire a été créée. Cette simulation est, par rapport à celles des autres objectifs, celle qui a le plus bas niveau d'abstraction. La dynamique de la conductance des canaux ioniques y est représentée par des fonctions mathématiques utilisant le formalisme d'Hodgkin-Huxley. Ce modèle de type Hodgkin-Huxley est assez détaillé pour permettre la modélisation des canaux mecanosensitifs impliqués dans l'osmodétection et pour permettre la modélisation des modulations de certains paramètres de canaux (comme la conductance) par des composés pharmacologiques. Pour les questions que nous nous posons ici, il n'est donc pas utile d'avoir une simulation plus détaillée (à un niveau plus bas d'abstraction) simulant la mécanique interne des canaux ioniques comme des chaînes de Markov, ou simulant la structure 3D du neurone en plusieurs compartiments distincts. À l'inverse, il ne serait pas non plus possible d'utiliser un modèle de neurone magnocellulaire moins détaillé tel le modèle « integrate-and-fire » de Leng et al.2001[78]. Ce type de modèle de neurone est plus approprié pour des simulations à grande échelle (plusieurs neurones) et moins utile dans notre cas car leur utilisation rendrait difficile ou impossible la modélisation des propriétés intrinsèques des neurones magnocellulaires tel les bouffées de potentials d'action (burst) ou les mécanismes de détection du sodium. Par rapport aux deux autres simulations de cette thèse, celle-ci constitue l'unité de base avec laquelle les autres simulations ont été construites.

1.5.3 Objectif 3 : Création d'une population simulée de neurones magnocellulaires et d'une dynamique de la [AVP] simulée

Cette simulation a un niveau d'abstraction intermédiaire, elle imbrique plusieurs simulations de neurones magnocellulaires individuelles et simule aussi le couplage stimulus-sécrétion de la neurohypophyse en réponse à des trains de potentiels d'action générés par l'ensemble des neurones vasopressinergiques. Cette simulation est le lien entre la simulation de bas niveau et la simulation de niveau élevée abstraction, car elle peut prédire la concentration de vasopressine dans le plasma en fonction des stimuli tels les changements osmotiques perçus au niveau des neurones magnocellulaires.

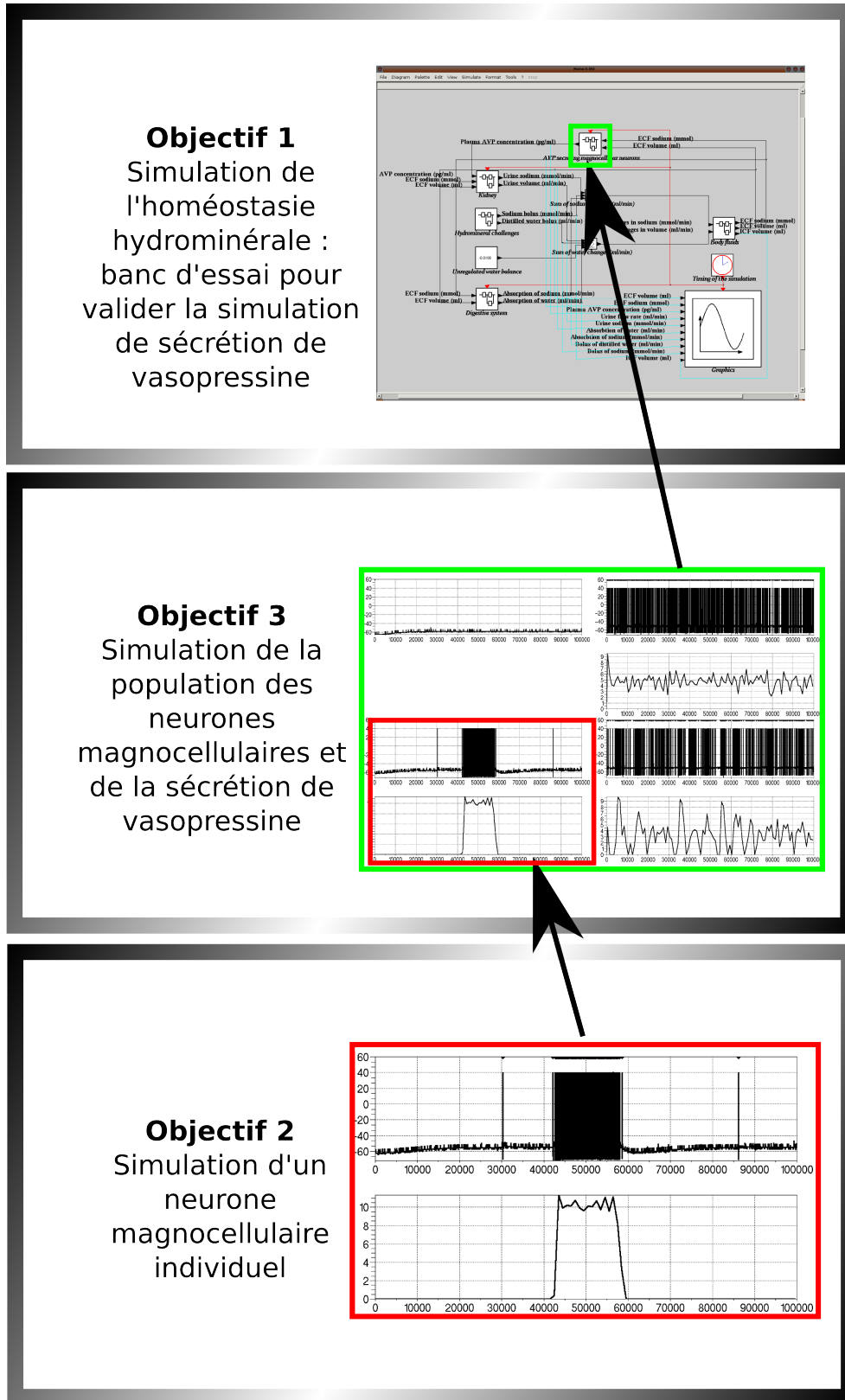


FIGURE 1.7 – Schéma de l'imbrication des trois objectifs de cette étude

Chapitre 2

Simulation de l'homéostasie hydrominérale du rat : article 1

Les sections qui suivent sont une adaptation au format de cette thèse de l'article 1. Cet article est intitulé : « Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis ». Notez bien que les références et les figures sont numérotées comme dans l'article original. D'ailleurs, une version de l'article dans son format original est incluse en annexe.

2.1 Résumé de l'article traduit en français

Contexte : Chez les mammifères, l'hormone nommée arginine vasopressine (AVP) est relâchée par les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus quand la pression osmotique dépasse un certain seuil. L'AVP participe à l'homéostasie hydrominérale (HH) en contrôlant l'excrétion d'eau au niveau du rein. Notre compréhension de l'HH et de la sécrétion d'AVP résulte d'une vaste quantité de données expérimentales accumulées depuis environ cinq décennies. Ces données expérimentales ont été acquises en étudiant de nombreux systèmes dans de nombreuses conditions, donnant ainsi une image fractionnée et parfois réductrice des composantes impliquées dans l'HH. **Résultats :** Dans cet article, un modèle de l'HH d'un rat avec un niveau élevé d'abstraction est présenté. Ce modèle est basé sur des publications sélectionnées et peut faire des prédictions à court terme (heures) et à long terme (jours) au sujet des variations des six paramètres homéostatiques principaux : (1) la concentration extracellulaire de sodium, (2) la concentration d'AVP, (3) le volume intracellulaire, (4) le volume extracellulaire, (5) le volume

d'urine et (6) l'absorption d'eau. La simulation génère des prédictions quantitatives comme les valeurs moyennes journalières de la concentration extracellulaire de sodium (142.2 mmol/L), d'AVP circulante (1.7 pg/ml), du volume intracellulaire (45.3 ml/100 g de poids du rat), et du volume extracellulaire (22.6 ml/100 g). La simulation génère aussi des valeurs cumulatives journalières moyennes de volume d'urine (11.8 ml/100 g bw) et d'absorption d'eau (18 ml/100 g bw). La résolution temporelle des prédictions de la dynamique de tous ces paramètres est d'une minute. Cette haute résolution permet de faire des prédictions sur les fluctuations circadiennes de la vasopressine : (5 ± 2 pg/ml) et permet de définir une limite (2.1 pg/ml) entre les phases de restauration et de maintenance du rythme circadien. De plus, la simulation peut prédire les effets de composés pharmacologiques qui perturbent l'homéostasie hydrominérale. Par exemple, nous avons testé l'action du furosémide (un diurétique) combinée avec une diète déficiente en sodium et nous avons généré des prédictions quantitatives compatibles avec les données expérimentales : la concentration de sodium extracellulaire prédites est de 134 mmol/L et la valeur expérimentale est de 136 ± 3 mmol/L. De plus, la consommation d'eau prédite est de 20.3 ml/100 g et la valeur expérimentale de 17.5 ± 3.5 ml/100 g. **Conclusion** : L'accord entre les prédictions et les données expérimentales publiées indique que notre modèle simplifié de l'HH intègre la plupart des composantes essentielles nécessaires pour faire des prédictions physiologiques réalistes dans des conditions hydrominérales normales ou perturbées

2.2 Abstract

Background : In mammals, vasopressin (AVP) is released from magnocellular neurons of the hypothalamus when osmotic pressure exceeds a fixed set-point. AVP participates to the hydromineral homeostasis (HH) by controlling water excretion at the level of the kidneys. Our current understanding of the HH and AVP secretion is the result of a vast amount of data collected over the five past decades. This experimental data was collected using a number of systems under different conditions, giving a fragmented view of the components involved in HH. **Results** : Here, we present a high-level model of the rat HH based on selected published results to predict shortterm (hours) to long-term (days) variation of six major homeostatic parameters : (1) the extracellular sodium concentration, (2) the AVP concentration, (3) the intracellular volume, (4) the extracellular volume, (5) the urine volume and (6) the water intake. The simulation generates quantitative predictions like the daily mean of the extracellular sodium concentration (142.2 mmol/L), the AVP concentration, (1.7 pg/ml), the intracellular volume (45.3 ml/100 g body weight - bw), the extracellular volume (22.6 ml/100 g bw), the urine volume (11.8 ml/100 g bw) and the cumulative water intake (18 ml/100 g

bw). The simulation also computes the dynamics of all these parameters with a high temporal resolution of one minute. This high resolution predicts the circadian fluctuation of the AVP secretion (5 ± 2 pg/ml) and defines the limits of a restoration and a maintenance phase in the HH (2.1 pg/ml). Moreover, the simulation can predict the action of pharmacological compounds that disrupt the HH. As an example, we tested the action of a diuretic (furosemide) combined with a sodium deficient diet to generate quantitative prediction on the extracellular sodium concentration (134 mmol/L) and the need-induced water intake (20.3 ml/100 g bw). These simulated data are compatible with experimental data (136 ± 3 mmol/L and 17.5 ± 3.5 ml/100 g bw, respectively).

Conclusion : The quantitative agreement of the predictions with published experimental data indicates that our simplified model of the HH integrates most of the essential systems to predict realistic physiological values and dynamics under a set of normal and perturbed hydromineral conditions.

2.3 Background

Body water is distributed between the intracellular fluid (ICF) and the extracellular fluid (ECF) compartments (interstitial tissue, vascular space), whose volume depends on the osmotic pressure exerted by their electrolyte composition. Due to the selective permeability of biological membranes, sodium (Na⁺) and accompanying anions are mostly restricted to the ECF compartment, while potassium (K⁺) is confined to the ICF compartment. Therefore, these two ions are the effective electrolytes creating the osmotic pressure and affecting the movement of water between the two body water compartments. In mammals, the maintenance of osmotic pressure is crucial for the integrity of the cells and organs and small variations from a stable set-point trigger compensatory responses to restore the body fluid osmolality. These homeostatic responses mainly control the retention of water and Na⁺ at the level of the kidneys [1,2], as well as fluid and Na⁺ ingestive behaviors [3]. For instance, plasma hyperosmolality triggers rapid homeostatic responses like vasopressin (AVP) secretion, an increased rate of natriuresis and the sensation of thirst [4-7].

The simultaneous quantification of the ECF osmolality and resulting homeostatic responses at a high temporal resolution would be difficult to measure and study experimentally and one approach would be to design a realistic computational model aimed at simulating the dynamics of the biological parameters under study. This model does not have to be necessarily as complex as the biological function it simulates [8]. However, it should include the essential measurable inputs and outputs and connect them in a manner that carries out the processing that occurs, here the secretion of AVP and the adjustment of the ECF osmolality. In this line, the present model of the hydromi-

neral homeostasis is organized around three distinct systems that define the scope of the simulation : (1) The current state of the ICF and ECF compartment in terms of ion composition and volume ; (2) The input/output to the body fluid compartments in terms of regulated and unregulated water and Na⁺ intake or loss, respectively and (3) The controllers that specifically regulate water and Na⁺ excretion at the level of the kidneys. Note that some of the biological parameters that characterize each of the systems rely on necessary assumptions that are presented in the methods (see the model architecture).

The modeling principle is based on the use of “highlevel” functions, i.e., a black-box approach to model the components of each system. Such a modeling approach uses necessary simplifications of the model and does not therefore implement all the complex cascade of hormones and/or cellular mechanisms underlying the output of the black boxes. For instance, the model includes the “aldosterone (ALD)” controller and the “atrial natriuretic peptides (ANPs) controller”, which add to the model the capacity to respond to a certain degree of hypovolemia and hypervolemia, respectively by modulating Na⁺ excretion. The secretion of ALD and ANPs is multifactorial and depends on the action of other hormones like angiotensin II and oxytocin [9]. However, considering the experimental data on ALD and ANPs will indirectly include the regulatory action of angiotensin II and oxytocin in this high-level model without a direct implementation of the regulatory action of these hormones in the model. Moreover, the experimental data on ALD, ANPs and AVP introduce in the model the relationship that links the secretion of these hormones to the ECF volume without the need of implementing a complex system of blood pressure control. The purpose of the present study was to develop a computational simulation of the dynamics of the ECF osmolality and vasopressin release under stable hydromineral condition, as well as during osmotic challenges.

2.4 Methods

2.4.1 Biological parameters

The present model will specifically be developed for rats since this animal species has historically provided much of the data in the field of the hydromineral homeostasis. All of the initial values for the biological parameters used in the simulation were compiled from published experimental data and are presented in Table 1. Biological parameters are tightly correlated with the animal’s weight. However, a simple linear scaling of the parameters extracted from the literature may be biased by physiopathological condition of the animals under study. For example, obese rats have an expanded skin surface

compared to lean rats, a condition that directly affects the amount of water lost by evaporation. In the same line, the amount of metabolic water resulting from the ingested food in obese rats is larger than in lean rats [10]. Therefore, to minimize the introduction of conversion error in the model, the rat's weight was fixed at 255 g, a value that is well within the range of weights reported in the experimental studies referenced. Moreover, data were selected from studies using rats in the same age range because aging directly affects the water balance of rats [11].

2.4.2 Software

The simulation is performed using Scicos, a dynamical system simulator included in the Scilab software (<http://www.scilab.org>). Scilab is an open source software that is equivalent to Matlab, the leading software in scientific computing (MathWorks - <http://www.mathworks.com>). Scicos has a graphical user interface (GUI) that is particularly useful for our task of modeling a complex system and the flexibility of the software allows easy substitution of a standard box by a function coded in a different programming language (Fortran or C). The simulation has a time resolution of one minute implying that time-dependent parameters are updated every minute according to the current state.

2.4.3 The model architecture

The “high-level” simulation is organized around three functional systems : (1) the current state of the body fluid compartments, (2) the controllers specifically acting at the level of the kidneys and (3) the inputs/outputs of the body fluid compartments. For the implementation of the model in the computer simulation, each system is represented by one or several black boxes, called meta-boxes. The system “current state of the body fluid compartments” is composed of one meta-box called “body fluids”. The system “inputs/outputs of the body fluid compartments” is composed of four meta-boxes called “kidney”, “digestive system”, “unregulated water balance” and “hydromineral challenges”. Finally, the system “controllers” is composed of one meta-box called “AVP secreting magnocellular neurons” and additional corrections for active natriuresis and/or Na⁺ retention. In addition, the simulation includes a timing generator (red clock) and two boxes that summate the sodium changes and the water changes, respectively. Figure 1 illustrates a screenshot of Scicos main window, displaying the architecture of the simulation described above. The content of all the meta-boxes are detailed in the following sections

2.4.3.1 System 1 ; the meta-box “body fluids”

The body fluids are distributed between the ICF and the ECF compartments. The solute composition of each compartment differs considerably : Na⁺ is the major cation in the ECF, whereas K⁺ is dominant in the ICF. In the present simulation we simplified the ECF compartment by merging together the vascular space and the interstitial fluid because the time course describing Na⁺ exchange between these two distinct spaces is below one minute [12], the time resolution of the simulation. The ICF K⁺ concentration ([K⁺]) is set as a nonvariable parameter in the simulation [12]. This assumption was initially chosen because the large volume of the ICF compartment prevents dramatic changes in the [K⁺]. In addition, regulation of [K⁺] was considered less critical for the integrity of the organism than regulation of [Na⁺] [6]. Therefore, time-dependent changes in ICF volume in the simulation result from water movement driven by changes in ECF [Na⁺].

The ECF [Na⁺] was preferred over the ECF osmotic pressure because osmotic pressure depends on additional parameters including the level of sugars, proteins and urea. However, a correction was included in the simulation to account for the osmotic weight of these parameters (see next section).

Altogether, the body-fluid compartments are simulated by a meta-box that dynamically integrates three biological parameters : (1) the ECF volume, (2) the ECF [Na⁺] and (3) the ICF volume. The physiological setpoint of these parameters is indicated in Table 1.

Table 1 List of the parameters and their physiological value used in the simulation

Parameters	Symbols	Initial values	Physiological values and references
ICF potassium concentration	[K ⁺ _{ICF}]	112 mmol/L	112 [12]
AVP concentration	[AVP] (t = 0)	1 pg/ml*	≈1 [19]; 1.05 ± 0.4 [11]; 1.7 ± 0.3 [23]; 1.9 ± 1.1 [46]
ECF Na ⁺ concentration	[Na ⁺ _{ECF}] (t = 0)	140 mmol/L*	≈135 [17]; 138 ± 2.6 [22]; 143.3 ± 0.4 [37]; 145.6 ± 1.2 [23]; 146 ± .8 [47]
ECF volume	ECF _V (t = 0)	23 ml	23 [12]
ICF volume	ICF _V (t = 0)	46 ml	46 [12]
Rat weight	W	255 g*	150-250 [20]; 210-230 [23]; 245 ± 5 [24]; 250-280 [47]; 250-325 [48]; 262 ± 15 [22]
Sodium clearance	C _{Na+}	0.0086 ml/min	See Additional file 2[21-24]

The values identified with a star (*) were defined by fine-tuning the simulation within the range of the data reported in the literature. (t = 0) indicates the initial set of the parameter to start the simulation. The value of all these time-dependent parameters is updated every minute during the simulation.

2.4.3.2 System 2 ; the meta-box “AVP secreting magnocellular neurons”

This meta-box is the main controller of the simulation. It simulates the regulation of AVP concentration in the plasma and it contains three items : (1) a mathematical equation adjusting the AVP concentration as a function of the ECF osmolality,

(2) a time-dependent degradation of AVP and (3) a circadian modulation of AVP secretion. (1) The mathematical equation was created using experimental measurement from Dunn et al., 1973. In this paper and other reports, it is shown that the AVP level is a linear function of the plasma osmolality and an exponential function of the volume [13-16]. In addition, a correction was included in the equation to reflect the volume-dependent change in the slope of AVP secretion reported in the experimental data. Using a linear regression based on Figure six of Dunn et al. (1973), the correction term of the slope was set at 11. The ECF [Na+] in the equation was also corrected for the contribution of sugar, proteins and urea to plasma osmolality according to the approximation stated in Verbalis, 2003, but using the values for the rat (14 mosmol/L) [17]. The resulting AVP level is calculated using the following equation :

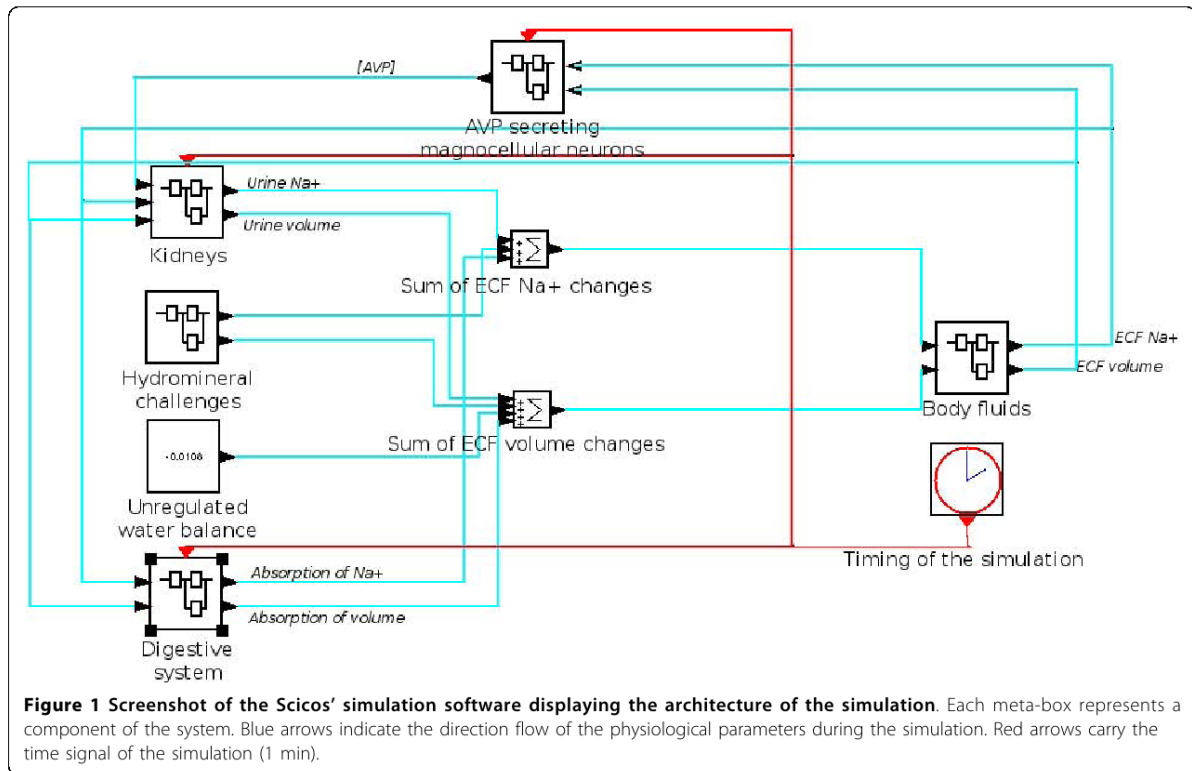
$$[AVP(t)] = \left(0.91 - \frac{11 \cdot ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)} \right) \cdot (200 \cdot ([Na^+]_{ECF}(t)] - 0.1375) + 1.3 \cdot e^{\frac{-17 \cdot ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)}} \quad (2.1)$$

All symbols are defined in Table 1. The Delta (Δ) symbol denotes the difference between the current state in the simulation and the initial state defined in Table 1. All the numerical values are based on the fits of the experimental data reported in Dunn et al. (1973). Since a negative value for hormone secretion is meaningless, we avoid non-physiological values by allowing $ECF_{\Delta V}(t)$ to be strictly negative (or zero) in the equation and by forcing AVP level to be positive (or zero). Note that the change in AVP secretion caused by osmotic fluctuation is larger than the change caused by volume fluctuation (see Additional file 1).

(2) A time-dependent degradation of AVP was added to the model so that 15% of circulating AVP is cleared every minute when AVP secretion is reduced [18] (see discussion). (3) A circadian pattern of AVP secretion is also included in the model. This implementation was derived from data presented in Figure one of Graugaard-Jensen et al. (2006). Thus, the total AVP concentration is linearly reduced at a speed of 5%/h starting at 2 AM to reach a maximum of 30% reduction at 8 AM. Then, the negative modulation of AVP secretion is progressively inactivated from 8 AM to 11 AM before being controlled by the current state of the ECF [Na+] (see discussion).

2.4.3.3 System 3; the meta-box “Kidney”

This meta-box is designed to dynamically simulate the rate of urine flow and the rate of Na+ excretion by the kidneys (passive Na+ clearance and active natriuresis or



Na⁺ retention).

The rate of urine flow is calculated every minute in the simulation. The calculation is adapted from an equation that expresses the rate of urine flow as a function of AVP in humans [6]. Here, the basal AVP level was linearly rescaled from 1 pg/ml (mean basal level in Humans [19]) to 2.3 pg/ml (mean basal level in rats [20]). The rate of urine flow was also scaled so that the flow caused by 2.3 pg/ml of AVP corresponds to 6 μ l/min/100 g of body weight (bw). This value corresponds to the normal rate of urine flow in the rat [17]. The maximum rate of urine flow, in the absence of AVP, was fixed at 138 μ l/min/100 g bw that corresponds to 80 ml/day/100 g bw [19].

The value of Na⁺ clearance used in the model (table 1) was calculated from experimental data reported in four distinct studies [21-24] and calculations are presented in Additional file 2. Na⁺ clearance combined with the action of the AVP controller are however, not sufficient to overcome the small variations in ECF volume resulting from the change in ECF osmolality (data not shown). We thus, implement two additional controllers in the model to introduce a volume-dependent change in Na⁺ excretion (active natriuresis) or in Na⁺ retention. These active controllers will be referred to as the atrial natriuretic peptides (ANP) factor and as the aldosterone (ALD) factor, respectively. ANP_{factor} is a multiplicative factor (≥ 1) on Na⁺ excretion that accounts for an increase in ECF volume over the volume setpoint (table 1). ALD_{factor} is a multiplicative factor (≤ 1) on Na⁺ excretion that accounts for a decrease in ECF volume below

the volume set-point. The rate of Na⁺ excretion is calculated every minute with the following equation :

$$Na_{urine}^+ = [Na_{ECF}^+] \cdot C_{Na^+} \cdot ALD_{factor} \cdot ANP_{factor} \quad (2.2)$$

Na_{urine}^+ refers to the millimoles of Na⁺ excreted during the current minute of the simulation. $[Na_{ECF}^+]$ is the ECF [Na⁺] one minute before the current minute. C_{Na^+} is the Na⁺ clearance defined in Table 1.

ANP_{factor} was calculated from Paul et al. (1988) in two separated steps : (1) The plasma ANP concentration was first computed as a function of the expansion of the plasma volume (from Figure four in Paul et al., 1988) and a linear interpolation was added between the experimental values. The maximum ANP level was set to 2000 pg/ml (the upper limit appearing in Figure four of Paul et al., 1988) to prevent a non-linear error in case of large volume changes. (2) The increase (in percent) in natriuresis was associated with the plasma ANP concentration (from Figure five in Paul et al., 1988) and this percentage is used as the ANP_{factor} .

ALD_{factor} was based from two studies [25,26]. Figure oneB of Stricker et al. (1979) was first adapted to express the aldosterone concentration as a function of the ECF volume instead of the plasma volume. The study of Morris et al. (1973) was then adapted to compute ALD_{factor} as a function of the aldosterone concentration. Here the dose of aldosterone (μ g) was converted to aldosterone concentration by dividing the dose by the volume of plasma. Moreover, a linear interpolation including an ALD_{factor} with an upper limit of 1 (for aldosterone concentration of 0 ng/100 ml) and a lower limit of 0.2 (for aldosterone concentration of 200 ng/100 ml) was introduced to the conversion of the experimental data.

2.4.3.4 System 3; the meta-box “Digestive system”

This meta-box is created to simulate water and Na⁺ intake. It contains a digestive module and a motivation module making this meta-box the most complex of the model. The “digestive module” simulates the transition of orally ingested water from the stomach to the intestine and its final absorption in the ECF. This module reproduces the intestine and stomach modules generated by Toates et al. (1970), which was based on

experimental data from two studies [27,28]. Our model includes the same time constants for (1) the active and passive exchange of water and Na⁺ between the stomach, intestine and ECF, and (2) the emptying of water content from the stomach to the intestine.

The motivation module takes the decision of drinking distilled water or Na⁺-containing water. These decisions are based on two simple rules that are sufficient to reproduce realistic behavior.

Rule 1 : If ECF [Na⁺] exceeds the pre-established setpoint by a threshold of 4% [5,29], the motivation module allows intake of distilled water until the ECF [Na⁺] is restored, or until the stomach is full (volume of 5 ml). In the latter case, water intake stops until the stomach volume is reduced to a comfortable level (3.1 ml) by emptying water into the intestines and by passive diffusion to the ECF.

Rule 2 : If ECF [Na⁺] is normal (142 mmol/L) or slightly lower, the motivation module allows intake of Na⁺-containing water (50 mmol/L or 0.28% of Na⁺) to model unregulated drinking [30]. In the simulation, unregulated drinking is triggered randomly following a statistical distribution, which is a translated sinusoidal to account for the circadian modulation of fluid and electrolyte intake.

There is no access to dry food in the model and the introduction of Na⁺-containing water compensates for the lack of this essential source of Na⁺. The amount of Na⁺ contained in the water is adjusted to approximately match the daily amount of Na⁺ ingested by a rat of 255 g fed with regular pellets (0.3% Na⁺). Instead of randomly injecting Na⁺ in the model, the sodium input is associated with water input since in reality the feeding and drinking period are associated in rat.

2.4.3.5 System 3 ; the box “Unregulated water balance”

This box includes a constant factor that accounts for the balance between the loss of water in sweat (22 ml/day) and feces (4 ml/day) versus water gained from eating food (2.6 ml/day) and metabolic processes (7.9 ml/day). Reference values were obtained from [10] and were linearly scaled for a rat of 255 g. In the simulation, the water balance is negative (-0.0108 ml/min or -15.5 ml/day) implying that the gain of water from food and metabolic process is not sufficient to offset the loss of water from sweat and feces. Therefore, the water intake through drinking has to overpass the urine volume to prevent the loss of body fluid.

2.4.3.6 System 3 ; the meta-box “Hydromineral challenge”

This box contains two distinct hydromineral challenges that can be switched on during the simulation. All of the virtual challenges occur during the sleeping period of the rat, a period during which most of the experimental protocols are performed in laboratories. Simulation of hydromineral challenges, inducing either intracellular or extracellular dehydration, are intended to predict changes in the ECF $[Na^+]$ and volume, in the ICF volume as well as the changes in AVP secretion.

2.4.3.7 Challenge 1 : intracellular dehydration

This virtual challenge simulates the effect of a short-term (10 minutes) jugular injection of 1 mmole Na^+ . This injection of Na^+ *per se* (without water) was intended to mimic a rise in extracellular osmolality creating an intracellular dehydration. This challenge evokes AVP secretion and osmotic thirst leading to water intake.

2.4.3.8 Challenge 2 : extracellular dehydration

This challenge simulates the effect of a loop diuretic (furosemide) that is known to induce a rapid urinary loss of Na^+ and water. The resulting loss of fluid stimulates AVP secretion and hypovolemic thirst leading to water and salt intake. The effects of furosemide were simulated by substituting the regular kidney output of the model (see meta-box “kidney” above) by a computed furosemide output. This specific output consisting of a modified urine flow rate and $[Na^+]$ induced by the furosemide injections were calculated from two studies reporting the dynamics of these parameters after furosemide treatment [31,32]. Linear interpolation of the data illustrated in Figure one in Kikkoji et al. (1988) and in Figure one in Hori et al. (1988) served to calculate the urine flow rate and $[Na^+]$, respectively.

2.5 Experimental measurements

Experiments were carried out according to the recommendations of the Canadian Council on animal care and approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Université Laval.

2.6 Results

The following section presents the computed predictions of the dynamics of six parameters of interest : the body fluid compartments (ECF [Na⁺] and volume; ICF volume), the AVP level and the water intake and excretion under balanced hydromineral conditions (control) and during two evoked hydromineral challenges.

2.6.1 Computed predictions under control hydromineral conditions

Here, the control conditions refer to a rat being active during the night and sleeping during the day. The rat has free access to water and sodium by bouts, randomly and mostly distributed during the night. These control conditions in our simulation are not “steady-state” simulation. Indeed constant inputs and outputs do not represent physiological conditions for a rat (except under anesthesia and continuous water and salt perfusion). The simulation under control conditions quantifies the mean level of the six parameters of interest for 24 h, over a period of 20 consecutive days. The mean and standard deviation of each parameter over that longterm simulation are presented in table 2. Note that the predicted ECF [Na⁺], ECF and ICF volume remain stable over the long-term simulation and agree with the physiological expectations. Beyond these global data, the simulation predicts significant differences between the sleeping period (8 AM to 8 PM) and the waking period (8 PM to 8 AM) of the rat over the period of 20 consecutive days. The low probability of unregulated drinking that occurs during the sleeping period is correlated with a weak cumulative water intake (12 ± 4 ml) and a moderate increase (2.1%) in ECF [Na⁺]. Indeed, the predicted maximal ECF [Na⁺] for this period is 145 ± 1 mmol/L compared to the daily mean ECF [Na⁺] that includes both the sleeping and the waking period (142 ± 1 mmol/L; paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days). The predicted ECF volume (daily mean : 58 ± 2 ml) reaches a minimum of 54 ± 2 ml (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days) and the ICF volume (daily mean : 116 ± 1 ml) shows a minimum of 113 ± 1 ml during the sleeping period. These changes are correlated with a progressive increase in AVP, which reaches a maximal level of 7 ± 4 pg/ml compared to the daily mean AVP level of 3 ± 2 pg/ml (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days). During the sleeping period, the urine flow is reduced from 0.021 ± 0.006 ml/min (daily mean) to 0.014 ± 0.004 ml/min (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days) and the urine [Na⁺] is increased from 80 ± 25 mmol/L (daily mean) to 91 ± 27 mmol/L (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days).

Interestingly, the high resolution of the long-term simulation (one minute) allows an instantaneous average of each parameter value over the period of the simulation (20 days). This average reduces the inter-day fluctuation of the parameters and highlights the overall trend of the circadian dynamic of the parameters (Figure 3). It clearly indicates that waking period is split into two distinct phases defined here as the restoration phase and the maintenance phase. The onset of the restoration phase corresponds to the peak of AVP level (5 ± 2 pg/ml) and to the maxima of ECF [Na+] (144 ± 1 mmol/L; Figure 3A and 3B, dotted line 1). The simulation predicts that restoration of AVP concentration (Figure 3B) requires cumulative water absorption of approximately 22 ml (Figure 3F) and has a duration of approximately 8 h. The maintenance phase follows the restoration phase. The onset of this phase corresponds to the time point at which the current AVP concentration is not significantly different from its steady-state concentration observed between 2 and 8 AM. Using the confidence interval of this period (1.2 pg/ml to 2.1 pg/ml, with a confidence level of 95%), the onset of the maintenance phase is set to 2.1 pg/ml of AVP (Figure 3B, dotted line 2). At the beginning of this phase the ECF [Na+] is restored to a value of 140 ± 1 mmol/L (Figure 3A, dotted line 2). The maintenance phase is essentially composed of unregulated drinking that reflects the mean Na+ and water consumption expected for a rat of about 255 g. The maintenance phase is characterized by a weak variability of the AVP level and a relative stability of the parameters of the body fluid compartment.

2.6.2 Validation of the model by experimental data

It is essential to validate the predictions of the simulation produced under balanced hydromineral condition. This step is crucial to insure that the prediction of each parameter of interest over a period of 24 h agree with physiological expectations and are supported by published experimental data. However, these experimental data have to fulfill criteria for compatibility with the present model : They have to be sampled from adult animals and from rat strain that do not present physiopathological conditions (Wistar, Sprague-Dawley and Long-Evans rat strain). The animals have to be housed in regular laboratory conditions (ad libitum access to regular food diet and water, 12 h circadian cycle, normal temperature). Table 2 summarizes the prediction of the mean and standard deviation of each parameter of the simulation tested over a period of 20 consecutive days and it presents experimental data collected from many studies, which are in agreement with the simulated parameters.

In addition to the validation of the daily means over a long-term simulation, it is important to validate the high-resolution (one minute) dynamic of the simulation. The

Table 2 Long-term predictions of the physiological parameters of the simulation

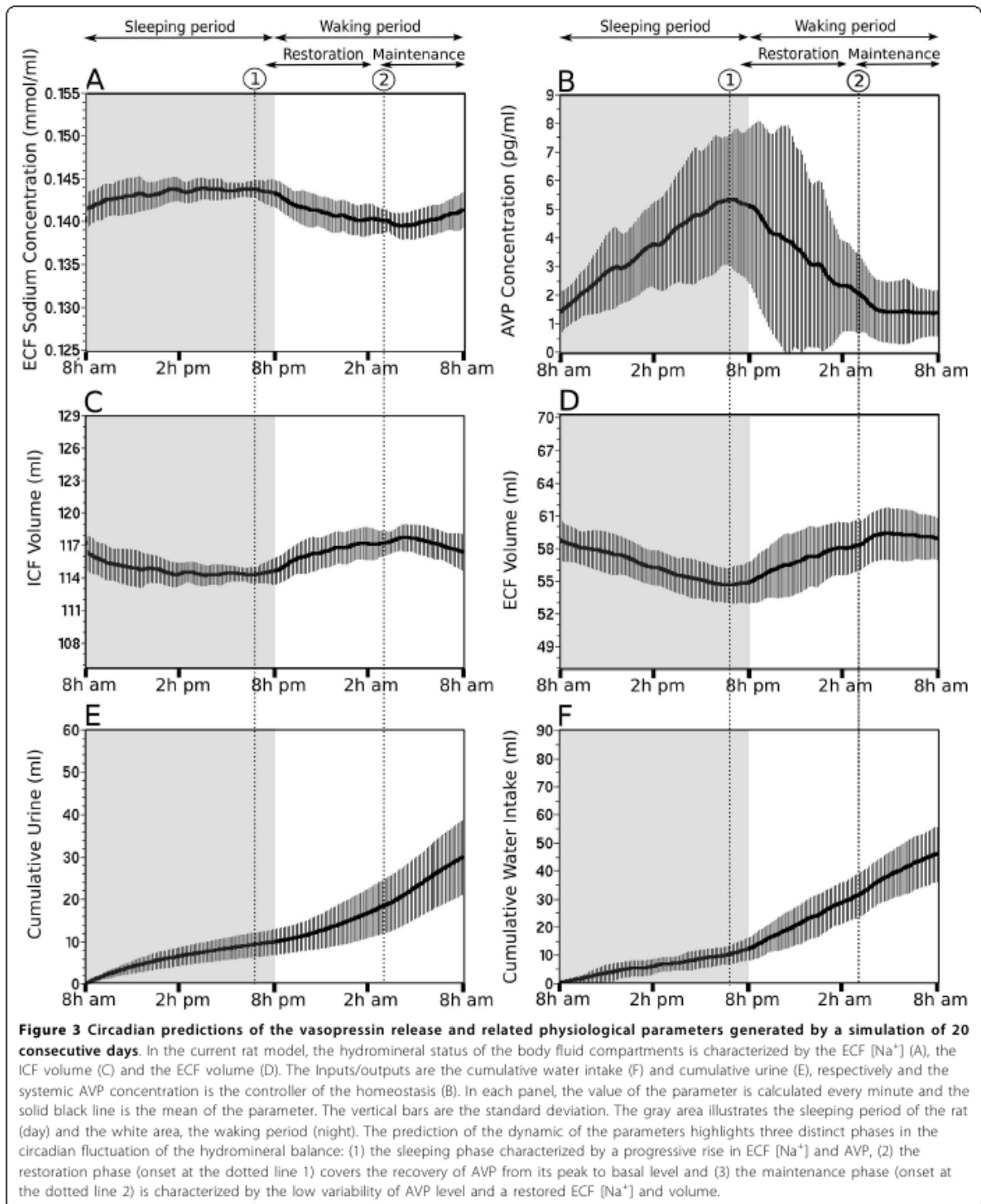
Parameters	Mean	SD	Physiological values and references
Mean ECF Volume (ml/100 g)	22.6	0.6	$\approx 21.9^{**}$ [10]; 22.3 ± 0.8 [49] $\approx 23.7^{**}$ [50]; ≈ 23.1 [12]; 23.2 ± 2.4 [51]; 24 ± 2 [52]
Mean ECF [Na+] (mmol/L)	142.2	0.7	138 ± 2.6 [22]; 140 ± 3 [53]; 141 ± 2 [46]; 141.6 ± 0.3 [54]; 142 ± 1 [55]; 143.3 ± 0.4 [37]; 129 to 150 [17]
Mean AVP (pg/ml) during the maintenance phase	1.7	0.9	1.1 ± 0.21 [56]; 1.7 ± 0.3 [23]; 1.8 ± 0.3 [54]; 1.9 ± 1.1 [46]; 2.3 ± 0.9 [20]; 2.5 ± 1.3 [53]
Urine Volume (ml/100 g)	11.8	3.4	10.8 ± 3.6 [57]; 8.9 ± 5.9 [17]; 13 [19]; 13 ± 2 [58]; 14 ± 1 [34]
Water intake (ml/100 g)	18.0	3.7	15.2 ± 1.8 [10]; ≈ 16 [38]; 20 ± 3 [58]
Na+ intake (mmol/100 g)	0.69	0.17	≈ 0.75 [59]; 0.84 ± 0.02 [34]; 0.97 ± 0.14 [23]
Mean ICF Volume (ml/100 g)	45.3	0.3	≈ 45.9 [12]; 45 ± 1 [50]**; $44.5 \pm 3.1^{**}$ [51]; ≈ 44.6 [10]; $50 \pm 5^{**}$ [52]

Daily mean and standard deviation of each parameter are obtained after 20 consecutive days of simulation under control conditions. All the predictions are coherent with experimental data reported in the literature according to their deviations. Some experimental data had to be normalized for comparison. The ** symbol indicates that the value was obtained by subtracting the ICF or ECF volume of the model from the total water content of the rat measured experimentally.

lack of experimental data approaching the present temporal resolution is critical. However, few studies did collect data with a high enough resolution to validate the simulated dynamics [33-36]. Additional file 3 compares the dynamics of the water intake (input), urine volume (output) and AVP concentration (controller) with these experimental data. The goodness of fit of our simulated parameters was considered satisfactory if the mean of the experimental data is included within the standard deviation of the simulated parameter for 24 h. Additional file 3 indicates that the simulated dynamic of water intake, urine volume and AVP concentration are in agreement with published experimental data measuring these three parameters at several time points during 24 h.

2.6.3 Role of early water intake in reducing variability of ECF [Na+] and circulating AVP level

Data summarized in table 2 highlight the presence of large daily fluctuation in fluid and electrolyte intake over the long-term (here 20 days). These differences mainly depend on the frequency and distribution of unregulated drinking in the simulation (see the metabox “digestive system” in methods) and illustrate the random nature of the daily fluid and electrolyte consumption of the rat. Here the simulation tested the influence of this random consumption on the level and dynamic of the ECF [Na+] and AVP for a period of 24 h. The occurrence of a single additional drinking bout (forced drinking) at the onset of the sleeping period (Figure 4F, dotted line 1) delays the increase in ECF [Na+] (Figure 4A, gray line), compared to the absence of additional drinking bout (Figure 4A, black line). In this example, the additional drinking bout reduces the circulating level of AVP by about 1 pg/ml (Figure 4B) and shortly delays the onset of the maintenance phase (Figure 4B). The fluctuation of both the ECF and ICF volume



are also attenuated (Figure 4C and 4D). These predictions highlight the high sensibility of the system to random daily fluctuation in the frequency and distribution of drinking bout.

2.6.4 Role of the ICF compartment in reducing variability of ECF [Na+] and circulating AVP level

The long-term simulation predicts a circadian fluctuation in ICF volume, likely indicating a putative role of the ICF compartment in stabilizing the ECF [Na+]. In order to validate that hypothesis, we simulated a lack of water transfer between the ICF and ECF fluid compartments for a period of 24 h (Figure 5C, solid gray line). Interestingly, this test predicts a sharp increase in ECF [Na+] during the sleeping period that rapidly exceeds the threshold for drinking (4%, Figure 5A, line 2) and triggers water intake (Figure 5F, dotted line 1). Moreover, the occurrence of sharp rise in ECF [Na+] over the threshold is also increased, triggering additional need-induced water intake to restore ECF [Na+] (Figure 5F). The simulation also predicts increased AVP level fluctuation (Figure 5B) that contributes to attenuate fluctuation in ECF [Na+]. It also appears from this prediction that drinking bouts occurring at the end of the sleeping period and during the waking period (Figure 5F) trigger fluctuation of larger amplitude in the ECF [Na+] (Figure 5A) and circulating AVP level (Figure 5B). The water intake needed to compensate for the lack of ICF water transfer is approximately 9 ml over a period of 24 h, representing 19% of the daily water intake. The fluctuations in ECF [Na+], circulating AVP level and drinking bouts are greatly attenuated when the ICF compartment is included in the simulation (Figure 5, solid black line), emphasizing the buffer role of the ICF compartment, working in synergy with circulating AVP to maintain the stability of the ECF [Na+] and to lower the daily need of water intake.

The previous results demonstrate that this model of rat hydromineral homeostasis produces coherent predictions of the major parameters of the system under balanced hydromineral conditions indicating that all essential components are included in the model. The next series of simulations are intended to predict changes in these parameters in response to hydromineral challenges.

2.6.5 Challenge 1 : Intracellular (osmotic) dehydration

The challenge consists of injecting 1 mmol Na+ over 10 minutes into the ECF compartment. The Na+ infusion abruptly raises the ECF [Na+], creating a threatening hyperosmotic condition (Figure 6A). The simulation indicates that the responses en-

gaged to restore the ECF $[Na^+]$ level occur in two distinct phases contributing to an increase in the ECF volume (Figure 6D). The first phase consists of a rapid transfer of water from the ICF to the ECF compartment (Figure 6C, dotted line 1). The reduction in the ICF compartment reaches 3% of its initial volume in a short interval, causing intracellular dehydration. Na^+ infusion also triggers an immediate rise in AVP levels that is added to the initial increase resulting from the reduced probability of drinking during the sleeping period (Figure 6B). The peak in AVP (3.2 pg/ml) reduces the urine flow rate to optimize water conservation and lower the ECF $[Na^+]$. Note that the rise in AVP is concomitant to 5.5 fold increased in urine Na^+ concentration (data not shown). The second corrective phase consists of water absorption (Figure 6F, line 3). This phase is shortly delayed and is engaged after the ECF $[Na^+]$ exceeds the pre-established threshold (Figure 6A, line 2) and after the stomach starts exchanging water with the ECF and the intestine. The intake of distilled water also contributes to the increase in ECF volume and also acts to restore the ICF volume. The rapid dilution of the extracellular Na^+ by exchanging water with the ICF, by ingesting water and by increasing renal Na^+ excretion are responsible for the quick recovery of the ECF $[Na^+]$.

2.6.6 Challenge 2 : Extracellular (hypovolemic) dehydration

The challenge consists of two injections of furosemide without access to water during the first 4 h. That depletion period is followed by 20 h of a Na^+ deficient diet and ad libitum access to tap water. The challenge starts at 8 AM (day 1) after one day of simulation under balanced hydromineral conditions (day 0). The 24 h pre-simulation is intended to generate hydromineral parameters that fluctuate slightly from their pre-established set-point. The dynamics of these parameters are presented in Figure 7 as a control (solid black line). Note that cumulative urine volume and water intake at the onset of day 1 are thus, above 0 (Figures 7E, F, respectively). As expected, furosemide injections rapidly increase the cumulative urine excretion by 10.5 ml (35% of the cumulative urine volume; Figure 7E, gray line) decreasing the ECF volume by approximately 10% (Figure 7D). AVP shows a sharp and massive release (Figure 7B, gray line) with a peak of 8.2 pg/ml during the furosemide protocol. AVP release reduces the urine flow rate to a minimum ($0.5 \mu\text{l}/\text{min}$ predicted after the first 4 h of the simulation). Interestingly, the simulation also predicts an increased ECF $[Na^+]$ of approximately 6% (Figure 7A) due to the negative balance between water and Na^+ loss. Note that the rise in $[Na^+]$ exceeds the threshold (Figure 7A, line 4) and would have triggered drinking if water was available. The ICF volume is simultaneously reduced by 5% (Figure 7C) to buffer the increase in ECF $[Na^+]$. Predictions of all the physiological parameters after 4 h of extracellular dehydration are summarized in Table 3 and compared to the control day. The furosemide treatment induces mild hypovolemia and the simulation

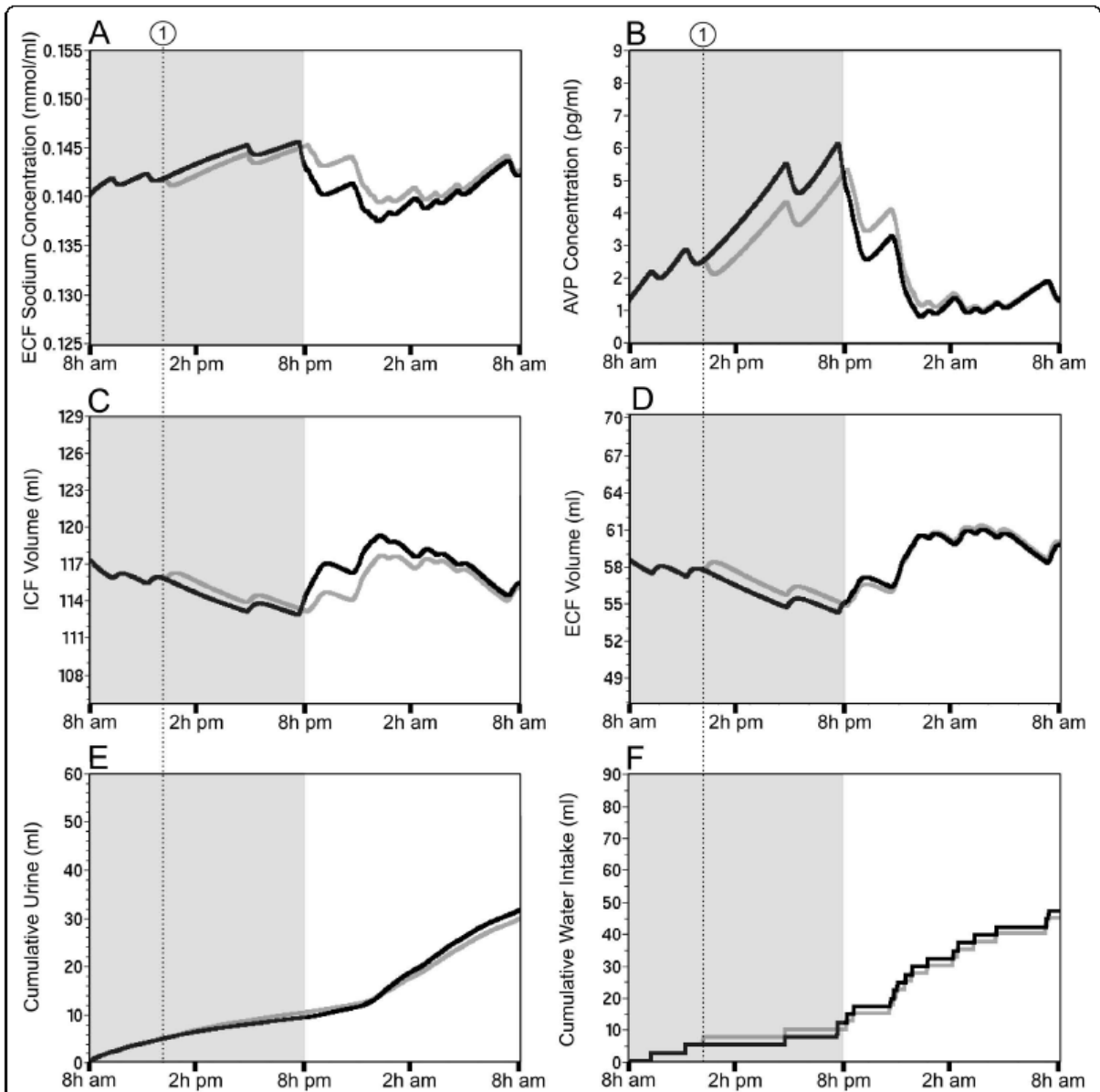


Figure 4 Predictions of the AVP secretion depends on the fluid intake probability during the sleeping period. 24 h simulation of the hydromineral parameters is displayed under two distinct conditions. The solid black line illustrates the prediction of the AVP secretion and related hydromineral parameters when fluid intake occurs twice at the beginning of the sleeping period (F, control condition). The solid gray line illustrates the prediction of the hydromineral parameters when the rat was forced to take one additional bout of water (F, dotted line 1).

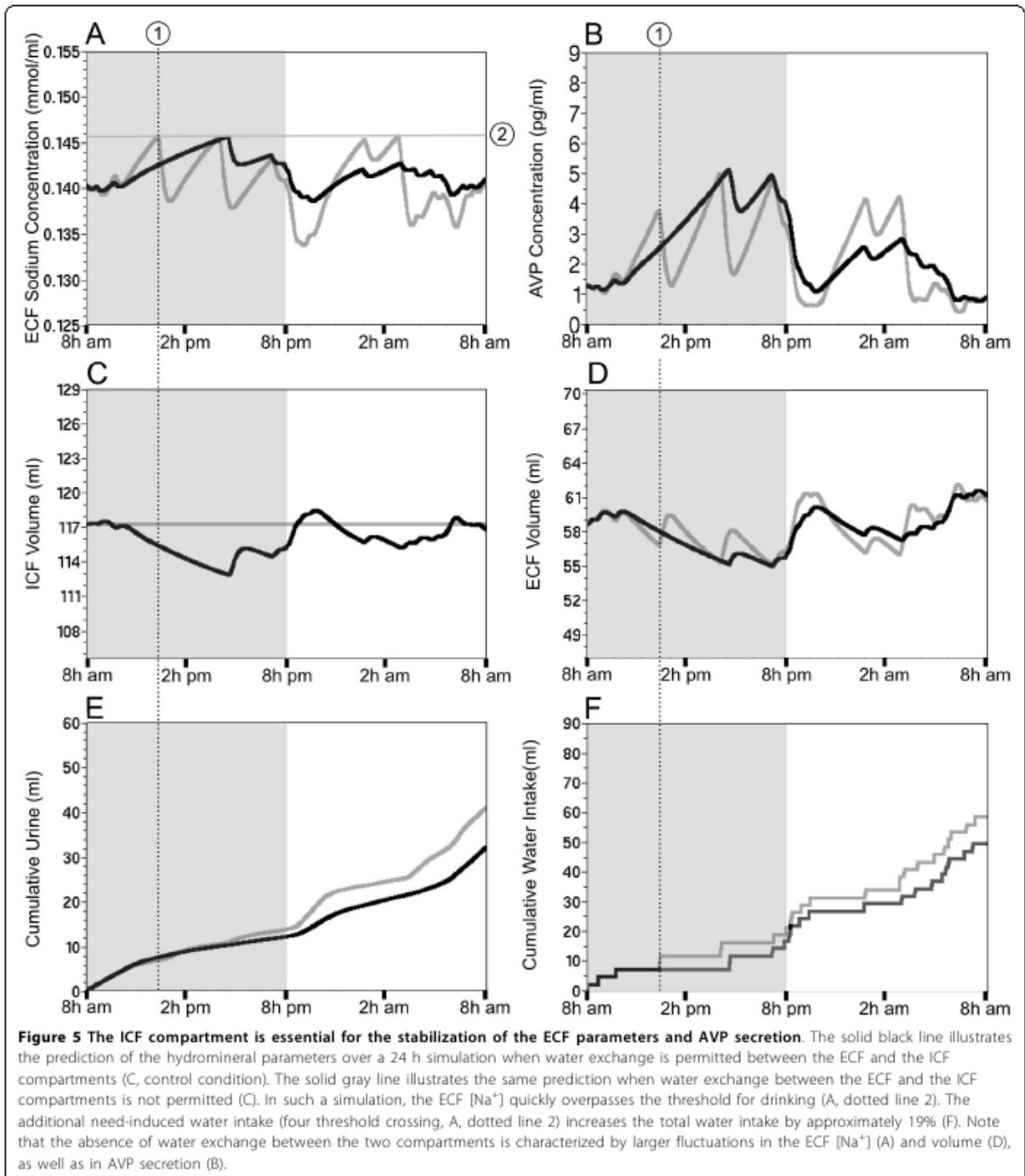
predicts water intake as soon as water is available (Figure 7F). Note the large water intake despite a low unregulated drinking probability during the sleeping period. The simulation predicts that water intake combined with the Na⁺ deficient diet set after the injections progressively reduces the ECF [Na⁺] to 134 mmol/L (Figure 7A), resulting in hyponatremia. The progressive decrease in ECF [Na⁺] is correlated with low level of ANP and a high level of ALD to minimize renal Na⁺ excretion (0.91 $\mu\text{mol}/\text{min}$ after the first 4 h vs. 1.08 $\mu\text{mol}/\text{min}$ at the end of the simulation). Moreover, water intake restores both the ICF and ECF volume. However, if repletion of the ECF volume is completed by the end of day 1 (Figure 7D, gray line), the simulation predicts an expansion of the ICF volume (Figure 7C, gray line). The overload of the ICF compartment likely results from the predicted low ECF [Na⁺] causing an osmotic movement of water to the ICF compartment. Predictions of all of the physiological parameters after 24 h of sodium depletion are summarized in Table 3. In order to validate the simulation of the extracellular dehydration, predictions for two parameters were compared to measurements carried out on rats in the same range of weight (245 ± 2 g, $n = 18$). The experimental data indicate that ECF [Na⁺] measured at the end of the experimental protocol (136 ± 3 mmol/L), as well as water intake measured 4 and 24 h after the start of the protocol (2.8 ± 2 ml/100 g bw and 17.5 ± 3.5 ml/100 g bw, respectively) are all within the range of the predicted values.

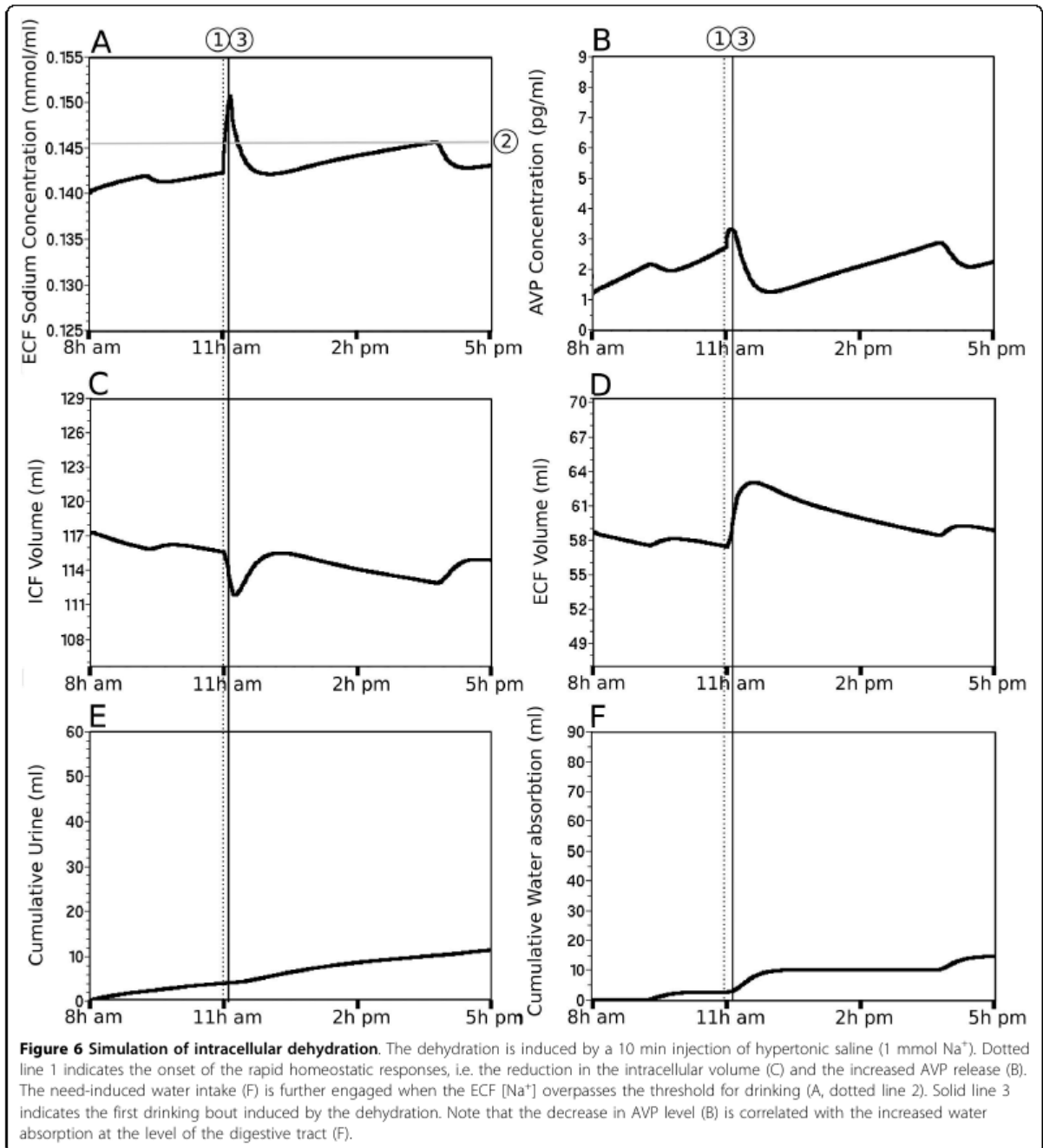
2.7 Discussion

The high temporal resolution of the graphical output of the simulation gives new insights into the hydromineral dynamic of the rat and allows the simulation to answer fundamental questions about the homeostatic parameters. The model integrates experimental data of different forms into specific meta-boxes to translate the biological realities into equations (i.e., $[\text{Na}^+]_{\text{urine}}$) or computational algorithms (i.e., the motivation module). Here, we discuss some of the strategic choices we made while building our model.

2.7.1 Assumptions on the inputs to the body fluid compartments

Our model requires a “digestive module” sub-system to simulate the obligatory delays between fluid and Na⁺ intake and their absorption by the body. For that purpose we used the time constants reported in a previous computer simulation of the water ba-





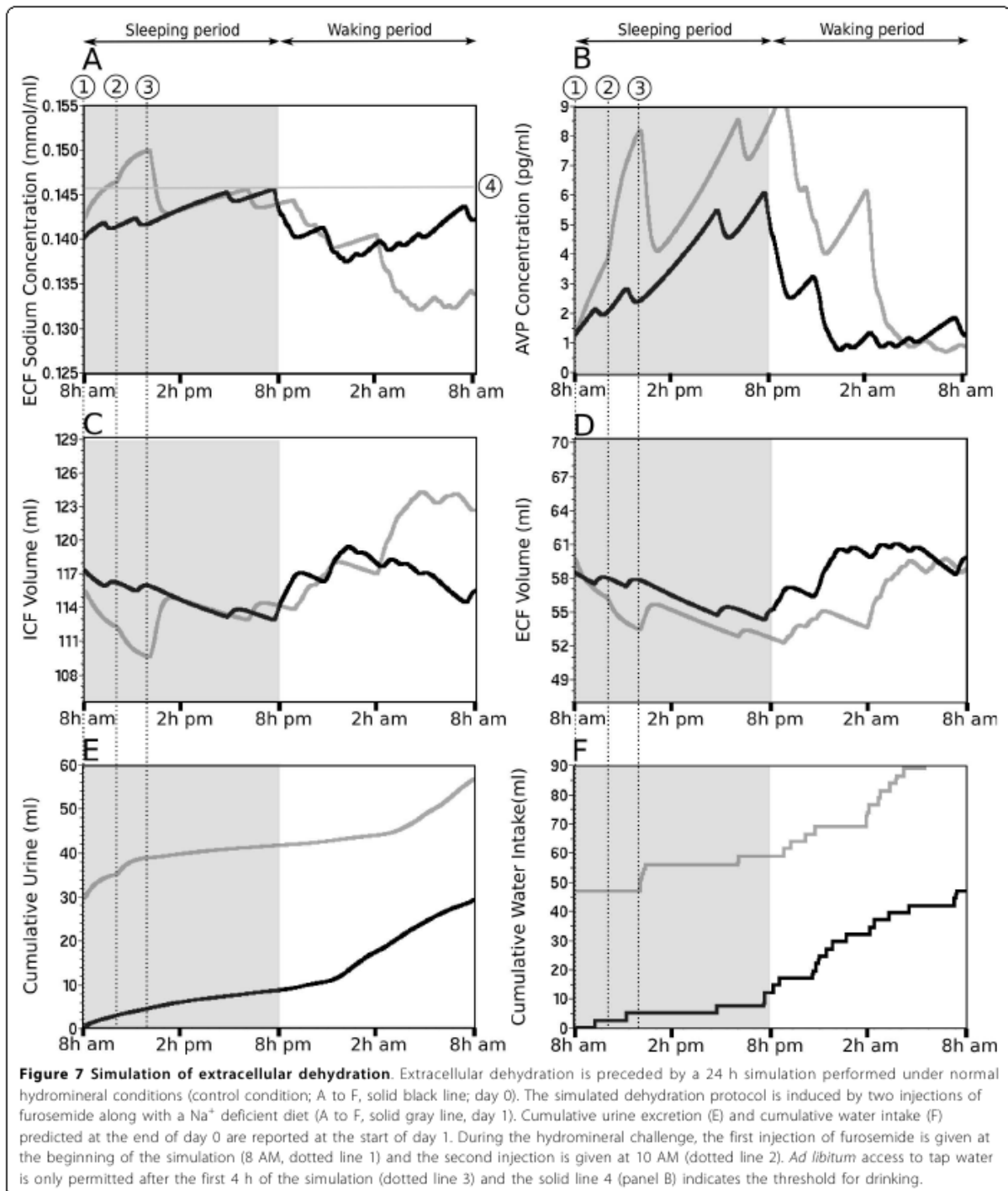


Table 3 Predictions of the hydromineral parameters obtained with the simulated extracellular dehydration protocol (furosemide injections combined with a Na⁺ deficient diet)

Parameters	First 4 h (day 0) Control	First 4 h (day 1) Extracellular dehydration	24 h (day 0) Control	24 h (day 1) Extracellular dehydration
Mean ECF [Na ⁺] over the period (mmol/L)	141.6	146.8	141.8	141.3
Mean [AVP] (pg/ml)	2.2	4.5	2.7	4.8
Mean ECF Volume (ml/100 g)	22.7	22.0	22.7	21.7
Mean ICF Volume (ml/100 g)	45.5	44.0	45.4	45.6
ECF [Na ⁺] at the end of the period (mmol/L)	141.8	149.9	142.2	134.0
Cumulative Urine Na ⁺ (mmol/100 g)	0.1	0.3	0.83	1.19
Water intake (ml/100 g)	0.1	3.5*	18.2	20.3
Na ⁺ intake (mmol/100 g)	0.0072	0	0.74	0.41
Urine Volume (ml/100 g)	1.8	4.1	12.4	12.8

Predictions at different time-points (4 h and 24 h) under control condition are listed under day 0 and predictions under Na⁺ deficit are listed under day 1. *** indicates the amount of water ingested during the first 4 h after access to tap water (see the method for a detailed description of the protocol).

lance [12]. In this model, the water and Na⁺ flow rates between digestive compartments were calculated from the water and [Na⁺] content of the stomach and intestine [27,28]. The model also includes passive and active transfer of water and electrolytes across the intestine wall. Various attempts were made to increase the accuracy of this module. For example, a second “digestive module” based on the recent study of Smith et al. (2007) was also tested in the model. However, the assumption of a constant rate (mmol/s) for sodium transfer between the digestive compartments [37] does not generate overall predictions in agreement with experimental data.

The model includes need-induced fluid intake, which is triggered when ECF [Na⁺] exceeds the pre-established set-point by 4%. Introducing this threshold in the model is based on two distinct studies [5,29]. In Anderson et al. (1990), the authors showed that a mean increase of 10 mosmol/L was needed to trigger drinking in pigs. This increase represents about 4% of the normal osmolality (289 mosmol/L). In the second study performed in humans, the authors presented a relationship between plasma osmolality and thirst sensation [5]. According to their regression function, a 4% increase in osmolality (298 mosmol/L vs. 287 mosmol/L) lead to a score of 5 over 10 in term of thirst sensation.

The “motivation” module of our model includes unregulated drinking, an essential aspect of fluid and electrolyte intake. Water and Na⁺ consumption exceed the daily needs of the rat and physiological stimuli do not stop unregulated drinking [30]. This aspect of fluid intake was therefore introduced in our model to enhance the realism of the prediction generated by the simulation. Moreover, a circadian modulation of unregulated drinking was added to the model. This modulation takes into account the fact that the probability of drinking is not constant over 24 h and the probability of

drinking was therefore modeled by a sinusoidal function of time with a minimum at 2 PM and a maximum at 2 AM. The maximum probability was set to the middle of the waking period (2 AM) in agreement with the fact that drinking is correlated with eating [38] and that rats almost exclusively eat during their waking period (night ; [36]).

2.7.2 Assumptions on the outputs to the body fluid compartments

It is known that the rate of renal Na⁺ clearance can be slightly affected by hormones such as AVP [39,40]. However, the absence of suitable data on Na⁺ clearance as a function of AVP concentration and the fact that the effect is negligible in most condition [9] led us to consider a non-variable parameter in the model. This nonvariable Na⁺ clearance does not imply a fixed Na⁺ excretion in the model. Indeed, variable urine Na⁺ excretion mechanism was introduced to control ECF [Na⁺] and volume (ANPs factor), as well as a Na⁺ retention mechanism (ALD factor). The actions of these mechanisms combined with the action of the AVP controller exert a powerful mechanism of urine concentration.

AVP is the main controller of the model. The measurable AVP concentration in the plasma represents the equilibrium between AVP secreted from the pituitary gland and its clearance [41]. However, in our model, those two components of the equilibrium are not simulated individually, only the resulting AVP level. In order to have a more realistic simulation, we included the delay imposed by the fixed clearance of AVP. When AVP secretion is reduced, an exponential decay of plasma AVP concentration was introduced in our model. This decay was adjusted so that 15% of circulating AVP is cleared every minute [18] until the correct AVP level is reached. In addition, a recent study evaluating the circadian changes of plasma vasopressin in patients presenting nocturia, has reported a circadian modulation of AVP [42]. Inspired by this paper, a modulation of AVP was introduced in the model by assuming that a mechanism lowers the AVP level before the sleeping period of the rat in order to prevent nocturia. Based on Figure one of Graugaard-Jensen et al. 2006 (but with a 12 hours phase since rat are active during night and rest during the day), we introduced the following modulation : at 2 AM, the level of AVP is reduced in a linear function of time until a nadir of -30% is reached at 8 AM. Then, AVP concentration is restored to its computed level by 11 AM. It should be noted that the lack of these two regulatory mechanisms controlling the level of circulating AVP greatly impairs the quantitative and dynamic predictions of this parameter and resulting ECF [Na⁺].

2.7.3 Focus on the long-term simulation of hydromineral balance

In the present study, the predictions mainly concern six individual parameters characterizing the hydromineral parameters and homeostatic responses : The ECF $[Na^+]$ and volume, the ICF volume, the AVP secretion and the cumulative water intake and urine excretion. We simulated normal hydromineral conditions to validate our model in terms of a quantitative prediction of the parameters of interest. Comparison of these predictions with published experimental data (Table 2) allows us to conclude that our model contains at least the minimal and essential sub-systems that are required to model the hydromineral balance. Moreover, these subsystems are correctly connected using appropriate approximations and time constants to produce overall realistic predictions. Therefore, the present high-level model is appropriate to deliver realistic simulation of AVP secretion and ECF osmolality under normal hydromineral conditions, i.e. when the rat meets regular conditions of laboratory housing. This latter assumption might reduce the precision of any predictions on the biological parameters of interest made under either pathophysiological conditions, or extreme experimental conditions (hemorrhage, severe dehydration) as these specific situations require the implementation of additional regulatory systems.

The simulation over 20 consecutive days predicts relatively large inter-day fluctuations in AVP, in water and electrolyte intake and in urine excretion compared to the stability of the ECF and the ICF parameters (see Table 2). These fluctuations indicate that the daily distribution of fluid and electrolyte intake under normal osmotic conditions is not completely correlated with physiological needs. On the contrary, the fluctuations might reflect the unregulated nature of water intake and suggests that either a deficit, or overload in fluid and Na^+ consumption occur on a daily basis. These large discrepancies may explain the inter-individual variability that has been reported in experimental data. For example, measurement of the urine flow rate and urine osmolality in a population of male Sprague-Dawley rats extended over an almost threefold range (Figure three in Bankir, 2001).

The long-term simulation produced mean data and smoothed the random variations in each parameter tested, leading to the identification of two distinct phases during the active period of the rat : the restoration and the maintenance. The identification of these two phases was based on the prediction of a time-dependent secretion of AVP that is well correlated with the phases of the hydromineral cycle. The predicted dynamics

of plasma AVP shows a constant rise over the sleeping period of the rat (daylight) and a decrease during the active period of the rat (night). This pattern of secretion matches the partial experimental observations indicating a circadian pattern in plasma vasopressin level with a peak in secretion at the end of the sleeping period [11,35,36]. However, the temporal resolution of the experimental measurements is not as accurate as the simulation (4 measurements for Windle et al. 1992 and 6 for Granda et al., 1998 compared to 1440 for the simulation) and the estimation of the mean experimental AVP level and peak concentration for 24 h might be biased by individual fluctuations as shown in the Additional file 3. The temporal resolution of the simulation, as well as the average of AVP level at each time point for several consecutive days greatly improves our perception of the circadian secretion of AVP.

Interestingly, the simulation allows the prediction (quantification and dynamic) of parameters that would be difficult to measure experimentally, such as the ICF and ECF volume. Here, the long-term simulation highlights the role of the ICF compartment in the stabilization of the ECF volume. The sleeping period is associated with a progressive decrease in the ECF volume that is concomitant to the decrease in the ICF volume. The parallel depletion of both fluid compartments suggests the importance of water transfer between the ICF and the ECF compartment to attenuate the depletion of the extracellular compartment. The role of the ICF compartment was further demonstrated using a 24-h simulation, during which fluid exchange was blocked. Under these conditions, the threshold for drinking was reached more often and small random perturbations in the ECF $[Na^+]$ or AVP caused by drinking became larger. It should be noted that the role of the ICF compartment as a buffer is a primary and fast compensatory response triggered by all the simulated hydromineral challenges. The predicted reduction in the ECF volume during the night (maximum 7%) is certainly caused by evaporative water loss, which is compensated neither by water intake, nor by metabolic water. However, such a change in volume is not necessarily associated with hypotension. Indeed, blood pressure is regulated by additional mechanisms like vasoconstriction.

2.7.4 Focus on the simulations of hydromineral challenges

The simulations of the hydromineral challenges yielded several important results. The simulation of intracellular dehydration indicates that restoration of the ECF $[Na^+]$ mainly involves two sets of responses with different dynamics. Water transfer from the ICF to the ECF, and AVP secretion are rapid homeostatic responses. Need-induced water intake is delayed and has a high impact on both the ICF volume and ECF $[Na^+]$. However, avid drinking creates hypervolemic conditions and further restoration of the

ECF volume involves water and salt excretion that extends over the next 6 h.

The simulation of furosemide injection led to predictions that are in agreement with the experimental data. It also indicates that hyponatremia is only achieved by combining diuretic injections with a Na⁺ deficient diet (134.0 mmol/L : predicted ECF [Na⁺] vs. 136 ± 3 mmol/ L : measured ECF [Na⁺] from our experimental protocol). Hyponatremia is correlated with a sustained increase in the ICF volume caused by the osmotic gradient generated between the ECF [Na⁺] and ICF [K⁺]. Furosemide injections *per se* induced hypernatremia, likely resulting from hyponatriuria. Experimental data showed that blocking Na⁺ re-uptake with furosemide injections led to urine [Na⁺] ranging from slightly hyponatriuric to hyponatriuric (approx. 120 ± 20 mmol in [43]; approx. 107 ± 22 in [44]; approx. 80 mmol in [31]). Despite a larger hyponatriuria, the data reported in Hori et al., 1988 (Figure oneA) were privileged because they provided the most detailed experimental measurements needed to create an accurate furosemide model. It should be noted that implementation of a higher Na⁺ excretion rate in the furosemide model would lower ECF Na⁺ content without creating hyponatremia. In this line, we tested the assumption in which we forced isonatriuria, approximately 140 mmol/L Na⁺, during the simulated furosemide treatment. This extreme simulation also led to slightly hypernatremic ECF after the first 4 h of simulation (data not shown), suggesting that furosemide treatment *per se* is not sufficient to cause efficient Na⁺ depletion of the ECF compartment.

2.8 Conclusion

In the present study, we developed a high-level simulation of hydromineral homeostasis. The coherence shown between the simulations (quantification, dynamics) and the experimental data indicates that the model integrates most of the essential components to predict realistic physiological values for the parameters under study. Therefore, the model is able to render quantitative and precise temporal predictions on the ECF osmolality and AVP secretion, as well as on their relationship with the ECF and ICF volume, making it an appropriate tool to predict the state of the rat hydromineral balance when challenged by various osmotic perturbations. Such predictions will help in the design of experimental protocols to test specific hypothesis. For example, we can suggest that the best period to experiment on rat is during the maintenance phase as this is the period where hydromineral fluctuations are less likely. Also, obtaining a global view of all the hydromineral parameters that the simulation can produce with equivalent temporal precision would be difficult or impossible to obtain with *in vivo* measurements.

Moreover, one interesting application of the model is its use in predicting the putative action of pharmacological compounds on the hydromineral balance. As an example, we use the present model to simulate furosemide injections and our results are compatible with experimental data demonstrating that our model would be appropriate to test the action of other pharmacological compound affecting the homeostasis in the future.

The use of the model to an extended range of applications requires however, the implementation of additional components. For example, the implementation of a graded Na⁺ appetite would be possible by modeling a sophisticated renin-angiotensin-aldosterone system and digestive module in the model. Interestingly, substitution of the meta-box “vasopressin level” by a biologically inspired simulation of the magnocellular neuron network [45] in future versions of the simulation would allow us to predict how local modulation of neuronal excitability by osmotic challenges and drugs targeting these neurons would influence the dynamics of global homeostatic parameters in rats.

2.9 Acknowledgements

This project was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) MOP-178002. LN received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, ESD3-334440-2006).

2.10 References

1. Bourque CW : Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9 :519-531.
2. Denton DA, McKinley M, Weisinger RS : Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93 :7397-7404.
3. Johnson AK, Thunhorst RL : The neuroendocrinology of thirst and salt appetite : visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 1997, 18 :292-353.
4. Andersen LJ, Andersen JL, Pump B, Bie P : Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, 282 :R1754-1761.
5. Thompson CJ, Bland J, Burd J, Baylis PH : The osmotic thresholds for thirst and vasopressin release are similar in healthy man. *Clin Sci (Lond)* 1986, 71 :651-656.
6. Verbalis JG : Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, 17 :471-503.

7. Zerbe RL, Robertson GL : Osmoregulation of thirst and vasopressin secretion in human subjects : effect of various solutes. *Am J Physiol* 1983, 244 :E607-614.
8. Pidd M : Five simple principles of modelling. In 1996 Winter Simulation Conferences Edited by : Charnes JM, Morrice DJ, Brunner DT, Swain JJ 1996, 721-728.
9. McCann SM, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J : Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* 2003, 36 :165-181.
10. Rafecas I, Esteve M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M : Water balance in Zucker obese rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1993, 104 :813-818.
11. Terwel D, ten Haaf JA, Markerink M, Jolles J : Changes in plasma vasopressin concentration and plasma osmolality in relation to age and time of day in the male Wistar rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992, 126 :357-362.
12. Toates FM, Oatley K : Computer simulation of thirst and water balance. *Med Biol Eng* 1970, 8 :71-87.
13. Barron W, Schreiber J, Lindheimer M : Effect of ovarian steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol* 1986, 250 :E352-361.
14. Barron W, Stamouistos B, Lindheimer M : Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. *J Clin Invest* 1984, 73 :923-932.
15. Iwasaki Y, Gaskill M, Robertson G : Adaptative resetting of the volume control of vasopressin secretion during sustained hypovolemia. *Am J Physiol* 1995, 268 :R349-357.
16. Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y : Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol* 2004, 286 :E337-346.
17. Krinke GJ, Bullock GR, Bunton T : *The Laboratory Rat*. London, Academic Press 2000.
18. Gauer OH, Tata PS : Vasopressin studies in the rat. IV. The vasopressinwater-equivalent and vasopressin clearance by the kidney. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968, 298 :241-257.
19. Bankir L : Antidiuretic action of vasopressin : quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res* 2001, 51 :372-390.
20. Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, Robertson GL : The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest* 1973, 52 :3212-3219.
21. Ahloulay M, Schmitt F, Dechaux M, Bankir L : Vasopressin and urinary concentrating activity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 1999, 25 :213-222.
22. Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA : Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR) : role of renal nerves. *Life Sci* 2005, 76 :1805-1815.

23. Jonassen TE, Sorensen AM, Petersen JS, Andreassen F, Christensen S : Increased natriuretic efficiency of furosemide in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 2000, 31 :1224-1230.
24. Shirley DG, Skinner J : The effect of chronic sodium depletion on renal function in conscious rats. *Exp Physiol* 1994, 79 :161-173.
25. Morris DJ, Berek JS, Davis RP : Sex dependence of aldosterone response in rats. *Metabolism* 1973, 22 :923-926.
26. Stricker EM, Vagnucci AH, McDonald RH Jr, Leenen FH : Renin and aldosterone secretions during hypovolemia in rats : relation to NaCl intake. *Am J Physiol* 1979, 237 :R45-51.
27. O'Kelly LI, Falk JL : Water regulation in the rat : II. The effects of preloads of water and sodium chloride on the barpressing performance of thirsty rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 1958, 51 :22-25.
28. O'Kelly LI, Falk JL, Flint D : Water regulation in the rat : I. Gastrointestinal exchange rates of water and sodium chloride in thirsty animals. *Journal of comparative and physiological psychology* 1958, 51 :16-21.
29. Anderson CR, Houpt TR : Hypertonic and hypovolemic stimulation of thirst in pigs. *Am J Physiol* 1990, 258 :R149-154.
30. Fitzsimons JT : Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998, 78 :583-686.
31. Hori R, Okumura K, Inui K, Shibata T, Kikkoji T, Kamiya A : A quantitative method of evaluating the diuretic response to furosemide in rats. *Pharmaceutical research* 1988, 5 :694-698.
32. Kikkoji T, Kamiya A, Inui K, Hori R : Urinary excretion and diuretic action of furosemide in rats : increased response to the urinary excretion rate of furosemide in rats with acute renal failure. *Pharmaceutical research* 1988, 5 :699-703.
33. Fitzsimons TJ, Le Magnen J : Eating as a regulatory control of drinking in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1969, 67 :273-283.
34. Aizman RI, Rabinowitz L, Mayer-Harnisch C : Circadian rhythms and time course of adaptive sodium and potassium excretion in rats after uninephrectomy. *Am J Physiol* 1994, 266 :R1454-1462.
35. Granda TG, Velasco A, Rausch A : Variations and interrelation between vasopressin and plasma osmolality in diabetic rats with insulin treatment. *Life Sci* 1998, 63 :1305-1313.
36. Windle RJ, Forsling ML, Guzek JW : Daily rhythms in the hormone content of the neurohypophysial system and release of oxytocin and vasopressin in the male rat : effect of constant light. *J Endocrinol* 1992, 133 :283-290.

37. Smith CA, Curtis KS, Smith JC, Stricker EM : Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, 292 :R2089-2099.
38. Fitzsimons JT : The physiology of thirst and sodium appetite. *Monogr Physiol Soc* 1979, 1-572.
39. Elalouf JM, Di Stefano A, de Rouffignac C : Sensitivities of rat kidney thick ascending limbs and collecting ducts to vasopressin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83 :2276-2280.
40. Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K : Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res* 2001, 51 :470-480.
41. Davison JM, Sheills EA, Barron WM, Robinson AG, Lindheimer MD : Changes in the metabolic clearance of vasopressin and in plasma vasopressinase throughout human pregnancy. *J Clin Invest* 1989, 83 :1313-1318.
42. Graugaard-Jensen C, Rittig S, Djurhuus JC : Nocturia and circadian blood pressure profile in healthy elderly male volunteers. *The Journal of urology* 2006, 176 :1034-1039, discussion 1039.
43. Dobrowolski L, Sadowski J : Furosemide-induced renal medullary hypoperfusion in the rat : role of tissue tonicity, prostaglandins and angiotensin II. *J Physiol* 2005, 567 :613-620.
44. Sonnenberg H : Effects of furosemide, acetazolamide, and mannitol on medullary collecting-duct function in the rat kidney. *Pflugers Arch* 1978, 373 :113-123.
45. Roper P, Callaway J, Armstrong W : Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus : a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study. *J Neurosci* 2004, 24 :4818-4831.
46. Barron WM, Stamoutsos BA, Lindheimer MD : Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. *J Clin Invest* 1984, 73 :923-932.
47. Kaneko K, Okada K, Ishikawa S, Kuzuya T, Saito T : Role of atrial natriuretic peptide in natriuresis in volume-expanded rats. *Am J Physiol* 1987, 253 : R877-882.
48. Dicker SE, Nunn J : The role of the antidiuretic hormone during water deprivation in rats. *J Physiol* 1957, 136 :235-248.
49. Nose H, Morimoto T, Ogura K : Distribution of water losses among fluid compartments of tissues under thermal dehydration in the rat. *Jpn J Physiol* 1983, 33 :1019-1029.
50. Fitzsimons JT : Drinking by nephrectomized rats injected with various substances. *J Physiol* 1961, 155 :563-579.

51. Robinson DH, Conrad KP, Edwards BR : Comparison of body fluid compartment sizes in Brattleboro homozygous and Long-Evans rats. *Am J Physiol* 1984, 247 :F234-239.
52. Horowitz M, Samueloff S : Plasma water shifts during thermal dehydration. *J Appl Physiol* 1979, 47 :738-744.
53. Barron WM, Durr JA, Schrier RW, Lindheimer MD : Role of hemodynamic factors in osmoregulatory alterations of rat pregnancy. *Am J Physiol* 1989, 257 :R909-916.
54. Barron WM, Schreiber J, Lindheimer MD : Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol* 1986, 250 :E352-361.
55. Iwasaki Y, Gaskill MB, Robertson GL : Adaptive resetting of the volume control of vasopressin secretion during sustained hypovolemia. *Am J Physiol* 1995, 268 :R349-357.
56. Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y : Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 286 :E337-346.
57. Paul RV, Ferguson T, Navar LG : ANF secretion and renal responses to volume expansion with equilibrated blood. *Am J Physiol* 1988, 255 : F936-943.
58. Yuan K, Jin X, Gao S, Shah A, Kim SY, Kim SZ, Kim SH : Osmoregulation of natriuretic peptide receptors in bromoethylamine-treated rat kidney. *Peptides* 2009, 30 :1137-1143.
59. Beierwaltes WH, Arendshorst WJ, Klemmer PJ : Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1982, 4 :908-915.

2.11 Fichiers additionnels du premier article

Cet article est accompagné de trois fichiers additionnels qui ont été joints en annexe à cette thèse à la suite de l'article 1 dans son format original. Voici la description du contenu de ces trois fichiers :

2.11.1 Fichier additionnel 1

Ce fichier présente une comparaison de l'effet des changements osmotiques et des changements volumiques sur la sécrétion de vasopressine. La contribution principale de ce fichier est de montrer que les changements osmotiques ont toujours plus d'effet que les changements volumiques dans des conditions physiologiques.

2.11.2 Fichier additionnel 2

Ce fichier présente les calculs nécessaires pour obtenir la valeur de la clairance utilisée dans notre modèle. La valeur utilisée est basée sur des données hétérogènes venant de quatre articles différents. Une importante contribution de ce fichier est de montrer que la valeur moyenne calculée ($8.6\mu\text{l}/\text{min}$) est cohérente avec le domaine acceptable de valeurs des quatres articles, augmentant ainsi notre confiance en cette valeur moyenne.

2.11.3 Fichier additionnel 3

Ce fichier présente des comparaisons entre des prédictions de dynamiques circadiennes de la simulation et des dynamiques enregistrées expérimentalement. La contribution principale de ce fichier est de valider trois des six paramètres importants du modèle et de montrer que la prédiction de la simulation au sujet de la dynamique du volume d'urine (« la sortie principale », de l'absorption d'eau (« l'entrée principale ») et de la concentration d'AVP (« le contrôleur principal ») est en accord avec la réalité. Ce fichier est crucial pour la validation de la simulation de l'homéostasie hydrominérale et aurait du être inclus dans l'article au lieu d'être en fichier additionnel.

2.12 Informations supplémentaires au sujet des travaux effectués

2.12.1 Scilab - Scicos

La simulation utilisée dans le premier article a été implémentée avec Scilab-4.1.2 un logiciel libre semblable à Octave (libre ; open-source) ou à Matlab (commercial). Plus spécifiquement, l'extension Scicos a été utilisée, il s'agit d'une extension visuelle servant à faire facilement des simulations à partir de modèle. Cette extension est semblable au logiciel commercial Simulink (module d'extension de Matlab).

Dans l'article, le fichier de simulation utilisé est nommé Model-1.1.cos. En plus de ce fichier, il est nécessaire de compiler deux programmes supplémentaires (vthreshold_block2.sci et vthreshold_block3.sci) pour pouvoir exécuter la simulation. Ces deux programmes contiennent deux boîtes supplémentaires utilisées dans la simulation mais

qui ne font pas partie des fonctions standards de Scicos. Ces boîtes ont comme fonction de limiter la valeur d'un signal à un certain seuil de saturation (« threshold »). Le premier bloc (`vthreshold_block2.sci`) a deux entrées : le signal et la valeur du seuil de saturation supérieur. Le deuxième bloc a trois entrées, un seuil inférieur de saturation, un seuil supérieur de saturation et un signal. Il faut que ces boîtes soient compilées et placées en mémoire avant de lancer la simulation principale sinon celle-ci ne fonctionnera pas. Le script « `Run.sce` » s'assure de compiler les boîtes et de les charger avant d'ouvrir un dialogue demandant le fichier de simulation principal (`Model-1.1.cos`).

2.13 Liens avec les objectifs suivants de la thèse

Cet article correspond à l'objectif 1 de cette thèse. Le modèle et la simulation présentés dans cet article sont d'un haut niveau d'abstraction et serviront de banc d'essai « test-bed » pour les autres objectifs de la thèse. Dans l'article, la concentration de vasopressine est calculée à partir de deux relations mathématiques simples : la relation linéaire entre l'osmolalité et la concentration plasmatique de vasopressine et la relation exponentielle entre l'hypovolémie et la concentration plasmatique de vasopressine. Éventuellement, et pour répondre au principe de modélisation modulaire, ces équations mathématiques seront remplacées par un ensemble de simulations qui, une fois combinées, vont pouvoir prédire l'effet des canaux ioniques sur la concentration d'AVP. Afin de calculer la concentration de vasopressine de façon réaliste, plusieurs niveaux de simulation seront nécessaires : simulation de la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques du SON, simulation du couplage stimulus-sécrétion de la vasopressine et simulation de la distribution, de l'excrétion et de la dégradation de la vasopressine. Ces simulations sont le sujet des objectifs et articles subséquents.

Chapitre 3

Simulation des neurones magnocellulaires : article 2

Les sections qui suivent sont une adaptation au format de cette thèse de l'article 2. Cet article est intitulé : « New determinants of firing rates and patterns of vasopressinergic magnocellular neurons : predictions using a mathematical model of osmodetection ». Notez bien que les références et les figures sont numérotées comme dans l'article original. D'ailleurs, une version de l'article dans son format original est incluse en annexe.

3.1 Résumé français

L'arginine vasopressine, l'une des hormones importantes impliquées dans l'homéostasie hydrominérale, est sécrétée par les neurones magnocellulaires vasopressinergiques de l'hypothalamus. Dans cette étude, nous avons implémenté deux paramètres essentiels de la physiologie des MCNs dans une simulation de type Hodgkin-Huxley. Nous avons pu développer un modèle amélioré ayant un plus grand réalisme physiologique en incorporant, dans notre modèle de neurone magnocellulaire, les canaux mécanosensitifs (MSC) responsables de l'osmodétection et les entrées synaptiques dont les fréquences sont modulées par des changements dans l'osmolalité ambiante. De plus, nous avons acquis de nouvelles connaissances au sujet des paramètres déterminant le type de patron des potentiels d'action des neurones magnocellulaires. Nos résultats, basés sur ce modèle de MCN, prédisent : 1) qu'un seul neurone magnocellulaire est capable de présenter tous les types de patrons de potentiels d'action observés expérimentalement : silencieux, irrégulier, phasique et continu ; 2) que, sous des conditions d'hyperosmolalité, la durée

des bouffées de potentiels d'action est régulée par une fatigue de la sécrétion de la dynorphine qui est dépendante de la fréquence ; et 3) que la transition entre des patrons de potentiels d'action est contrôlée par la fréquence des EPSPs et des IPSPs (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 et 128 Hz). De plus, la simulation prédit que les EPSPs et les IPSPs ne modifient pas la fréquence des potentiels d'action pour les neurones qui ont un comportement phasiques (0.0034 Hz/Hz [EPSP] ; 0.0012 Hz/ Hz [IPSP]). Au contraire, ces afférences régulent fortement la fréquence des potentiels d'action des neurones ayant un comportement irrégulier ou continu (0.075 Hz/ Hz [EPSP] ; 0.027 Hz/Hz [IPSP]). L'utilisation du modèle réaliste des MCNs développé dans cette étude, permet d'améliorer notre compréhension des déterminants affectant la fréquence des potentiels d'action ainsi que le comportement des neurones magnocellulaires vasopressinergiques.

3.2 Abstract

Arginine vasopressin (AVP), one of the most important hormones involved in hydromineral homeostasis, is secreted by hypothalamic magnocellular neurons (MCNs). Here, we implemented two critical parameters for MCN physiology into a Hodgkin-Huxley simulation of the MCN. By incorporating the mechanosensitive channel (MSC) responsible for osmodetection and the synaptic inputs whose frequencies are modulated by changes in ambient osmolality into our model, we were able to develop an improved model with increased physiological relevance and gain new insight into the determinants of the firing patterns of AVP magnocellular neurons. Our results with this MCN model predict that 1) a single MCN is able to display all the firing patterns experimentally observed : silent, irregular, phasic and continuous firing patterns ; 2) under conditions of hyperosmolality, burst durations are regulated by the frequency-dependent fatigue of dynorphin secretion ; and 3) the transitions between firing patterns are controlled by EPSP and IPSP frequencies (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz). Moreover, this simulation predicts that EPSPs and IPSPs do not modify the spiking frequency (SF) of phasic firing patterns (0.0034 Hz/Hz [EPSP] ; 0.0012 Hz/ Hz [IPSP]). Rather, these afferents strongly regulate SF during irregular and continuous firing patterns (0.075 Hz/ Hz [EPSP] ; 0.027 Hz/Hz [IPSP]). The use of the realistic MCN model developed here allows for an improved understanding of the determinants driving the firing patterns and spiking frequencies of vasopressinergic magnocellular neurons.

3.3 Introduction

Arginine vasopressin (AVP) is a neuropeptide that plays a critical role in hydromineral homeostasis (HH). This hormone exhibits anti-diuretic effects at the level of the kidney and causes a reduction in urine volume and an increase in urine concentration. The magnocellular neurons (MCNs) of both the supraoptic and the paraventricular nuclei (SON, PVN) synthesize AVP, which is then released into the general circulation at the level of the neurohypophysis and the median eminence. AVP secretion is regulated by the spiking frequency and firing patterns of MCNs (Bicknell 1988). Interestingly, physiological stimuli that trigger AVP secretion, such as increased plasma osmolality or hypovolemia (Dunn et al. 1973) have also been shown to increase the spiking frequency of MCNs and to modify their pattern of spike discharges (Wakerly et al. 1975 ; Brimble and Dyball 1977). Indeed, hyperosmolality depolarizes the MCNs of the SON via the activation of a mechanosensitive channel (MSC) (Oliet and Bourque 1993a) in response to reductions in cell membrane stretching induced by changes in osmotic pressure (Zhang et al. 2007). MCNs also receive both excitatory and inhibitory synaptic inputs, and it has been shown that the frequency of excitatory synaptic currents (EPSCs) increases following the direct application of hyperosmotic artificial cerebrospinal fluid (aCSF) in the vascular organ of the lamina terminalis (Richard and Bourque 1995 ; Trudel and Bourque 2010).

The goal of the present study was to clarify the main determinants of osmolality-induced changes in MCN spiking frequency and firing patterns (Brimble and Dyball 1977 ; Brown et al. 2007 ; Wakerley et al. 1978). We specifically addressed whether these changes resulted solely from the MSC-induced depolarization of the MCN (an intrinsic factor), from a change in the frequency of the afferent synaptic transmission (an extrinsic factor), or from both. To investigate the precise role of these two determinants on MCN electrical activity simultaneously, we took advantage of a computational model of vasopressin MCNs. Computational models of MCNs have been developed previously, and their degree of complexity is directly linked to the scientific question addressed by the designers (Leng et al. 2001 ; Roper et al. 2003, 2004 ; Komendantov et al. 2007). In the present study, a neuronal Hodgkin-Huxley model was utilized because it can take into account the effects of the MSC, afferent synaptic inputs, and the multiple potential firing patterns of MCNs. In order to accommodate these factors and obtain a realistic simulation of the MCN, we deeply modified a Hodgkin-Huxley model that had been developed previously (Roper et al. 2004).

3.4 Methods

The following sections describe in detail the biological basis and the mathematical equations used to model the MSC and the synaptic afferents to the MCNs. All numerical integrations were performed using an explicit Euler algorithm with a time step of 1/240 ms coded in Scilab language. Scilab is an open source equivalent to Matlab. The version of the simulation used in this study was Magno-0.42.

3.4.1 Model of the mechanosensitive channel

The MSC, also called the stretch-inactivated channel (SIC), is a channel whose opening is tightly linked to the mechanical tension of the cellular membrane. Although this channel is present in SON neurons and is the most important intrinsic component involved in osmodetection (Oliet and Bourque 1993a; Bourque 1998), the MSC was not included in Roper's model (Roper et al. 2004). Here, we used the following equation, which was based on a modified form of the Hodgkin-Huxley equation, to model the current flowing through the MSC (I_{MSC}) :

$$I_{MSC}(t) = g_{MSC} \cdot m_{MSC}(t, \Delta Osm) \cdot (V(t) - E_{MSC}([Na^+]_{out})) \quad (3.1)$$

g_{MSC} is the conductance of the channel, m_{MSC} is the activation function, $V(t)$ is the membrane potential and E_{MSC} is the reversal potential of I_{MSC} . Note that this equation differs from the classical form of the Hodgkin-Huxley equation at two levels : 1) the m_{MSC} function includes an osmotic dependence, and 2) E_{MSC} is explicitly dependent on the extracellular Na+ concentration ($[Na^+]_{out}$) to take into account the unusual dependence of E_{MSC} on this cation. Note that E_{MSC} is also related to other cations according to the Goldman-Hodgkin-Katz equation. These two particularities of the current MSC equation are detailed later in the text.

3.4.2 Osmotic dependence of the activation function m_{MSC}

The activation function (m_{MSC}) of the MSC channel was based on experimental data reported in three distinct studies (Zhang et al. 2007; Zhang and Bourque 2003; Oliet and Bourque 1993b). Online Resource 1 describes in detail all of the assumptions

and calculations that led to the equations for computing the activation function of I_{MSC} :

$$\frac{\partial m_{MSC}(t)}{\partial t} = \frac{m_{\infty MSC} - m_{MSC}(t)}{\tau_{mMSC}} \quad (3.2)$$

$$\text{with } m_{\infty MSC} = 1 + 0.0297 \cdot \Delta Osm \text{ and } \tau_{mMSC} = 5000 \quad (3.3)$$

In addition, saturation for the change in osmolality was included in the simulation : $\Delta Osm > -25 \text{ mosmol/L}$. This saturation was based on previous experimental data reporting that no change in the MSC current occurred for CSF osmolalities lower than 270 mosmol/L (Oliet and Bourque 1993b). The time constant (τ_{mMSC}) was approximated using the change in conductance and volume of the MCN as a function of time (Zhang et al. 2007).

3.4.3 Calculation of g_{MSC} and update of g_{Na} and g_K

The Roper's model of the MCN includes a Na+ leak channel and a K+ leak channel, the conductance of which were estimated to be $0.018 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ and $0.066 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively. However, the fact that the Roper model does not account for the MSC results in an overestimation of g_{Na} and an underestimation of g_K . Therefore, the implementation of the MSC in the present model required an update of the initial leak g_{Na} and g_K . Online Resource 2 provides a detailed description of the calculation of $g_{MSC}(0.0235 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2})$, $g_{Na}(0.0169 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2})$ and $g_K(0.0745 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2})$ used in the present model.

3.4.4 Reversal potential of I_{MSC}

It has been shown that the Na+ permeability of the MSC depends on the $[Na+]_{out}$ (Voisin et al. 1999). Therefore, the E_{MSC} should vary as a function of $[Na+]_{out}$. This characteristic of the MSC was included in the present model of the MCN to adequately simulate the capability of the MCN to detect changes in $[Na+]_{out}$. The calculation of E_{MSC} was performed using a typical Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation for two

cations (Na⁺ and K⁺) at 25°C :

$$E_{MSC} = 26.4 \cdot \ln \left(\frac{P_{Na^+}/P_{K^+} \cdot [Na^+]_{out} + [K^+]_{out}}{P_{Na^+}/P_{K^+} \cdot [Na^+]_{in} + [K^+]_{in}} \right) \quad (3.4)$$

However, Fig. 2 of Voisin et al. clearly indicates that E_{MSC} cannot be calculated using a fixed relative permeability of Na⁺ and K⁺ ions (P_{Na^+}/P_{K^+}) due to its dependence on $[Na^+]_{out}$. In light of this, we used the following function :

$$P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.182 + ([Na^+]_{out} - 105) \cdot 0.00213 \quad (3.5)$$

Equation (5) was based on a linear fit of the experimental data reported in Fig. 2(d) of Voisin et al. 1999. In order to minimize error, the simulation was restricted to the range of $[Na^+]_{out}$ reported in Fig. 2(d) (i.e. from 105 mmol/L to 165 mmol/L). Indeed, any change in the behavior of the channel beyond this range is not known (saturation or nonlinearity may occur outside of this range).

3.4.5 Synaptic transmission afferent to the SON

The vascular organ of the lamina terminalis (OVLT), the median preoptic nucleus (MnPO) and the subfornical organ (SFO) have all been shown to respond to changes in osmolality and/or in $[Na^+]_{out}$ (Richard and Bourque 1995; McKinley et al. 2004; Tremblay et al. 2010), and this sensory information is then forwarded to the SON. Indeed, perfusion of hyperosmotic aCSF into the OVLT increases the frequency of excitatory post synaptic potentials (EPSPs) in the SON (Bourque 1998). However, no change in the frequency of inhibitory synaptic potentials (IPSPs) was observed (Richard and Bourque 1995). Alternatively, it has been shown that the MnPO sends IPSPs to the SON. It was thus hypothesized that this inhibitory transmission might be important to linearize the SON response to osmotic change (Richard and Bourque 1995; Leng et al. 2001). Synaptic transmission afferent to the SON might be a critical parameter to shape MCN electrical activity induced by changes in osmolality. This parameter was absent in Roper's model but was implemented in the present model of the MCN.

3.4.6 EPSP and IPSP frequencies used in the MCN model

The frequency of the EPSPs implemented in the present MCN model is 3.53 Hz (mean of 3.43 Hz (Richard and Bourque 1995) and 3.63 Hz (Trudel and Bourque 2003)) under normal CSF osmolality (295 mosmol/L). Because EPSP frequency is dependent on osmolality, a multiplicative factor (M) was introduced in the model :

$$M = 2.39 \cdot 10^{-22} \cdot Osm^{8.79} \quad (3.6)$$

This equation was fitted from the data reported in Fig. 5 (a) of Richard and Bourque 1995. This power law does not represent any specific biological mechanism underlying osmolality-induced changes in EPSP frequency. Rather, it is simply used to minimize the fitting error.

The frequency of IPSPs implemented in the present MCN model is 4 Hz (Richard and Bourque 1995; Li et al. 2007) under normal CSF osmolality (295 mosmol/L). In the present model, the IPSP frequency is fixed and does not depend on changes in osmolality (Richard and Bourque 1995).

3.4.7 EPSP and IPSP amplitude and time constant

Reported amplitudes of synaptic events show a strong heterogeneity among studies (2 to 20 mV) (Inenaga et al. 1997; Li et al. 2007; Shibuya et al. 1998; Wuarin and Dudek 1993; Boehmer et al. 2000; Richard and Bourque 1995). These variations in EPSP amplitude could result from an asynchronous barrage of many small excitatory quanta triggered by electrical stimulation of excitatory fibers (Iremonger and Bains 2007). Each of these quanta displays a small amplitude (0.4 to 9.2 mV, mean 2.1 mV), and the summation of these quanta produced large amplitude EPSPs (2.6 to 18.9 mV, mean 8.4 mV). In our simulation, the mean quantum amplitude observed was 2.1 mV for EPSPs. The same value was used for the IPSPs. In addition, a previous report by Iremonger et al. had observed that the decay of large (summed) EPSPs was slower than the decay of small quanta : 34.9 ms and 17.5 ms, respectively. Therefore, we used 17 ms for the time constant of both EPSPs and IPSPs in our simulation.

3.5 Results

The first part of the present study consists of the validation of our updated MCN model. This validation was essential to test the implementation of the MSC and its ability to detect changes in osmolality and/or Na⁺ concentration. For that purpose, we compared the simulated results obtained from this model with experimental electrophysiological recordings obtained from *in vitro* preparations (Zhang et al. 2007; Voisin et al. 1999). A realistic model of the MCN should be able to simulate the distinct patterns of spike discharges that have been observed in MCNs *in vivo* and *in vitro* (Brimble and Dyball 1977; Brimble et al. 1978; Wakerley et al. 1978; Andrew and Dudek 1984; Armstrong et al. 1994). The correct prediction of MCN spiking behavior in the context of a change in osmolality is required to predict with high confidence the impact of synaptic transmission on osmolality-dependent changes in firing patterns and spiking frequency.

3.5.1 IV Curves of the MCN under hypo- and hyperosmotic CSF

One simple way to validate the implementation of the MSC model is to compare the simulated current-to-voltage relationship (IV curve) with experimental data. Experimental data were recorded from isolated MCNs in the presence of TTX (these unpublished data were kindly provided by Dr. Charles W. Bourque from McGill University, Montreal, QC, Canada; see (Zhang et al. 2007) for detailed experimental protocols). To mimic this experimental procedure, we assumed that each MCN is a sphere with a surface area of $1.9516 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2$ and set the voltage-activated Na⁺ conductance to 0mS/cm^2 . Figure 1 illustrates the simulated IV curve under isosmotic CSF (295 mosmol/L) that was compared with the mean experimental IV curve of the MCN recorded under isosmotic aCSF (n=9). These results indicate that the simulated IV curve under isosmotic conditions was similar to the experimental IV curve (within one standard deviation), thus validating the implementation of the MSC and the updated Na⁺ and K⁺ leak currents employed in the present MCN model. In addition, we also validated the capability of the MSC to detect changes in osmolality by comparing the control IV curve (isosmotic condition) with the IV curve obtained under both hyperosmotic (325 mosmol/l) and hypoosmotic aCSF (265 mosmol/ L; Fig. 1).

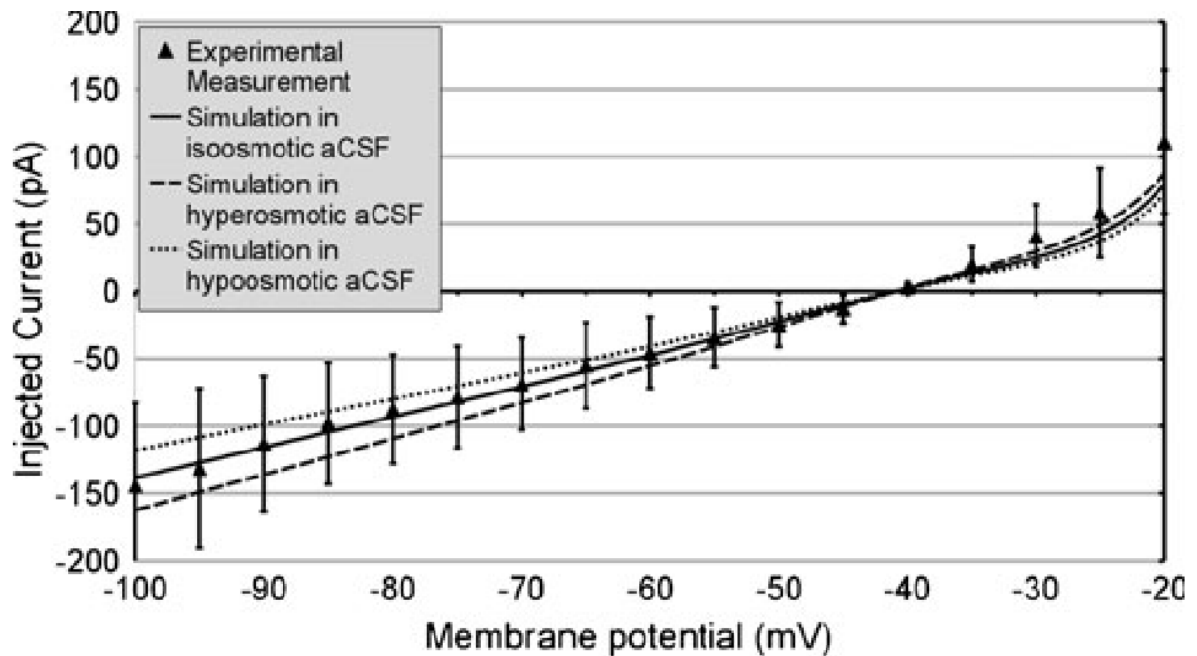


Fig. 1 Comparison of the simulated IV curves with experimental data. IV curves were simulated under control conditions (*black line*), hyposmotic conditions (*dotted line*) and hyperosmotic conditions (*dashed line*). The mean experimental IV curve was obtained in isosmotic conditions (*black triangle*; $n=9$) and was normalized to -41 mV, the reversal potential of the MSC current in this experiment. The error bars display the standard deviation of the experimental data after normalization

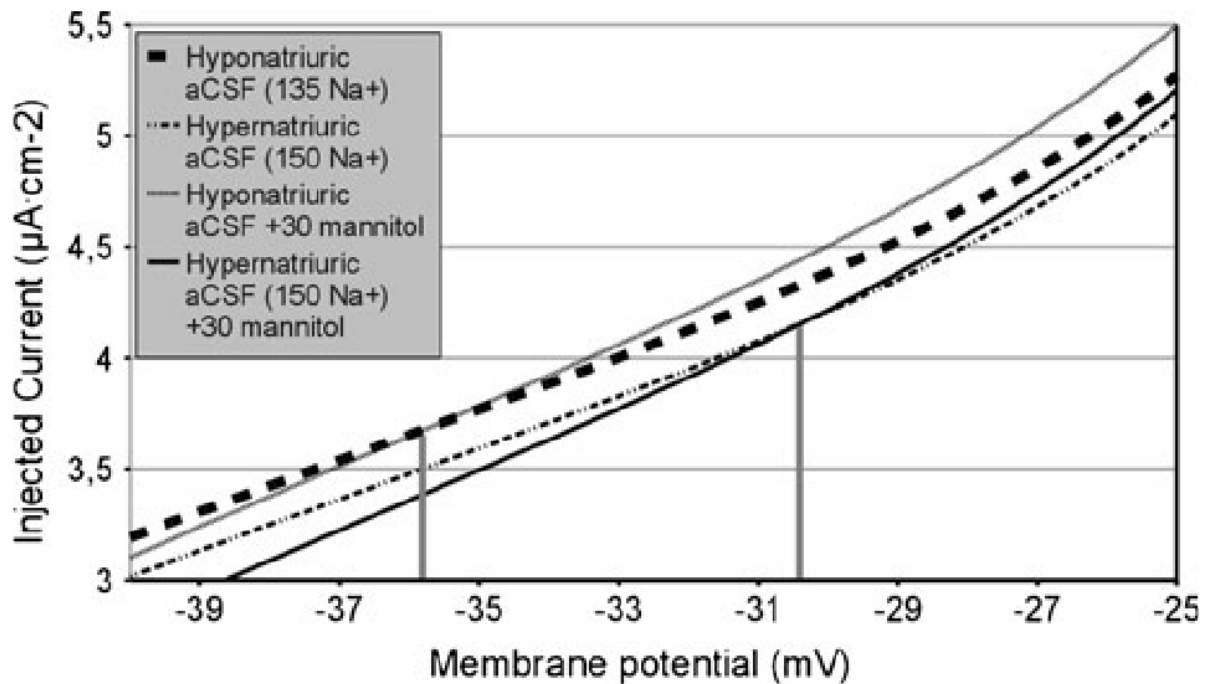


Fig. 2 Validation of the Na⁺ sensitivity of the MSC implemented in the MCN model. The simulated reversal potential of the MSC current estimated in hyponatriuric aCSF (-35.8 mV) and in hypernatriuric aCSF (-30.4 mV) was in agreement with the reversal potential reported in experimental data (-35±3 mV and -30±4 mV, respectively). The *vertical gray bars* indicate the reversal potential (mV)

3.5.2 IV Curves of the MCN under hypo- and hypernatruric CSF

Changes in the extracellular Na⁺ concentration have an impact on the simulated electrical properties of the MCN because they affect the reversal potential of all currents showing Na⁺ permeability. However, only the reversal potential of the MSC current will be significantly altered, as experimental data have demonstrated the high Na⁺ sensitivity of the MSC (see method : reversal potential of IMSC). In order to validate the implementation of the Na⁺ sensitivity of the MSC, we simulated IV curves generated under two distinct CSF $[Na^+]_{out}$ (135 and 150 mmol/L Na⁺) in the presence or absence of mannitol (Fig. 2). These $[Na^+]_{out}$ represent the high and low extremes of physiological fluctuations of the CSF [Na⁺] within the hypo and hypernatruric range, compared to normal aCSF (142 mmol/L of Na⁺). The simulated IV curves indicate that the E_{MSC} shifted from -35.8 mV to -30.4 mV when $[Na^+]_{out}$ was increased from 135 to 150 Na⁺ mmol/L. These simulated values of E_{MSC} were in agreement with the experimental values of E_{MSC} reported previously by Voisin et al. 1999 (Fig. 2(c) -35 ± 3 mV with 135 mmol/L Na⁺ and -30 ± 4 mV with 150 mmol/L). The similarity between the simulated and experimental E_{MSC} validates the effective implementation of MSC Na⁺ sensitivity in the present MCN model. Moreover, we tested the influence of E_{MSC} on the firing activity of MCNs. This was achieved by comparing two specific simulations using either mannitol or NaCl to increase osmolality. These simulations indicated that NaCl has a greater impact on MCN spiking frequency (SF, 598 spikes/100 s vs. 498 spikes/100 s) and firing patterns (phasic vs. continuous) than mannitol (Online Resource 3).

3.5.3 MSC and synaptic impact on osmolality-induced changes in the MCN firing pattern

It has been observed experimentally that changes in osmolality (Brimble and Dyball 1977; Brimble et al. 1978; Wakerley et al. 1978) and/or membrane potential (Andrew and Dudek 1984; Armstrong et al. 1994) can alter the spiking behavior of the MCN. A correct implementation of the intrinsic (the MSC) and extrinsic (afferent synaptic transmission) factors in the MCN model should be able to reproduce these changes in spiking behavior described experimentally (the silent, phasic, irregular and fast continuous firing patterns). Here, we show that the present model of the MCN can simulate the changes in spiking behavior observed experimentally (Fig. 3). For example, a simulated MCN displaying a phasic pattern of bursts (Fig. 3(b1)) makes a qualitative transition

towards a silent firing pattern when exposed to hyposmotic aCSF (-30 mosmol/ L ; Fig. 3(a1)). The same MCN showing phasic spiking behavior (Fig. 3(b1)) makes a transition toward an irregular firing pattern when the membrane potential is increased (Fig. 3(b2)). Similarly, the irregular firing pattern is changed into a continuous firing pattern when osmolality is increased (+30 mosmol/L ; Fig. 3(c2)). Interestingly, all of the simulated changes in spiking behavior can be obtained from a single MCN model by simply changing the osmolality and/or membrane potential and not the internal parameters of the model, such as the conductance of the currents implemented in the initial MCN model of Roper et al. (2004). These simulations thus demonstrate that the combined implementation of the MSC and of the synaptic afferents is appropriate and sufficient to generate the four existing firing patterns in a single MCN.

3.5.4 Prediction of a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal

Experimental recordings have shown that the intraburst frequency and the length of the burst are both increased in response to increased osmolality (Brimble and Dyball 1977 ; Brimble et al. 1978 ; Wakerley et al. 1978). However, the simulation of the osmolality-induced phasic spiking pattern is characterized by a decrease in burst length (Fig. 3(b1), (c1)). In the present model of the MCN, the burst length is solely controlled by the dynorphin signal (see (Roper et al. 2004) ; signal D), which is dependent on the number of spikes. Consequently, an increased spiking frequency during a burst will reduce the length of the burst. The contradiction between the experimental data showing prolonged burst durations under hyperosmotic conditions and the simulated shorter burst duration strongly suggests that the dynorphin signal might be modulated by a yet unknown mechanism. In the present study, we predict that this mechanism might be a fatigue or a failure mechanism associated with dynorphin secretion. Moreover, this fatigue or failure mechanism has to be frequency dependent. Interestingly, it has been demonstrated that the secretion of AVP at MCN terminals is controlled by a frequencydependent fatigue (Hobbach et al. 1988). We therefore implemented a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal, based on Fig. 2 of Hobbach et al. (1988). To do this, we used a decreasing exponential that was adjusted using experimental data (Hobbach et al. 1988) to have a value of 1 at 15 Hz and a value of 0.1 at 30 Hz. The function used was :

$$f = \begin{cases} 1 & \text{if } \nu_{inst} < 15 \\ 1.053 - (1 + \exp(\frac{\nu_{inst}-22.5}{-2.5}))^{-1} & \text{if } \nu_{inst} > 15 \end{cases} \quad (3.7)$$

f is a scaling factor that modulates the increase of the dynorphin signal resulting from the spiking activity of the MCNs. ν_{inst} (Hz) is the instantaneous SF (calculated from the last interspike interval).

Implementation of this fatigue mechanism (Eq. (7)) in the MCN model resolved the observed discrepancy between the simulation and the experimental data. Simulations of MCN spiking activity under hyperosmotic CSF displayed a longer burst duration compared to isosmotic conditions (14, 15 and 19 s burst duration under hyperosmotic conditions vs. 10, 10 and 12 s burst duration under isosmotic conditions; Fig. 4). This simulation validates the presence of a fatigue-dependent mechanism of the dynorphin signal that controls burst duration during osmotic challenges.

3.5.5 Prediction of the impact of the synaptic events on burst generation

In vivo experiments have shown that phasic bursting is not intrinsically regenerative but requires a sustained glutamatergic drive (Brown et al. 2004 21). In contrast, *in vitro* experiments have shown that bursting activity is intrinsically regenerative and does not require any synaptic inputs (Andrew 1987; Hatton 1982). Here we used a computer simulation to shed additional light on the role of glutamatergic synaptic input on burst generation. To do this, we used two 100 s simulations of a MCN displaying a phasic firing pattern with an injected current of either $1.77\mu A/cm^2$ or $2\mu A/cm^2$. This small difference in depolarization (about 2 mV) between the two simulations was not large enough to change either the firing pattern (from phasic to continuous) or the spiking frequency significantly. In the two simulations, the fast excitatory synaptic transmission was stopped after the first 50 s of simulation. In the first simulation (current injection of $1.77\mu A/cm^2$), the bursting activity of the MCN did not continue after the glutamatergic synaptic input was turned off, indicating that this bursting activity was not regenerative (Fig. 5; left panel). In the second simulation (current injection of $2\mu A/cm^2$), the bursting activity was regenerative in the absence of excitatory synaptic input (Fig. 5; right panel). Our results conciliate the discrepancy between the *in vivo* data and *in vitro* data by demonstrating that membrane depolarization can convert a synaptic-dependent phasic firing pattern into an intrinsically regenerative phasic firing pattern.

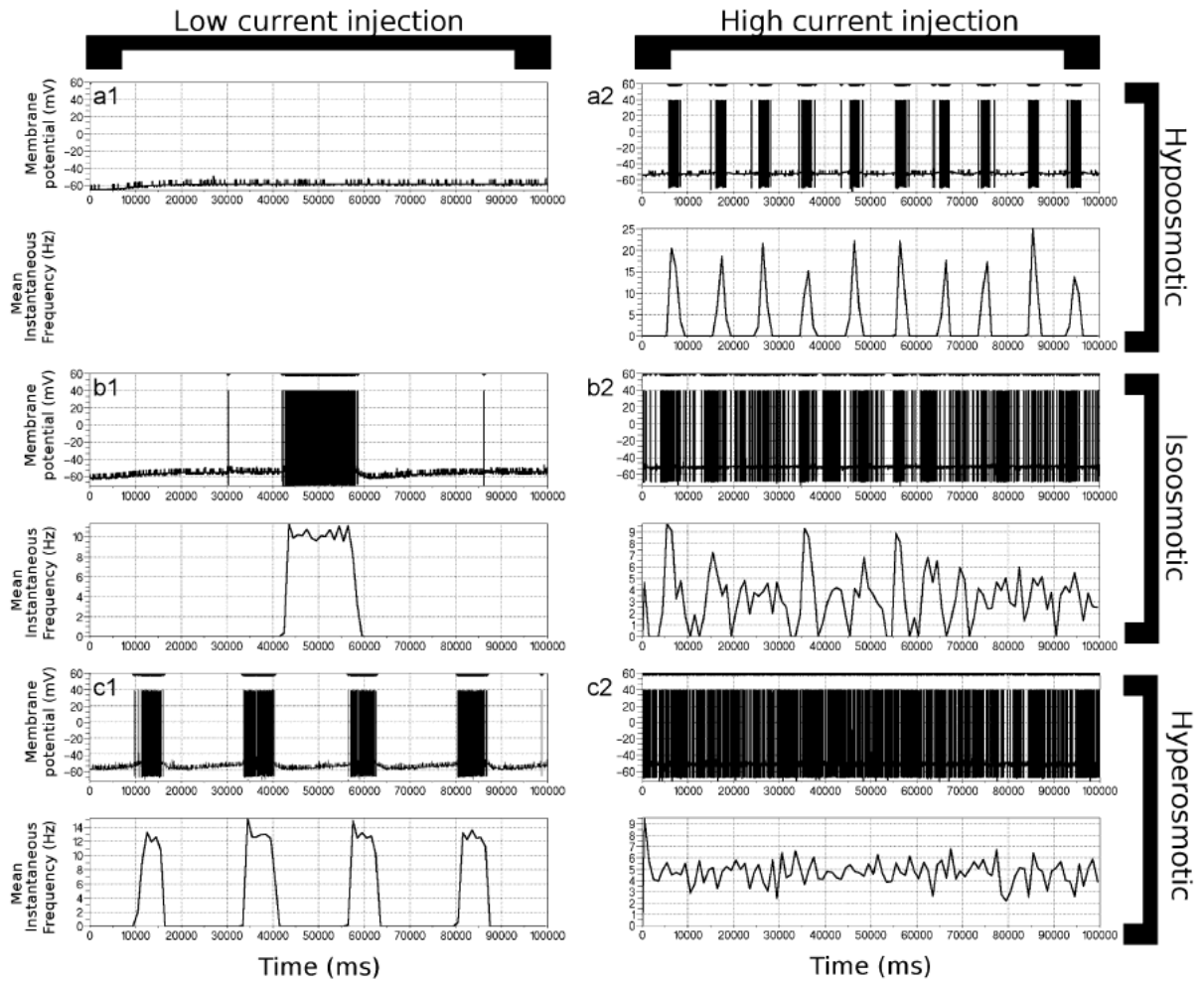


Fig. 3 A single simulated MCN displays qualitative shifts in its firing pattern. The first column illustrates the qualitative transition between different firing patterns induced by a simulated change in osmolality (**a1**: hypoosmotic CSF, -30 mosmol/L; **b1**: isosmotic CSF; **c1**: hyperosmotic CSF, $+30$ mosmol/l). The phasic firing pattern under isosmotic conditions is simulated by a current injection of $1.25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. The second column illustrates the impact of an additional membrane

depolarization ($+1.75 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) superimposed onto the osmolality-induced transitions in firing pattern. The size of the bin for the mean instantaneous frequency is $1,000$ ms. Note that under these modeling conditions, the mean instantaneous spiking frequency is always above 0 Hz in the continuous firing pattern (**c2**). The irregular firing pattern is characterized by a mean instantaneous frequency that is null at many time points of the simulation (**b2**)

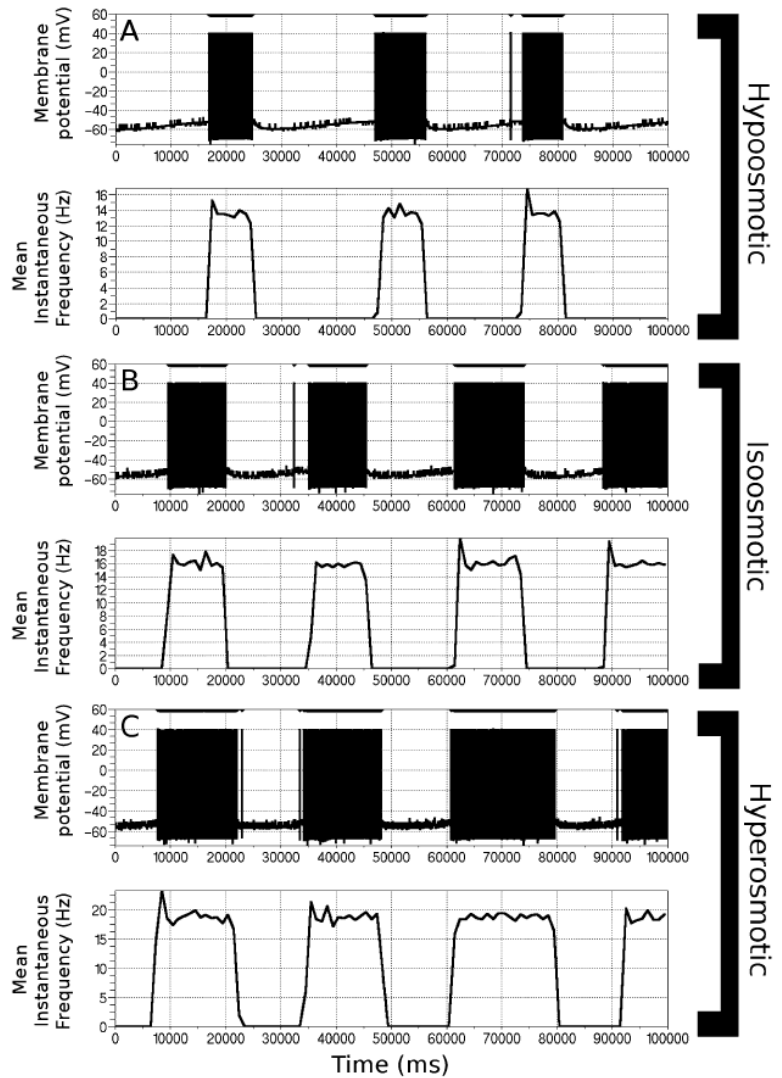
3.5.6 Prediction of the impact of synaptic events on firing rate and spiking behavior

We extended our predictions of the impact of fast synaptic transmission on MCN spiking activity at various membrane potentials : -65, -57, -49 and -41 mV (current injections were set to 0, 1, 2 and 3 $\mu A \cdot cm^{-2}$, respectively). Note that these membrane potential values were obtained when the spikes were blocked in the simulation ($g_{Na} = 0$). The frequency of inhibitory and excitatory synaptic potentials was set to 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz (Fig. 6). The results from this simulation indicate that the effects of the frequency of synaptic events on the spiking activity of the MCN depends on the nature of synaptic transmission (excitatory vs. inhibitory). Indeed, increased EPSP frequency is associated with increased spiking frequency (Fig. 6). This increased spiking frequency triggers the transition between the spiking behaviors observed at a constant membrane potential, such as from silent to irregular and from irregular to phasic (Fig. 6(a), (b)). The transition from phasic to continuous firing observed at depolarized membrane potentials was also shown to be initiated by EPSPs (Fig. 6(c), (d)). In addition, our results indicate that IPSPs can modulate spiking frequency, particularly when MCNs fire in an irregular and continuous manner. However, the impact of IPSPs on spiking frequency is lower than the impact of EPSPs, as demonstrated by comparing the slope of the spiking frequency over the frequency of the IPSPs or EPSPs (ν_{firing}/ν_{IPSP} or ν_{EPSP}). For example, in Fig. 6(d) at coordinate (11.2; 128; 128), the slope of ν_{firing} is three times higher along the EPSP axis (0.078 Hz [SF]/Hz [EPSP]) than along the IPSP axis (0.027 Hz [SF]/Hz [IPSP]). Interestingly, when the MCN displays a phasic firing pattern, both EPSPs and IPSPs have little impact on the spiking frequency. For the EPSPs at coordinate ((14.6; 128; 0); Fig. 6(d)), the slope of ν_{firing} is 0.075 Hz firing/Hz EPSP for a continuous firing MCN. This value is 22 times higher than the slope of ν_{firing} for a MCN firing in the phasic mode (0.0034 Hz firing/Hz EPSP at coordinate (4.32; 128; 0); Fig. 6(a)). Concerning the IPSPs, the ratio between the two slopes of ν_{firing} is 23 (0.027 Hz firing/Hz IPSP at coordinate (14.6; 128; 0); Fig. 6(d) vs. 0.0012 Hz firing/Hz IPSP at coordinate (4.36; 128; 0); Fig. 6(a)).

3.6 Discussion

In the present study, we developed a realistic computational model of the vasopressin MCN by implementing both the osmotically activated mechanosensitive channel (MSC) and the synaptic inputs in a previously reported Hodgkin-Huxley simulation of the MCN (Roper et al. 2004). The implementation and validation of these parameters

Fig. 4 Simulation of the hyperosmolality-induced extension of the burst duration. A simulation of the phasic firing pattern under isosmotic condition was obtained with a current injection of $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (b). Simulations of hyposmotic CSF (-30 mosmol/L) reduced both the spiking frequency and the duration of the burst (a). On the contrary, simulation of hyperosmotic CSF ($+30 \text{ mosmol/L}$) increased spiking frequency and burst duration (c). Note that the simulation of the hyperosmolality-mediated extension of burst duration requires the implementation of a frequency-dependent fatigue mechanism for the dynorphin signal (see text). The size of the bin for the mean instantaneous frequency is 1000 ms



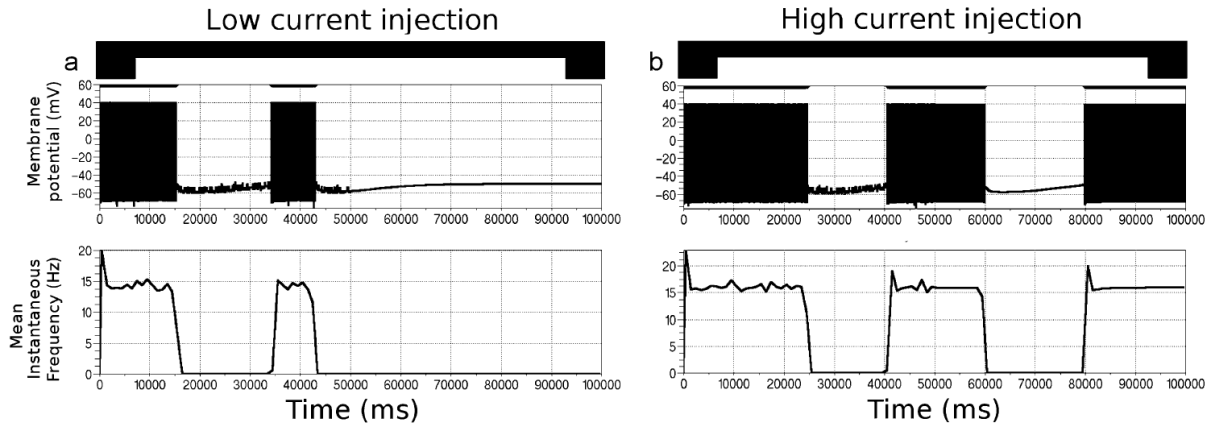


Fig. 5 Synaptic inputs are not sufficient to trigger a regenerative phasic firing pattern. A simulation of the phasic firing pattern can be obtained with a weak current injection ($1.77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Switching off the synaptic inputs after 50 s stops the firing activity of the MCN (a). Additional membrane depolarization (current injection of $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)

produces an intrinsically regenerative firing pattern even when the synaptic inputs are turned off (b). Note that the fluctuation of the mean instantaneous spiking frequency is dependent on both excitatory and inhibitory synaptic inputs. The size of the bin for the mean instantaneous frequency is 1000 ms

allowed us to use this model to provide new insights into the MCN physiology. Indeed, our simulation predicted that a single MCN is able to display qualitative transitions between each of the four distinct types of firing patterns that have been observed experimentally. This prediction is particularly attractive in that it suggests that vasopressin MCNs constitute a homogenous neuronal population in terms of their intrinsic electrical activity-generating properties. Moreover, our simulation of firing activity predicted a frequency-dependent fatigue of dynorphin secretion. This predicted mechanism would be essential to control burst duration during the phasic pattern of spike discharges.

This simulation also predicted the relative influence of EPSPs and IPSPs on the firing pattern and spiking frequency of MCNs. Indeed, our results suggest that the impact of synaptic inputs on transitions between firing patterns and on the spiking frequency within a firing patterns. The model and simulations presented in this study predict that a single MCN is able to fire action potentials in all four of the firing patterns that have been observed in *in vivo* experimental recordings : silent neuron, irregular, phasic and continuous firing neuron (Brimble and Dyball 1977; Brown et al. 1998). Interestingly, the transitions between these firing patterns were not due to fine-tuning the intrinsic parameters implemented in the initial model (Roper et al. 2004) (e.g. the conductance and/or time constant of the currents), but solely to the membrane depolarization. Therefore, our simulations predict that the SON is composed of a homogeneous population of vasopressin MCNs with respect to their intrinsic properties (e.g. the type of ion channels, the channel conductances and the channel time-constants). The diversity of spiking behaviors reported under various experimental conditions, including osmotic perturbations (Wakerley et al. 1978), can likely be attributed to variations in membrane depolarization for individual neurons caused by local and heterogeneous ionic concentration, hormone concentration and/or weight of synaptic afferences. In our si-

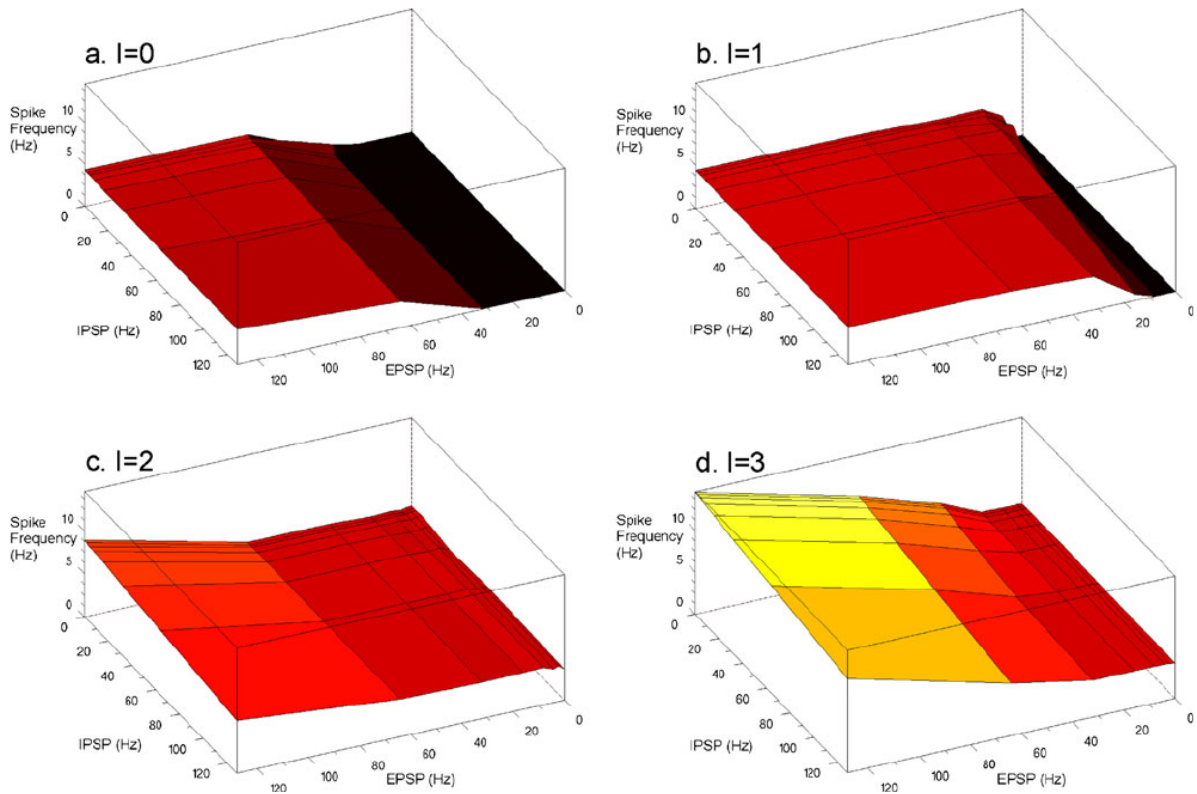


Fig. 6 Synaptic inputs affect the spiking frequency of the MCN. This 3D graph simulates the impact of both the EPSP frequency (X axis) and IPSP frequency (Y axis) on the spiking frequency of the MCN (Z axis). The intersection of two lines along the X and Y axis represents the simulated mean spiking frequency resulting from three tests lasting 110 s each. Note that the resolution of EPSPs and IPSPs is higher in the low frequency range than in the high frequency range, and this is illustrated in the 3D graph by a higher number of lines in the low frequency range of both types of synaptic events. The color code indicates the simulated firing patterns of the MCN: silent MCN (*black area*), irregular firing pattern

representing the transition between the silent and the phasic firing pattern (*dark red area*), phasic firing pattern (*plateau, red area*) and continuous firing pattern (*bright red inclined plane* in (c) and yellow inclined plane in (d)). These firing patterns are generated by a current injection of $0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (a), $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (b), $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (c) and $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (d). Both EPSP and IPSP frequency have a high impact on the transition between the firing patterns, but a variable impact on the spiking frequency. Indeed, the EPSP and IPSP frequency affects the spiking frequency during irregular or continuous firing, but not in the phasic firing pattern

mulations, depolarization of MCNs was triggered either by a change in the environment of the MCN like hyperosmolality (implementation of the MSC), or by injecting current to simulate the depolarizing effects of neuropeptides, such as angiotensin 2 (AngII) (Z. Li and Ferguson 1996). The transition between the silent state and phasic firing was triggered by hyperosmolality alone, whereas the transition between the phasic and the continuous firing patterns required an additional current injection (depolarization). These simulations suggest that several depolarizing agents are simultaneously required to obtain a continuous fast-spiking pattern. In support of this, *in vitro* recordings have shown that the combination of AngII and hyperosmolality produces a larger depolarization than hyperosmolality alone (Chakfe and Bourque 2000; Zhang and Bourque 2008). The distribution frequency of synaptic afferents might also be one of the depolarizing agents. Our simulation in which the EPSP frequency was increased mostly predicted the transition from one spiking pattern to another (see below).

3.6.1 Insight from the simulation : dynorphin release is controlled by a frequency-dependent fatigue mechanism

One key feature of the MCN model developed by Roper and colleagues (Roper et al. 2004) was the implementation of the dynorphin-mediated control of burst duration that characterizes the MCN phasic firing pattern. The model of the dynorphin's mode of action was based on a spikemediated increment of the dynorphin signal that activates a K⁺ leak conductance. Activation of this conductance led to membrane hyperpolarization, which resulted in the termination of spiking activity. This mechanism was validated experimentally (Brown and Bourque 2004). However, the results presented here demonstrate that the Roper model of dynorphin signaling is of limited physiological relevance. Simulations of hyperosmotic conditions using the Roper model predict that an MSC-mediated membrane depolarization would result in increased intraburst frequency and dynorphin release, which would lead to shortened burst durations. This prediction is in stark contrast with experimental data reporting an extension of the burst duration under hyperosmotic conditions (Brimble and Dyball 1977; Wakerley et al. 1978). Our simulation predicted that a frequency-dependent fatigue mechanism of dynorphin release was essential to correctly model the hyperosmolality-induced increase in burst duration. Here, we developed a mathematical model of this fatigue mechanism in order to simulate the extension of the burst duration caused by hyperosmolality. This model of dynorphin secretion fatigue was adapted from the mechanism underlying the frequency-dependent fatigue of vasopressin secretion reported at MCN terminals (Hobbach et al. 1988). Experimental data showing that dynorphin and dynorphin receptors are stored together in the same vesicles as vasopressin in both the soma and

the dendrites of MCNs (Shuster et al. 1999) validate the assumption that a mechanism of frequency-dependent downregulation of vasopressin secretion could be adapted to dynorphin secretion. This model predicted reduced dynorphin secretion per spike and, consequently, increased burst duration. Because this predicted mechanism has not yet been validated experimentally, we also tested alternative assumptions to simulate the extension of burst duration. The hyperosmolality-induced burst extension could also potentially be attributed to additional membrane depolarization or to an increased frequency of synaptic events. Simulations of either of these conditions also predicted increased intraburst spiking frequency, which in turn would lead to increased dynorphin secretion, thereby triggering an early end of the burst.

3.6.2 Insight from the simulation : impact of synaptic inputs on both the MCN firing rate and firing pattern

Our MCN model and associated simulations allowed us to separately test the impact of EPSPs, IPSPs and membrane potential on the spiking frequency and firing pattern of MCNs. For these simulations, we used EPSP and IPSP frequencies of 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz. This range was wider than the physiological range of synaptic inputs that have been reported to impinge on the MCNs (Bourque and Renaud 1991). This assumption was used because of the paucity of *in vivo* synaptic data increases the possibility of underestimating the synaptic event frequency occurring under particular conditions, such as changes in osmolality. Our results predicted that the transition from one firing pattern to another was dependent on the synaptic event frequency and current injection (membrane depolarization). Moreover, our simulations indicated that an increase or a decrease in IPSP or EPSP frequency could either have no effect or have a dramatic effect on the MCN firing rate, depending on the initial set of parameters characterizing the MCN (membrane potential, IPSP and EPSP frequency). Indeed, our predictions suggest that the spiking frequency within a characteristic burst of the phasic firing pattern was not dependent on the synaptic event frequency. However, the interspike interval in MCNs displaying a phasic pattern was affected by the frequency of the synaptic events (Online Resource 4). In contrast, the EPSP and/or the IPSP frequency controlled the spiking frequency in MCNs displaying irregular or fast-continuous firing patterns. In addition, our simulation predicted that synaptic events are required to trigger regenerative bursting activity, as shown in *in vivo* experimental recordings (Brown et al. 2004). However, our simulation also predicted that a stronger depolarization of the MCN could trigger regenerative phasic activity that was independent of synaptic inputs. This prediction is in agreement with *in vitro* experimental data (Andrew 1987). In the *in vitro* experiments, the additional depolarization predicted to trigger the re-

generative spiking activity might come from the experimental conditions, such as the high ion concentration and/or the presence of glucose in the artificial CSF.

3.7 Acknowledgement

This project was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) MOP-178002. LN received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, ESD3-334440-2006).

We would like to thank Myriam Rioux (University of Ottawa, Canada) and Francis Gagnon-Moisan (PTB, Braunschweig, Germany) for valuable suggestions and comments on the study. We also thank Dr. Charles Bourque (McGill University, Montreal, Canada) for his kind gift of experimental data and for his permission to include these data in the present study. Finally, we would to thank Dr. Peter Roper (The University of Utah, U.S.A.) for sharing his source code and for the useful answers to our questions.

3.8 References

- Andrew, R. D. (1987). Endogenous bursting by rat supraoptic neuroendocrine cells is calcium dependent. *Journal de Physiologie*, 384, 451-465.
- Andrew, R. D., & Dudek, F. E. (1984). Analysis of intracellularly recorded phasic bursting by mammalian neuroendocrine cells. *Journal of Neurophysiology*, 51, 552-566.
- Armstrong, W. E., Smith, B. N., & Tian, M. (1994). Electrophysiological characteristics of immunohistochemically identified rat oxytocin and vasopressin neurones in vitro. *Journal de Physiologie*, 475, 115- 128.
- Bicknell, R. J. (1988). Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *The Journal of Experimental Biology*, 139, 51-65.
- Boehmer, G., Greffrath, W., Martin, E., & Hermann, S. (2000). Subthreshold oscillation of the membrane potential in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus. *Journal de Physiologie*, 526, 115-128.
- Bourque, C. W. (1998). Osmoregulation of vasopressin neurons : a synergy of intrinsic and synaptic processes. *Progress in Brain Research*, 119, 59-76.
- Bourque, C. W., & Renaud, L. P. (1991). Membrane properties of rat magnocellular neuroendocrine cells in vivo. *Brain Research*, 540, 349-352.

- Brimble, M. J., & Dyball, R. E. (1977). Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *Journal de Physiologie*, 271, 253-271.
- Brimble, M. J., Dyball, R. E., & Forsling, M. L. (1978). Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Journal de Physiologie*, 278, 69-78.
- Brown, C. H., & Bourque, C. W. (2004). Autocrine feedback inhibition of plateau potentials terminates phasic bursts in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *Journal de Physiologie*, 557, 949-960.
- Brown, C. H., Ludwig, M., & Leng, G. (1998). kappa-opioid regulation of neuronal activity in the rat supraoptic nucleus in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 18, 9480-9488.
- Brown, C. H., Bull, P. M., & Bourque, C. W. (2004). Phasic bursts in rat magnocellular neurosecretory cells are not intrinsically regenerative in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, 19, 2977-2983.
- Brown, C. H., Scott, V., Ludwig, M., Leng, G., & Bourque, C. W. (2007). Somatodendritic dynorphin release : orchestrating activity patterns of vasopressin neurons. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1236-1242.
- Chakfe, Y., & Bourque, C. W. (2000). Excitatory peptides and osmotic pressure modulate mechanosensitive cation channels in concert. *Nature Neuroscience*, 3, 572-579.
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 52, 3212- 3219.
- Hatton, G. I. (1982). Phasic bursting activity of rat paraventricular neurones in the absence of synaptic transmission. *Journal of Physiology*, 327, 273-284.
- Hobbach, H. P., Hurth, S., Jost, D., & Racke, K. (1988). Effects of tetraethylammonium ions on frequency-dependent vasopressin release from the rat neurohypophysis. *Journal de Physiologie*, 397, 539-554.
- Inenaga, K., Cui, L. N., Nagatomo, T., Honda, E., Ueta, Y., & Yamashita, H. (1997). Osmotic modulation in glutamatergic excitatory synaptic inputs to neurons in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus in vitro. *Journal of Neuroendocrinology*, 9, 63-68.
- Iremonger, K. J., & Bains, J. S. (2007). Integration of asynchronously released quanta prolongs the postsynaptic spike window. *The Journal of Neuroscience*, 27, 6684-6691.
- Komendantov, A. O., Trayanova, N. A., & Tasker, J. G. (2007). Somato-dendritic mechanisms underlying the electrophysiological properties of hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells : a multicompartmental model study. *Journal of Computational Neuroscience*, 23, 143-168.

- Leng, G., Brown, C. H., Bull, P. M., Brown, D., Scullion, S., Currie, J., et al. (2001). Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input : an experimental and theoretical analysis. *The Journal of Neuroscience*, 21, 6967-6977
- Li, Z., & Ferguson, A. V. (1996). Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices : modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience*, 71, 133-145.
- Li, C., Tripathi, P. K., & Armstrong, W. E. (2007). Differences in spike train variability in rat vasopressin and oxytocin neurons and their relationship to synaptic activity. *Journal de Physiologie*, 581, 221-240.
- McKinley, M. J., Mathai, M. L., McAllen, R. M., McClear, R. C., Miselis, R. R., Pennington, G. L., et al. (2004). Vasopressin secretion : osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *Journal of Neuroendocrinology*, 16, 340-347.
- Oliet, S. H., & Bourque, C. W. (1993a). Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*, 364, 341-343.
- Oliet, S. H., & Bourque, C.W. (1993b). Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *The American Journal of Physiology*, 265, R1475-R1479.
- Richard, D., & Bourque, C. W. (1995). Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *Journal de Physiologie*, 489, 567-577.
- Roper, P., Callaway, J., Shevchenko, T., Teruyama, R., & Armstrong, W. (2003). AHP's, HAP's and DAP's : how potassium currents regulate the excitability of rat supraoptic neurones. *Journal of Computational Neuroscience*, 15, 367-389.
- Roper, P., Callaway, J., & Armstrong, W. (2004). Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus : a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study. *The Journal of Neuroscience*, 24, 4818-4831.
- Shibuya, I., Kabashima, N., Tanaka, K., Setiadji, V. S., Noguchi, J., Harayama, N., et al. (1998). Patch-clamp analysis of the mechanism of PACAP-induced excitation in rat supraoptic neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 10, 759-768.
- Shuster, S. J., Riedl, M., Li, X., Vulchanova, L., & Elde, R. (1999). Stimulus-dependent translocation of kappa opioid receptors to the plasma membrane. *The Journal of Neuroscience*, 19, 2658- 2664.
- Tremblay, C., Berret, E., Henry, M., Nehme, B., Nadeau, L., & Mougnot, D. (2010). A neuronal sodium leak channel is responsible for the detection of sodium in the rat median preoptic nucleus. *Journal of Neurophysiology*. doi :10.1152/jn.00417.2010.

- Trudel, E., & Bourque, C. W. (2003). A rat brain slice preserving synaptic connections between neurons of the suprachiasmatic nucleus, organum vasculosum lamina terminalis and supraoptic nucleus. *Journal of Neuroscience Methods*, 128, 67-77.
- Trudel, E., & Bourque, C. W. (2010). Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep. *Nature Neuroscience*, 13, 467-474.
- Voisin, D. L., Chakfe, Y., & Bourque, C. W. (1999). Coincident detection of CSF Na⁺ and osmotic pressure in osmoregulatory neurons of the supraoptic nucleus. *Neuron*, 24, 453-460.
- Wakerley, J. B., Poulain, D. A., & Brown, D. (1978). Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Research*, 148, 425-440.
- Wakerly, J. B., Poulain, D. A., Dyball, R. E., & Cross, B. A. (1975). Activity of phasic neurosecretory cells during haemorrhage. *Nature*, 258, 82-84.
- Wuarin, J. P., & Dudek, F. E. (1993). Patch-clamp analysis of spontaneous synaptic currents in supraoptic neuroendocrine cells of the rat hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 13, 2323- 2331.
- Zhang, Z., & Bourque, C. W. (2003). Osmometry in osmosensory neurons. *Nature Neuroscience*, 6, 1021-1022.

3.9 Fichiers additionnels du deuxième article

Cet article est accompagné de quatre fichiers additionnels qui ont été joints en annexe à cette thèse à la suite de l'article 2 dans son format original. Voici la description du contenu de ces quatre fichiers :

3.9.1 Fichier additionnel 1

Ce fichier présente deux méthodes distinctes (directe et indirecte) afin d'estimer l'activation de la conductance du courant mechanosensitif en fonction de la concentration osmotique ambiante. Il s'avère que les deux méthodes sont approximativement équivalentes si on tient compte de l'erreur expérimentale dans les valeurs utilisées.

3.9.2 Fichier additionnel 2

Ce fichier présente le calcul de la conductance du courant mécanosensitif. Comme cette conductance était implicitement incluse dans la conductance du courant de fuite sodique et potassique du modèle de Roper [74], il a aussi fallu recalculer leur valeur pour enlever la contribution du nouveau courant mécanosensitif.

3.9.3 Fichier additionnel 3

Ce fichier compare le comportement d'un neurone phasique près de la transition phasique/continu pendant l'application de 15 mmol/L de NaCl ou l'application équivalente de 30 mmol/L de sucre (mannitol). Il est démontré que le sel a plus d'effet que le sucre sur les MCNs simulés.

3.9.4 Fichier additionnel 4

Ce fichier présente la dépendance des histogrammes d'intervalles inter-potentiel (ISI) d'action à la fréquence des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices. Il est conclu que, en se basant seulement sur les ISI et sur les critères de Sabatier 2004 [79], le modèle utilisé dans cet article a une signature d'ISI hybride entre un neurone purement *in vitro* et un neurone purement *in vivo*. De plus, il est montré qu'en augmentant légèrement la fréquence des entrées synaptiques, la signature ISI de nos simulations devient identique à celle des neurones *in vivo* de Sabatier 2004.

3.10 Informations supplémentaires au sujet des travaux effectués

3.10.1 Code Scilab

Comme pour le premier article, les simulations ont été faites avec le logiciel Scilab, mais cette fois, sans l'extension visuelle Scicos. Les programmes utilisés pour les simulations des neurones magnocellulaires sont Magno-0.42.sce et ses variantes (ex : Magno-0.42block.sce pour la figure 5 de l'article 2). Les premières versions du code de

ce programme étaient commentées, structurées et faciles à comprendre. Cependant, des modifications majeures ont dû être faites et maintenant, le code du programme est plus difficile à comprendre. En effet, après avoir fait des tests comparatifs avec le modèle programmé par Roper, qui lui est implémenté avec le logiciel XPP, il a été conclu que notre programme était beaucoup trop lent par rapport au sien et que notre code devait être accéléré. La version courante du code est plus complexe à comprendre dû aux multiples optimisations qui ont été faites pour prendre avantage des opérateurs matriciels de Scilab. Ces opérateurs sont implémentés en langage C ou Fortran et sont exécutés plus rapidement que des boucles normales. De plus, comme Scilab interprète les lignes de commentaires pendant l'exécution, toutes les lignes de commentaires situées dans les boucles principales causent des pertes de temps, elles ont donc été effacées. Même si les commentaires en entête de fonction ont été étoffés pour compenser cette perte d'information, le code reste plus difficile à lire et à comprendre que précédemment à cause de ces limitations de Scilab. Des alternatives à l'utilisation de Scilab pour modéliser des neurones sont présentés dans la discussion générale [5.3.2](#).

3.10.2 Erreurs numériques

Le programme utilisé pour l'article intègre numériquement en utilisant la méthode de Runge-Kutta d'ordre 4 (RK4) pour les variables à dynamique rapide (V,m et h) et la méthode d'Euler pour les variables ayant une dynamique lente (dynorphine et calcium). Le pas d'intégration utilisé est de 1/40 de ms. Ces choix avaient été faits en même temps que l'optimisation du code. Initialement les variables lentes étaient aussi intégrées avec RK4 mais finalement c'est avec la méthode d'Euler qu'elles ont été simulées dans cette étude. Bien que ce choix cause une dilatation de l'axe du temps (de 4 ms sur 1000 ms), l'accélération de l'exécution du programme était significative. Le pas avait été choisi comme étant 4 fois plus petit que le pas maximal (celui pour lequel l'intégration divergeait ; 1/10 ms) et une analyse de la stabilité des résultats avec des pas plus grands avait aussi été faite pour s'assurer de nos choix. Par contre, après cet article, une analyse de l'ordre réel de la méthode d'intégration a permis de se rendre compte que la méthode RK4 utilisée, bien que théoriquement d'ordre 4 quand le pas tend vers 0, se comportait comme une méthode d'ordre 1 avec le pas choisi. Pour atteindre l'ordre 4, des pas environ 250 fois plus petit devaient être utilisés. Cependant, la réduction des pas entraînait une augmentation du temps de simulation de 30 min à 5 jours. Un compromis a donc été fait pour accélérer le programme et une nouvelle méthode d'intégration ainsi qu'un nouveau pas ont été choisis. En fixant le seuil de tolérance acceptable à un potentiel d'action d'erreur par 100 sec (0.1 Hz) et en utilisant la méthode d'Euler (puisque une méthode d'ordre supérieur n'est pas utile et est plus lente avec les pas utilisés), la nouvelle taille pour les pas qui a été choisie est de 1/240

ms. Dans l'objectif 3, les simulations de neurones magnocellulaires utilisent toutes ce nouveau paramètre et intègrent toutes leurs variables en utilisant la méthode d'Euler.

3.10.2.1 Équation « stiff »

Le système d'équations différentielles qui doit être résolu pour simuler les neurones magnocellulaires est difficilement intégrable, car il s'agit d'équations « stiff ». Une équation stiff a la propriété d'être instable numériquement, d'amplifier les erreurs numériques et d'amplifier les erreurs d'intégration. Normalement, il n'est pas possible d'intégrer correctement une équation stiff à moins d'avoir des pas d'intégration très petits ou une méthode d'intégration dite stable. Or nous avons vu à la sous-section précédente (section 3.10.2), qu'il est seulement question de deux méthodes d'intégration : Euler et Runge-Kutta 4 et que ces deux méthodes sont instables. Bien qu'il soit possible de stabiliser ces méthodes en les utilisant sous leur forme implicite et en calculant un certain nombre d'itérations de convergence pour résoudre les équations implicites à chaque pas, la forme implicite est très coûteuse numériquement (c'est à dire en temps nécessaire à l'intégration des équations). Les équations des neurones magnocellulaires présentées ici sont particulièrement coûteuses car elles contiennent des fonctions qui prennent beaucoup de temps à calculer numériquement (ex : \tanh et \exp) et qu'il y a beaucoup de variables interdépendantes à résoudre à chaque itération (23 variables dynamiques ; V , 9 composantes de m , 9 composantes de h , 3 composantes de Ca et D). C'est pour la même raison que des méthodes stables, comme la méthode trapézoïde par exemple (voir équation 3.8), n'ont pas été utilisées. Ces méthodes ont des composantes implicites (terme de droite de l'équation 3.8) qui demandent de résoudre une fonction à $t+1$, mais cette fonction est dépendante de variables qui sont elles aussi à résoudre. Il faut donc faire des itérations à l'intérieur de chaque pas pour faire converger la solution. Dans notre cas, il n'est pas avantageux d'utiliser ce genre de méthode car ces itérations sont pratiquement aussi coûteuses numériquement qu'un pas complet, car la majorité du temps de calcul d'un pas se situe dans le calcul des variables nécessaires pour le calcul de V , m et h . La solution que nous avons alors choisie avec nos équations stiff a été d'utiliser une taille de pas inférieure (voir section 3.10.2) avec une méthode moins précise mais plus rapide. Cette solution nous apparaît comme le meilleur compromis dans le domaine de pas utilisé ici.

$$y_{n+1} = y_n + \frac{h}{2} (f(t_n, y_n) + f(t_{n+1}, y_{n+1})). \quad (3.8)$$

3.11 Liens avec les objectifs

Le travail présenté dans cet article constitue l'ensemble des tâches nécessaires pour atteindre l'objectif 2. De plus, la simulation présentée dans cet article sera utilisée comme unité de base pour le prochain objectif puisque dans le troisième article de cette thèse, plusieurs de ces neurones simulés seront combinés dans le but de simuler la population complète des neurones vasopressinergiques du SON. La simulation présentée ici a été créée à partir d'une simulation existante des neurones vasopressinergiques du SON [74] mais a dû être modifiée et validée pour pouvoir atteindre nos objectifs. En effet, nous avons dû ajouter au modèle de Roper la capacité de détection de la concentration osmotique. Nous lui avons aussi ajouté des entrées synaptiques, qui, elles aussi, sont sensibles à l'osmolalité du milieu. Ces modifications sont nécessaires pour que la simulation de la population de neurones créée à l'objectif 3 puisse ajuster la sécrétion de vasopressine en fonction de l'osmolalité. Quand l'augmentation d'osmolalité est causée par du sodium au lieu d'être causée par du sucre, la modulation de la sécrétion de vasopressine est plus importante. C'est pour cette raison que les propriétés de détection de sodium du canal mécanosensitif ont été incluses dans le modèle. En effet, le potentiel d'inversion de ce courant a une forte dépendance à la concentration de sodium extracellulaire, ce qui résulte en un plus grand courant en présence de sodium. En plus de l'osmolalité et du sodium, des conditions hypovolémiques (dues à une déshydratation ou à une hémorragie) font aussi augmenter la sécrétion de vasopressine. Par contre, à moyen terme, le lien hypovolémie-AVP ne pourra pas être intégré dans ces simulations, car les connaissances à ce sujet ne sont pas assez étoffées. Certains mécanismes de la relation hypovolémie-AVP sont connus : par exemple les neurones du SFO peuvent répondre à l'ANGII (un signal d'hypovolémie) et les neurones du SFO projettent des axones vers le SON [80, 81]. Ainsi, ce noyau est probablement impliqué dans la régulation volémique médiée par le SON et l'AVP. Par contre, il y a plusieurs étapes à franchir pour que ces mécanismes affectent la sécrétion de vasopressine et les détails de cette cascade sont inconnus pour l'instant. Puisque cette propriété est nécessaire pour avoir une simulation réaliste, elle devra être incluse éventuellement dans la population neuronale de l'objectif 3. Il faudra donc trouver une façon d'inclure ce mécanisme dans l'unité de base neuronale présentée dans cet article. Il sera possible de l'inclure par une nouvelle propriété intrinsèque (canal supplémentaire ou modulation d'un canal) ou extrinsèque (modulation des entrées synaptiques). Comme les mécanismes reliant une diminution du volume avec une augmentation de la sécrétion de vasopressine ne sont pas connus, il sera probablement plus réaliste de moduler la sécrétion de vasopressine des neurones par une équation mathématique tirée d'expériences et d'en rester à une implémentation de type « black-box », comme dans l'article 1, plutôt que de spéculer sur le mécanisme causant cet effet.

Chapitre 4

Population de MCNs simulée et dynamique de la [AVP] : article 3

Les sections qui suivent sont une adaptation au format de cette thèse de l'article 3. Cet article est intitulé : « Quantitative prediction of vasopressin secretion using a computational population model of rat magnocellular neurons ». Notez bien que les références et les figures sont numérotées comme dans l'article original. D'ailleurs, une version de l'article dans son format original est incluse en annexe.

4.1 Résumé français

Le but de cette étude était de créer une simulation quantitative et réaliste de la sécrétion de vasopressine (AVP) dans des conditions iso-osmotiques et pendant des défis osmotiques de courte durée. La relation entre la concentration d'AVP ([AVP]) et l'osmolalité du plasma a été calculée en utilisant un modèle intégré et sophistiqué simulant séquentiellement : (1) la fréquence globale des potentiels d'action de la population des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus, (2) la propagation des potentiels d'actions dans les axones, (3) les mécanismes de fatigue et de facilitation du relâchement de la vasopressine au niveau des terminaisons axonales et (4) la pharmacodynamique de la [AVP]. La simulation a prédit que la sensibilité différentielle des MCNs à la dynorphine est le mécanisme le plus important expliquant les variabilités individuelles des comportements des MCNs (silencieux, décharges irrégulières, phasiques et continues de potentiels d'action). Par contre, au niveau de la population des MCNs, la simulation a prédit que la sensibilité à la dynorphine doit être combinée avec la distribution

des potentiels de membrane au repos des MCNs afin d'obtenir une moyenne globale réaliste de la fréquence des décharges de potentiels d'action en réponse à un changement d'osmolalité (hyperosmolalité). De plus, en prenant avantage du modèle intégré, la simulation a prédit que la soustraction sélective du mécanisme de facilitation de la sécrétion d'AVP dépendante de la fréquence de décharge des potentiels d'action a un impact important sur la relation osmolalité-[AVP] (moyenne absolue du changement de 2.59 pg/ml). En revanche, la soustraction sélective du mécanisme d'échec de la propagation des potentiels d'action a un impact quantitatif moindre sur la [AVP] (0.58 pg/ml). Le modèle intégré présenté ici améliore nos connaissances sur les mécanismes sous-jacents aux comportements des MCNs ainsi que sur les mécanismes du couplage stimulus-sécrétion de l'AVP.

4.2 Abstract

The goal of the study was to create a realistic and quantitative simulation of vasopressin (AVP) secretion under iso-osmotic and short-term challenged plasma osmolality. The relationship between AVP concentration ([AVP]) and plasma osmolality was computed using a sophisticated and integrated model that chronologically simulates (1) the overall firing rate of the hypothalamus magnocellular neuronal (MCN) population, (2) the propagation of the spike activity down the axons, (3) the fatigue and facilitation mechanisms of AVP release at the axon terminals and (4) the [AVP] pharmacodynamics based on the trains of AVP release. This global simulation predicted that the differential MCN sensitivity to dynorphin is the most critical mechanism underlying the individual variability of MCN firing behaviors (silence, irregular, phasic and continuous firing patterns). However, at the level of the MCN population, the simulation predicted that the dynorphin factor must be combined with the distribution of the resting membrane potentials among the MCNs to obtain a realistic overall firing rate in response to a change in osmolality. Moreover, taking advantage of the integrated model, the simulation predicted that the selective removal of the frequency-dependent facilitation of AVP secretion has a major impact on the overall [AVP]-to-osmolality relationship (mean absolute change of 2.59 pg/ml), whereas the action potential propagation failure, despite being critical, has a smaller quantitative impact on the overall [AVP] (0.58 pg/ml). The present integrated model (from a single MCN to a quantitative plasma [AVP]) improves our knowledge of the mechanisms underlying overall MCN firing and AVP excitation-secretion coupling.

4.3 Introduction

Arginine vasopressin (AVP) is one of the most important hormones of hydromineral homeostasis in mammals. This hormone has a potent anti-diuretic action at the level of the kidney that causes a reduction in urine volume and an increase in urine Na⁺ concentration. AVP is secreted into the general blood circulatory system at the neural lobe of the pituitary gland and in the median eminence where the axonal terminals of the magnocellular neurons (MCNs) of the supraoptic nucleus (SON) and the paraventricular nucleus (PVN) are respectively located. This secretion is regulated by the action potential frequency of the MCNs, as well as by the specific firing pattern of these neuroendocrine cells (Bicknell 1988). Indeed, AVP secretion and the firing rate of vasopressinergic MCNs are increased by the same physiological stimulus : an increase in plasma osmotic concentration, or plasma sodium concentration, as well as by the fluid loss in the extracellular fluid compartment (Dunn et al. 1973 ; Brimble and Dyball 1977 ; Wakerley et al. 1975). Despite the fact that firing of individual MCNs is correlated with AVP secretion, several steps are engaged from early osmodetection to final quantitative plasmatic AVP concentration. Among these steps, the firing determinants of the whole population of MCNs have to be considered, as well as the mechanisms underlying the stimulus-secretion coupling. In the present study, we created a population model of MCNs and simulated plasmatic AVP concentration dynamics to globally understand the functioning of these distinct elements. Such a global simulation will be used to predict realistic plasma AVP concentrations under various osmotic conditions (hyper and hypoosmolality).

To create such a global simulation, several intermediate steps (simulations) are required to model each element involved in the global release of AVP. The first step used a model of the rat vasopressinergic MCN (Roper et al. 2004) that was recently updated with osmodetection capabilities (Nadeau and Mouginot 2011). In the present study, this simulation of a single MCN was revisited (fine-tuned) to obtain a heterogeneous population of MCNs capable of exhibiting the four types of neuronal behavior that have been observed experimentally, i.e. silent neurons and neurons showing phasic, irregular and continuous firing patterns (Brown et al. 1998). This simulation will thus, model the firing activity of the whole MCN population under iso-osmotic plasma condition, as well as during osmotic challenges. The second step used a model of the stimulus-secretion coupling that was required to produce the global simulation of plasma AVP release. This step constituted a major challenge because this process converts the output (trains of spikes) of the four MCN simulations (step 1) into trains of AVP release. The complex cellular mechanisms involved in AVP stimulus-secretion coupling have been studied under various conditions, thus leading to a fragmented view of this critical regulator of AVP secretion. Indeed, various phenomena have been reported during the past 30

years. These phenomena include the activity-dependent facilitation and the time-dependent fatigue of AVP release within the terminals, as well as the activity-dependent fatigue (conduction failure), the activity-dependent delay and the activity-dependent spike broadening along the MCN axons (Cazalis et al. 1985; Nordmann and Stuenkel 1986; Bondy et al. 1987; Bicknell 1988; Hobbach et al. 1988; Bielefeldt and Jackson 1993). Therefore, one way to increase our knowledge on that particular topic is to model and simulate AVP secretion and to analyze the quantitative impact of each component of the stimulus-secretion coupling model on the integrated system. Finally, the third step consisted in a simulation of the pharmacodynamics of AVP that was created to translate the trains of AVP release into a quantitative concentration of plasmatic AVP. This global simulation of plasma AVP was then, validated by comparing our results with experimental data.

4.4 Methods

The following sections describe in detail the biological basis, the assumptions and the mathematical equations used in the three steps described above to simulate the dynamics of the plasma concentration of AVP. All of the simulations created in the present study were implemented in the Scilab scientific language (version 5.2.2). The version of the simulation used in this study is MagnoSec-1.0.

4.4.1 Quantitative method to categorize the MCN firing pattern

The SON is characterized by the heterogeneous population of MCNs in terms of electrical behaviors. Indeed, MCNs display four distinct types of behaviors that have been observed experimentally, i.e., silent neurons ($\pm 26\%$ of the MCN population) and neurons showing phasic ($\pm 26\%$), irregular ($\pm 13\%$) and continuous ($\pm 34\%$) firing patterns (Brown et al. 1998). To simulate a physiological electrical activity (firing rate and pattern) of the whole MCN population, we integrated each individual firing behavior into the simulation. Additionally, the distribution of these firing behaviors should reflect the percentage of each firing behavior observed experimentally. Therefore, the four types of behaviors have to be quantitatively defined. Here, we used the quantitative criteria defined by Poulain et al. (1988) to precisely categorize the simulated firing behavior. These authors identified two critical parameters to categorize the firing behavior : the mean firing rate (mofr) and the variance-to-mean ratio ($V/mofr$; in 1 sec bin). On the

basis of these parameters, four domains of firing behavior were defined :

1. Irregular firing behavior : $mofr < 1.5Hz$ and $V/mofr > 1$.
2. Fast continuous firing behavior : $mofr > 3Hz$ and $V/mofr < 1.5$.
3. Phasic firing behavior : $mofr > 3Hz$ and $V/mofr > 2$.
4. Silent behavior : $mofr \pm 0$.

All of the combinations of $mofr$ and $V/mofr$ outside of these domains are considered to be transitional states. In addition, we demonstrated that simulations of 200 sec are sufficient to correctly classify the firing pattern of the MCNs (see Online Resource 1).

4.4.2 Implementation of the stimulus-secretion coupling in the MCNs

Simulating the stimulus-secretion coupling at the level of a single MCN consisted of the translation of the firing pattern into a quantitative secretion of AVP. In the present model of MCN, this translation includes three distinct steps :

1. The propagation of spike trains from the soma to the axon terminals located in the neurohypophysis and median eminence.
2. The facilitation mechanism of AVP release located in the axon terminals.
3. The computation of AVP release triggered by a single spike.

The implementation of each step is described in the next subsections.

4.4.2.1 1) Implementation of the spike train propagation

Spikes propagating along the MCN axons have been shown to undergo various modifications like reduction in amplitude, increase in width, as well as propagation failure (Bielefeldt and Jackson 1993 ; Jackson et al. 1991). In this study, we will model and simulate only the spike propagation because spike failure has an impact on the number of spikes reaching the secretory terminals and, thus, on AVP secretion. The mechanisms of both the spike amplitude reduction and spike width increase are not explicitly modeled because we assumed that these mechanisms are implicitly included in the model of the facilitation and fatigue “black-box” function (see next section). The spike propagation failure has been shown to depend on the frequency of the spikes travelling along the axon (Bielefeldt and Jackson 1993). Here, we assumed that propagation failure is modeled as a function of the instantaneous spike frequency (inverse of the last interspike

interval). The probability of spike propagation failure used in the simulation is :

$$P(\nu) = 3.2 \cdot \nu - 32 \quad (4.1)$$

where P ($0 < P < 100$) is the probability of failure and ν ($10 < \nu < 41$) is the instantaneous frequency. This equation corresponds to the regression line fitted from experimental data (Figure 1 in Bielefeldt and Jackson 1993).

4.4.2.2 2) Implementation of the facilitation mechanism of AVP release

It has been shown that the amount of AVP released from an isolated pituitary gland is dependent on the frequency of the electrical stimulation (Bicknell 1988; Bondy et al. 1987; Cazalis et al. 1985). In the present study, we used the experimental data published by Bicknell (1988) to model the facilitation of AVP secretion occurring at the axon terminals. Indeed, these experimental data were sampled from 8 experiments in which the electrical stimulation of the neurohypophysis consisted of four bursts of 156 spikes at different frequencies (6.5, 13, 26 and 52 Hz) applied in a duplicated latin square. We assumed that this methodology was appropriate to include the combined effects of the frequency-dependent facilitation, the frequency-dependent fatigue and the time-dependent fatigue.

The relationship between AVP secretion and spike frequency (Figure 1 in Bicknell, 1988) was rescaled to adjust the mean release of AVP per spike at 3 Hz to the mean basal level of AVP released per spike (see next section). To compute the facilitation (F), we created a linear interpolation between the experimental data points :

$$F(\nu) = \begin{pmatrix} 0.039\nu & 0 \leq \nu \leq 6.5 \\ 2.2 + (\nu - 6.5) \cdot 0.6 & 6.5 < \nu \leq 13 \\ 6.1 + (\nu - 13) \cdot -0.0231 & 13 < \nu \leq 26 \\ 5.8 + (\nu - 26) \cdot -0.0538 & \nu > 26 \end{pmatrix} \quad (4.2)$$

F is the facilitation multiplicative factor and ν is the instantaneous frequency.

4.4.2.3 3) Computation of the mean AVP release per spike

Several estimates of the mean release of AVP per spike (mAVP/spike) have been reported in the literature (see Table 1), and the estimated mAVP/spike spans a wide range. However, we assumed that $1.3 \cdot 10^{-5} pg$ was the appropriate value for the mAVP/spike because this specific value was reported twice and represents an intermediate value in the experimental data; this assumption was validated in the results. Note that the extreme values of mAVP/spike were also tested in the simulation to investigate their impact on the global simulation (see results).

4.4.3 Implementation of the AVP concentration dynamics simulation

In the present model, the computation of the dynamics of the AVP concentration ([AVP]) requires the combination of the two simulations described above (MCN populations and stimulus-secretion coupling). Such a combination is achieved via a series of chronological steps defined below :

1. The simulation of the MCN population calculates the spike trains for each type of firing behavior of the MCNs (silent neurons, irregular, phasic and continuous firing pattern).
2. The simulation of the spike propagation failure using eq. 1 randomly removes spikes within each train of action potentials.
3. The simulation of the facilitation mechanism, spike propagation failure (P(n)) and the mAVP/spike are used to translate spike trains into AVP secretion trains for each firing behavior. Spike train is defined by : $\sum_{s=0}^{s=N} \delta(t - t_s)$, where N is the number of spikes in the train, t_s the time of the s^{th} spike and δ is the Dirac delta function. AVP secretion train is defined by :

$$\Delta AVP(t) = \sum_{s=0}^{s=n} \delta(t - t_s) \cdot F(\nu_s) \cdot P(\nu_s) \cdot mAVP/spike \quad (4.3)$$

where ν_s is the instantaneous frequency of spikes.

4. The four types of AVP secretion trains are scaled according to the distribution of the four firing behaviors observed experimentally (9000 AVP neurons distributed into silent neurons [$\approx 26\%$ of the MCN population] and neurons showing phasic [$\approx 26\%$], irregular [$\approx 13\%$] and continuous [$\approx 34\%$] firing patterns) (Brown et al. 1998), so that the calculated AVP secretion represents the overall AVP release by

the whole MCN population.

$$\Delta AVP_{Pop}(t) = 9000 \cdot (0.26 \cdot \Delta AVP_{Silent}(t) + 0.26 \cdot \Delta AVP_{Phasic}(t)) \quad (4.4)$$

$$+ 0.13 \cdot \Delta AVP_{Irregular}(t) + 0.34 \cdot \Delta AVP_{Continuous}(t)) \quad (4.5)$$

$$= 2300 \cdot \Delta AVP_{Silent}(t) + 2300 \cdot \Delta AVP_{Phasic}(t) \quad (4.6)$$

$$+ 1200 \cdot \Delta AVP_{Irregular}(t) + 3100 \cdot \Delta AVP_{Continuous}(t)) \quad (4.7)$$

Note that the numbers were rounded to two significant digits.

5. The four types of AVP secretion trains are concatenated and sorted in a single train that combines the AVP secretion of all of the neurons.
6. The [AVP] dynamics (see equation below) is simulated using the half-life of circulating AVP, the distribution volume of AVP, as well as the combined train of AVP secretion. In our model, the half-life of circulating AVP and the distribution volume of AVP are set to 2 min and 60 ml respectively, on the basis of existing estimates of these two parameters (Leng and Ludwig 2008).

$$\frac{\partial AVP(t)}{\partial t} = -t \cdot AVP(t) + \Delta AVP_{Pop} \quad (4.8)$$

where τ is the decay constant. The relationship between the decay constant and the half-life of circulating AVP is defined by :

$$\tau = \frac{t_{1/2}}{-\ln(0.5)} \quad (4.9)$$

Implementing appropriate units and a distribution volume of AVP of 60 ml in equation 7 led to :

$$\frac{\partial AVP(t)}{\partial t} = \frac{60000 \cdot t_{1/2} \cdot AVP(t)}{\ln(0.5)} + \Delta AVP(t)_{Pop} \quad (4.10)$$

The choice of a constant distribution volume of AVP is an approximation. In reality, there are volume changes associated with osmotic perturbations and with normal daily fluctuations in the body fluid volume (Nadeau et al. 2010). The effect of varying the distribution volume of AVP on plasma [AVP] was tested in the online resource 2. The simulations indicated that the effect of varying the distribution volume on [AVP] was negligible (≈ 0.5 pg/ml), even for large volume changes ($\approx 12\%$). In addition, validation of the half-life value of circulating AVP used in the model (2 min.) is presented in the online resource 3. This file presents an analysis of the sensitivity of [AVP] as a function of the implemented value of the half-life of AVP. Note that 2 min is in agreement with physiological value of basal [AVP] in the plasma.

7. (Optional step) When the mean steady-state [AVP] is required (see figure 4), this value is obtained by averaging the last quarter of the [AVP] time-series to smooth out small variations caused by the small number of MCN simulations used.

4.5 Results

4.5.1 Predicted mechanisms underlying the firing behavior of individual MCNs

To faithfully simulate the concentration of AVP that is released at the neurohypophysis under iso-osmotic conditions and during an osmotic challenge, an accurate simulation of the spike trains generated by the vasopressinergic MCN population must first be simulated. Indeed, the specific firing patterns (phasic, irregular or continuous) of individual MCNs, as well as the spike frequency, are critical to the [AVP] dynamics. However, the mechanism underlying the firing behaviors is not well understood and it might result from the interaction between several distinct determinants. Here, we compared the action of four distinct determinants that might affect both the firing pattern and the spike frequency of a single MCN to determine the primary mechanism that has to be implemented in the population model of the vasopressinergic MCNs. The putative determinants identified from existing models of single MCN are the membrane potential (current injection, Nadeau and Mougnot 2011), the secretion of dynorphin (ΔD signal, Roper et al., 2004), as well as the amplitude and frequency of the afferent postsynaptic potentials (PSPs, Nadeau and Mougnot 2011). To evaluate the impact of each determinant with accuracy, we modified the approach described in our previous MCN model by using the quantitative method proposed by Poulain et al. (1988). We therefore, analyzed the evolution of $mofr$ and $V/mofr$ while varying the weight of each determinant to define the domain of all of the firing behaviors in a single MCN (see Methods).

4.5.1.1 Impact of the amplitude and frequency of the postsynaptic potentials

The amplitude of the PSPs can be ruled out easily because varying the amplitude of the PSPs did not enable the simulated MCN to exhibit the phasic firing pattern (Figure 1A). Similarly, the frequency of the PSPs was also rejected because the frequency re-

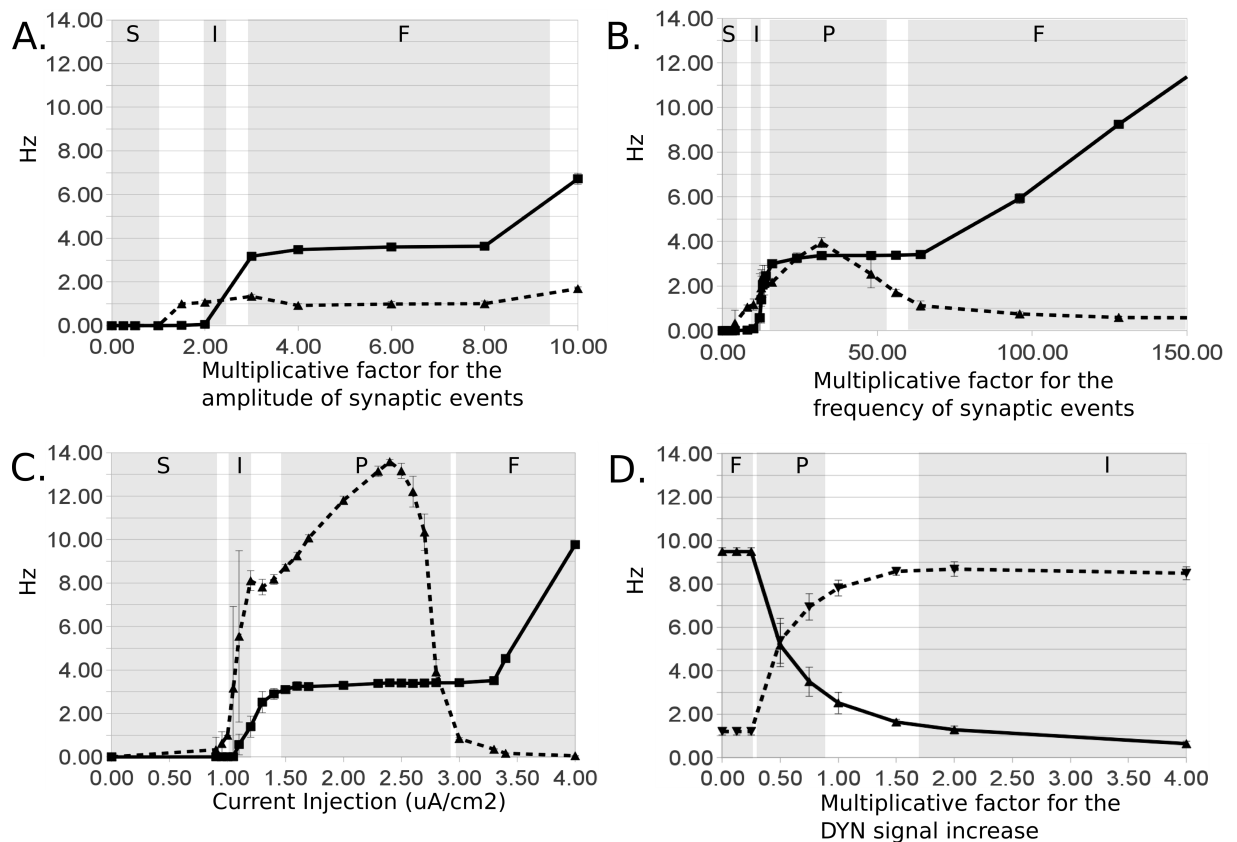


FIGURE 4.1 – Putative factors underlying the transition between one to the other firing behavior in individual MCN. The two curves illustrated in the four panels represent the mean of firing rate (mofr; continuous black line) and the variance to mean ratio ($V/mofr$; dotted black line). Those two parameters are sufficient to quantitatively determine the firing behavior of individual MCN according to Poulain et al. (1988; see method) and the grey zones define the distinct firing behaviors : silence (S), irregular (I), phasic (P) and fast continuous (F) firing. The white zones indicate the transitional states. The evolution of the firing behavior is studied by varying only one parameter at a time : the synaptic amplitude factor (a multiplicative factor for the amplitude of the synaptic events; Panel A), the synaptic frequency factor (a multiplicative factor for the frequency of synaptic events, $1 = 3.53$ Hz, Panel B), the injection of current (i.e. the membrane depolarization; Panel C) and the dynorphin (DYN) secretion factor (a multiplicative factor for the increased DYN signal D per spike; see Roper (2004); Panel D). Each symbol represents the average of 3 simulations of 200 sec. Error bars are standard deviation.

quired to obtain a continuous firing pattern was unrealistic. As illustrated in Figure 1B, the continuous firing domain starts at a multiplicative factor of 64, which corresponds to an input frequency of 225.9 Hz. Such a high PSP frequency was not reported *in vivo* (Bourque et al., 1991).

4.5.1.2 Impact of the current injection (membrane potential)

Varying the current injection in MCN simulations appears sufficient to trigger the transition between the four firing behaviors that were experimentally observed (Figure 1C). The impact of current injection simulating the effects of membrane depolarization was recently demonstrated in a computational model of the MCN (Nadeau and Mougnot 2011). However, here, we used a quantitative measurement (mofr and V/mofr) to precisely determine the domains that correspond to a specific firing behavior. Our simulations indicated that a single MCN is silent when current injection is lower than $0.9\mu A/cm^2$ ($\approx -64.2mV$). The same MCN displayed irregular firing for current injection ranging from 1 to $1.2\mu A/cm^2$ (≈ -63.6 and $-62.4mV$), phasic firing for current injection ranging from 1.5 to $2.9\mu A/cm^2$ (≈ -60.7 and $-52.5mV$) and continuous firing for current injection higher than $3\mu A/cm^2$ ($\approx -51.9mV$).

4.5.1.3 Impact of the dynorphin secretion

At a first glance, the dynorphin secretion factor (ΔD) was not considered as a primary mechanism involved in shaping the firing pattern of the MCN because the simulation lacks the domain characterizing a silent MCN (Figure 1D). However, dynorphin secretion is closely associated with action potential firing and thus, the simulation used a slight current injection ($1.7\mu A/cm^2$) to simulate membrane depolarization and to induce action potential firing. If the initial current injection was removed, the simulated MCN turned into a silent neuron. The dynorphin secretion factor must therefore be considered as a putative mechanism in generating the irregular, phasic and continuous firing pattern of a single MCN under iso-osmotic conditions.

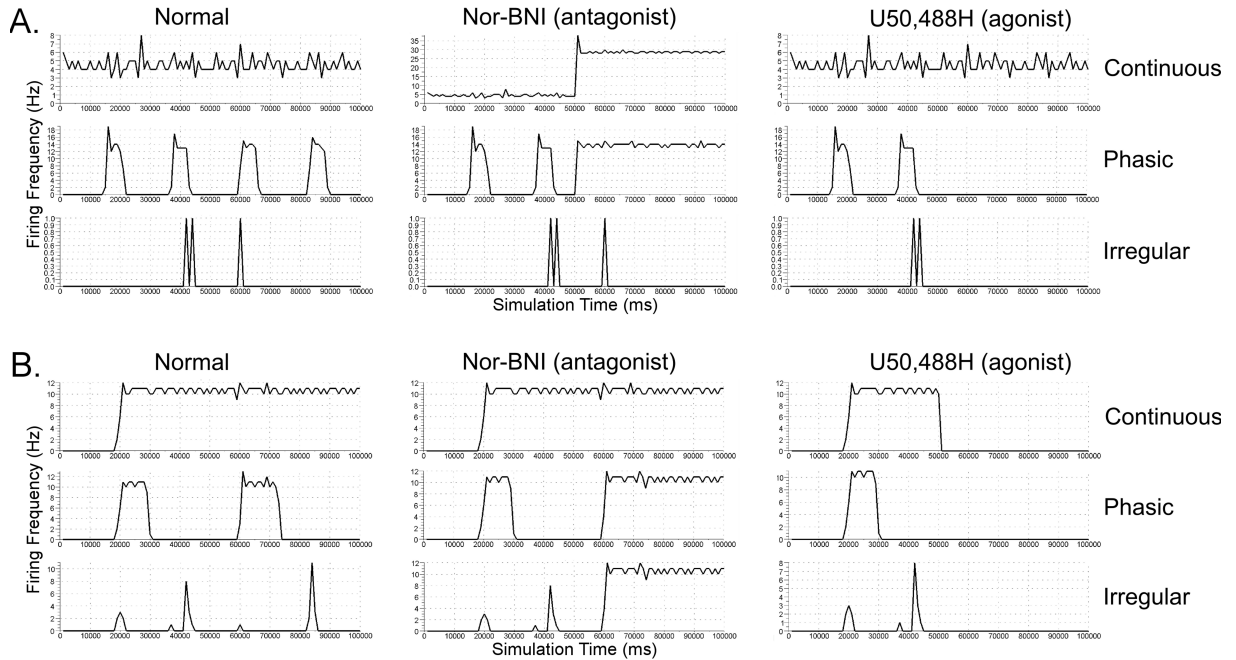


FIGURE 4.2 – Simulations of the impact of kappa-opioid receptor agonist and antagonist on the MCN firing frequency. All the traces illustrate the impact of the pharmacological simulation on the instantaneous firing frequency of the same MCN using a 1 sec bin. (A) the firing patterns (continuous, phasic and irregular spike discharge) was implemented using current injection (depolarisation of 3.4, 1.7 and 1.1 $\mu A/cm^2$, respectively). (B) the firing patterns were implemented using distinct DYN secretion factors (0.25, 0.75 and 4, respectively). In the last 50 sec of the simulation (last half), control (left column), Nor- BNI application (κ -opioid receptor antagonist ; middle column) and U50,488H application (kappa-opioid receptor agonist ; right column) were simulated. Note that only the maximum effect of the drugs was simulated to improve the contrast between control and drug application (at $t = 50$ sec, 100% of the of the drug effect was illustrated).

4.5.2 Simulating the actions of the κ -opioid receptor agonist and antagonist unravels the determinant of the MCN firing behavior

The previous simulations predicted that membrane depolarization (current injection) and dynorphin secretion (ΔD) represented two acceptable determinants in generating the heterogeneous firing behavior experimentally observed in the MCNs. Further simulations were carried out to investigate which mechanism might be critical, and these simulations were based on experimental data reporting the effects of agonist and antagonist of the kappa-opioid receptor (κ -OR) on the firing pattern of the MCNs (Scott et al. 2009). The implementation of the κ -OR antagonist (Nor-BNI) action was achieved by forcing the dynorphin signal (D ; see (Roper et al. 2004)) to be 0. As for the κ -OR agonist (U50,488H), the dynorphin signal was increased to a maximum value of 1000. In addition, the time course of the effects mediated by the κ -OR agonist and antagonist was accelerated in the simulation in order to clearly observe the effects of the two drugs on MCN electrical activity. Accordingly, simulation of the agonist and antagonist application starts at $t = 50$ sec and until $t = 100$ sec (end of simulation), and the effects are instantaneously maximal, instead of being delayed as observed experimentally. When considering the current injection as a primary mechanism underlying the firing pattern (Figure 2A), the κ -OR agonist and the κ -OR antagonist generate an erroneous mean instantaneous spiking frequency (3 out of 9), relative to the experimental data (Scott et al. 2009). Indeed, simulated application of Nor-BNI predicted an increased firing frequency ($> 30Hz$) over the physiological range in MCN displaying a continuous firing pattern and predicted no effect in MCN displaying irregular firing pattern (Figure 2A). By contrast, *in vivo* results demonstrated that Nor-BNI does not impact the continuous firing pattern and increases the firing frequency of MCN firing under phasic and irregular mode (Scott et al. 2009). Simulated application of U50,488H predicted that the continuous firing pattern did not change ($\approx 4.5Hz$), whereas *in vivo* firing frequency was reduced or stopped (Scott et al. 2009).

When considering the dynorphin secretion as a primary mechanism underlying the firing pattern (Figure 2B), the simulation of either the κ -OR agonist or antagonist application was well in agreement with the experimental data.

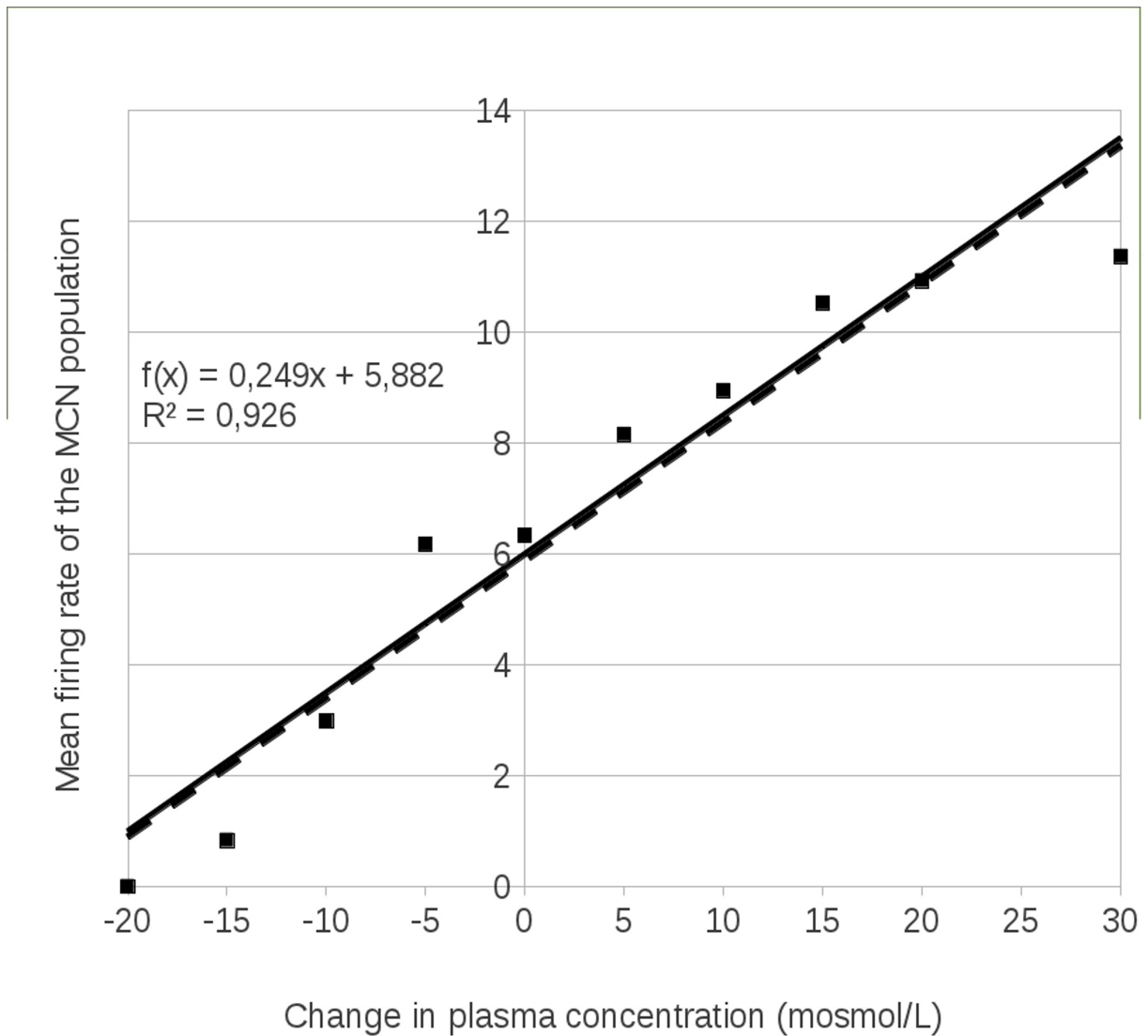


FIGURE 4.3 – Simulated and experimental mean firing rate of the MCN population during osmotic challenges. Black squares represent the simulated mean firing rate of the overall MCN population and dotted line illustrate a linear regression fit of the data (0.249 Hz/mosmol/l; equation on the figure). The slope of this fit is identical to the slope obtained from the experimental data (continuous line; Bourque 1998). Note that the experimental relationship was translated by +10 mosmol/l to facilitate slope comparison.

4.5.3 Validation of the MCN population using osmotic challenges

The dynorphin (DYN) secretion mechanism has been selected to generate all of the firing behaviors observed in the MCN population. Accordingly, it was essential to validate the simulation of the whole MCN population by comparing predictions with experimental data. This comparison was achieved by simulating the relationship between the mean firing frequency of the MCN population and a change in osmolality. The first series of simulations predicted a step-function instead of a linear increase in the mean firing frequency as a function of the osmotic concentration. The step appearing around 0 mosmol/L was likely caused by the synchronization of the osmotic threshold triggering action potential firing in every simulated MCN.

Interestingly, experimental data reported a wide range of resting membrane potentials in the MCN population (range $\approx -50mV$ to $\approx -90mV$; $SE : 0.8mV$; Mason 1983). In the second series of simulation, current injection of $\pm 0.2\mu A/cm^2$ was added to the dynorphin secretion factor for each type of MCN constituting the population to increase physiological realism. Note that a current injection of $\pm 0.2\mu A/cm^2$ is equivalent to a change in the membrane potential of $\approx 1mV$ (Mason 1983). A detailed analysis of the impact of varying the current injection amplitude is presented in the online resource 4. This analysis validates $\pm 0.2\mu A/cm^2$ as a correct assumption. Implementation of the MCN population, thus, changed from four neuronal behaviors (silent neurons, phasic, irregular and continuous firing neurons) to nine behaviors detailed as follows. Hyperpolarized ($1\mu A/cm^2$), normal ($1.2\mu A/cm^2$) and depolarized ($1.4\mu A/cm^2$) resting membrane potential were added to each type of firing behavior (phasic, irregular and continuous firing). As illustrated in Figure 3, implementing a variable resting membrane potential across the MCN population moved the firing frequency-to-osmotic concentration relationship from a step-function to a realistic linear aspect.

The simulation was then compared with the experimental data presented in figure 1 of Bourque (1998), which combined data from three independent *in vivo* studies (Walters and Hatton 1974; Brimble and Dyball 1977, Wakerley et al. 1978), thereby bolstering the validation of the simulation. Figure 3 clearly shows that the slope of the simulated relationship (mean firing frequency to osmotic concentration) was identical to the experimental slope (0.25 Hz/mosmol/L). Note that the superposition of the simulated and experimental slope required a translation of 10 mosmol/l at the origin between the two relationships (see discussion).

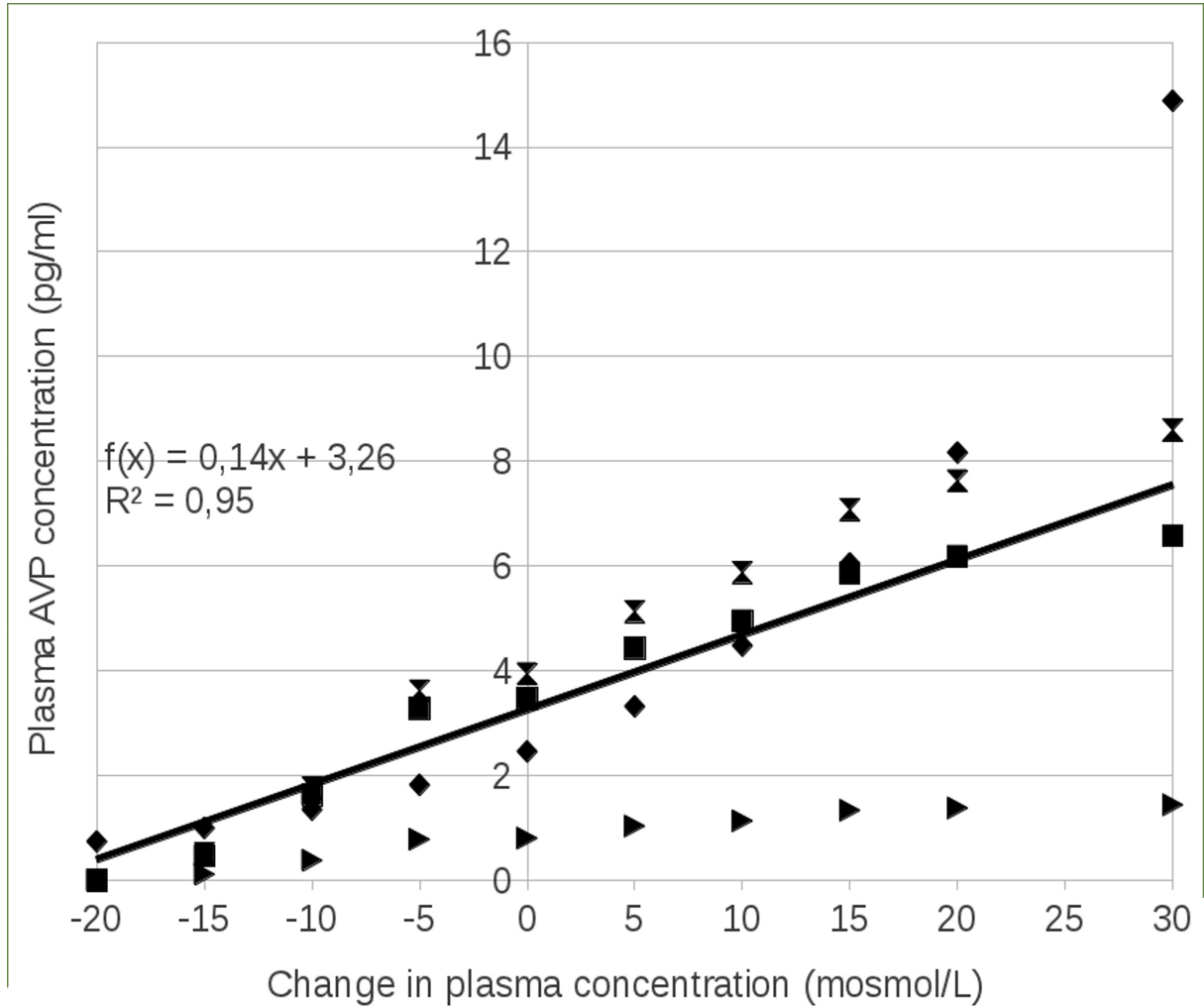


FIGURE 4.4 – Simulated and experimental [AVP]-to-osmolality relationships. Black squares represent the simulated mean [AVP] and the continuous line illustrates the linear regression fit of the data (see equation on the figure). Black diamonds represent the experimental data (Bourque 1998 and Weisinger et al. 1993). The mean [AVP] was also simulated either without the frequency-dependent facilitation of AVP release (triangles), or without the spike propagation failure mechanism (hourglasses).

4.5.4 Quantitative secretion of AVP predicted from the simulated MCN population

The simulation of the MCN population validated above was linked to the simulation of the stimulus-secretion coupling and to the simulation of the [AVP] dynamics (see methods). The predicted [AVP] was then compared with experimental data that reported [AVP] as a function of the plasma osmotic concentration (Bourque 1998). Figure 4 demonstrates the close fit between the prediction and the experimental data when including the data translation (10 mosmol/L) observed in the previous section (see discussion).

The next series of simulations investigated the importance of the facilitation and of the spike propagation failure mechanisms implemented in the stimulus-secretion coupling simulation. Figure 4 compares experimental data on [AVP] dynamics with simulations lacking either the frequency dependent facilitation mechanism (triangles) or the conduction failure mechanism (hourglasses). The simulations clearly predicted that these two mechanisms are essential to simulate a realistic global [AVP]. Indeed, the linear regression of the simulated data was $0.17x + 3.44$; $R^2 = 0.99$ (the data point > 20 mosmol/L was not included to exclude volemic modulation; see discussion). This regression was close to the experimental linear regression ($0.15x + 3.02$; $R^2 = 0.92$) when the conduction failure and the facilitation mechanisms are included. When these mechanisms are omitted, the linear regression of the simulation was $0.21x + 4.01$; $R^2 = 0.99$ and $0.04x + 0.80$; $R^2 = 0.97$, respectively.

The next series of simulations investigated the importance of the mAVP/spike on the [AVP]. Table 1 reports a wide range of mAVP/spike and the impact of the extreme values was studied using the MCN population simulation. Figure 5 compares the simulated relationship (plasma [AVP] to osmotic concentration) using normal ($1.30 \cdot 10^{-5} pg$), small ($0.62 \cdot 10^{-5} pg$) and large ($5.67 \cdot 10^{-5} pg$) mAVP/spike values with experimental data (Bourque 1998; Weisinger et al. 1993). The simulation predicts that the small and large value of mAVP/spike were not in agreement with the experimental data and, thus, validates the initial assumption made in the model ($1.30 \cdot 10^{-5} pg$).

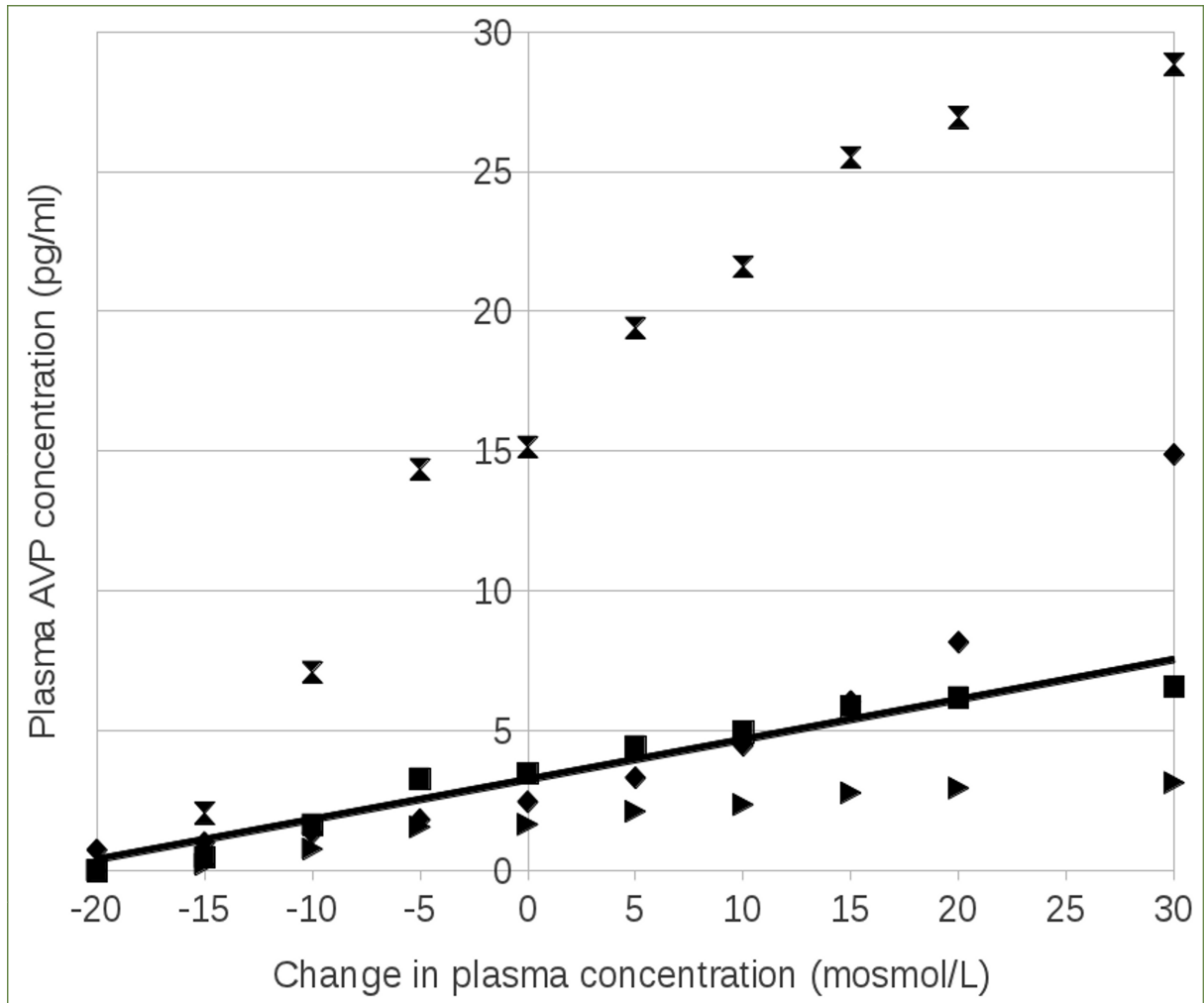


FIGURE 4.5 – Impact of various mAVP/spike on the [AVP]-to-osmolality relationships. Black squares represent the simulated mean [AVP] and the continuous line illustrates the linear regression fit of the data using a mAVP/spike of $1.30 \cdot 10^{-5} pg$ (see method). Black diamonds represent the experimental data (Bourque 1998 and Weisinger et al. 1993). The mean [AVP] was also simulated by implementing a mAVP/spike of $0.62 \cdot 10^{-5} pg$ (triangles) and of $5.67 \cdot 10^{-5} pg$ (hourglasses).

4.6 Discussion

In this study, we implemented a realistic quantitative simulation of the AVP concentration dynamics under iso-osmotic conditions and during mild osmotic challenges. The present simulation required a complex model that included three distinct sub-models : (1) the overall firing behavior of the global MCN population, (2) the mechanisms underlying the stimulus-secretion coupling and (3) the pharmacodynamics of AVP. The simulations predicted that only the autocrine secretion of dynorphin by the MCNs was essential to determine the firing pattern of the MCNs (irregular, phasic and continuous spike discharge). However, this sole determinant was not sufficient to produce a realistic overall firing rate of the MCN population in response to a change in osmotic pressure. The variability of the resting membrane potential among the neuroendocrine cell population was also critical to correct the firing rate under isoosmotic conditions and to produce a realistic prediction of the overall firing rate during changes of the plasma osmotic concentration. In addition, we presented evidence that both the frequency-dependent facilitation and the spike propagation failure are essential mechanisms of the stimulus-secretion coupling needed to make physiological predictions on the overall AVP concentration. The next sections discuss the assumptions and the accuracy of the predictions made with the present model of the quantitative dynamics of AVP concentration.

4.6.1 Insight from the simulation : autocrine Dynorphin secretion and distribution of the resting membrane potential are the two critical determinants underlying the variety of firing behaviors in the MCN population

It has been known for years that the MCN neurons display four distinct types of firing behaviors (Brimble and Dyball 1977; Wakerley et al. 1978). However, the determinants of such a variety of behaviors among the whole MCN population are still under debate. Experimental observations, as well as mathematical simulations indicated that the afferent synaptic input might contribute to the transition between firing behavior (Nadeau and Mougnot 2011; Richard and Bourque 1995), while the autocrine action of the dynorphin (Brown et al. 2008) as well as membrane depolarization (Nadeau and Mougnot, 2011) might also be considered powerful determinants of the MCN firing behavior. In this study, we used a computational model of the MCN to predict the individual impact of the amplitude and frequency of the synaptic potentials, the effect of dynorphin secretion and the role of membrane potential in triggering each of the

four firing behaviors, i.e., silent neurons and neurons displaying irregular, phasic and continuous spike discharges. The model used for testing the four putative determinants was based on a recent model of a single MCN that implements osmodetection capability and a mechanism of frequency-dependent fatigue of the dynorphin secretion (Nadeau and Mougnot, 2011). The application of a quantitative approach to categorize the simulated firing behavior of the MCNs with accuracy (Poulain et al. 1988) predicted that neither the amplitude, nor the frequency of the synaptic events might constitute solid determinants for the distribution of the distinct firing behaviors observed in the MCNs under iso-osmotic conditions (see results for details). A similar analysis predicted that membrane depolarization is a major determinant of the firing pattern heterogeneity, as previously thought (Nadeau and Mougnot, 2011). Interestingly, the analysis also predicted that the dynorphin secretion factor might be considered a primary determinant in generating the heterogeneous firing pattern that was experimentally observed in the MCNs. The latter prediction was in agreement with recent experimental data (Scott et al. 2009). In that study, the authors demonstrated that neurons displaying irregular and phasic firing behavior are under dynorphin inhibition, while the continuous firing behavior escaped the dynorphin-induced inhibition of firing. However, simulation of these pharmacological experiments using our MCN model and the quantitative characterization of the firing behavior predicted that membrane potential as the main determinant of the firing pattern heterogeneity introduced erroneous firing frequency and firing pattern, relative to the experimental data. Interestingly, the implementation of a variable dynorphin sensitivity in our MCN model instead of a fixed dynorphin secretion factor (Roper's MCN model) was coherent with these biological observations. Indeed, the implementation of continuous MCN firing required a weak DYN secretion factor of 0.25. This multiplicative factor is low enough (considering a DYN half-life of 5 sec (Roper et al. 2004)) that the continuous firing neurons escaped from their autocrine inhibition. In contrast, implementation of a phasic and irregular firing pattern required a stronger dynorphin factor of 0.75 and 4, respectively to provide an efficient dynorphin-mediated inhibition. These results are important because they extend the dynorphin function initially predicted by the MCN model developed by Roper et al. (2004). Indeed, this early model (absence of osmodetection capability and fixed DYN secretion factor) predicted that termination of bursts of action potentials in a MCN (phasic firing) was controlled by the autocrine action of dynorphin that disinhibited a Ca^{2+} -activated K^+ leak conductance. The present simulation clearly indicated that fine-tuning the parameters of the autocrine secretion of dynorphin (from minimal to maximal multiplicative factor) was critical to display all the firing behaviors from irregular to fast continuous spiking pattern. Therefore, the level of dynorphin secretion might have a better impact on the firing behavior of a single MCN, than the level of membrane depolarization *per se*.

The revisited model of a single MCN is greatly improved, compared to the previous models (Roper et al. 2004 ; Nadeau and Mougnot 2011). Indeed, this model now implements osmodetection capability, a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal and a variable dynorphin secretion factor. All these modifications made this model realistic enough to develop a population model of MCNs and predict the quantitative secretion of AVP in response to a challenged plasma osmolality. Although dynorphin secretion is a major determinant of the firing behavior in a single MCN, this sole determinant implemented in a simulation of the whole MCN population did not provide a realistic prediction of the population firing rate in response to a change in osmolality. Indeed, the simulated global firing rate increased in a step-wise manner, instead of showing a smooth increase in response to the rise in osmotic concentration, suggesting that the underlying mathematical function was not well-behaved. Solving the staircase appearance of the firing rate and AVP release was critical for the physiological realism of the model because of the high sensitivity of the kidney to small variations in [AVP] ($1/x$ dose response curve of the kidney (Verbalis 2003)). To smooth the simulated curves and improve the simulation, small variations in the initial resting membrane potential (RP) of the MCNs (-65 mV) were introduced into the model. The distribution of the RP among the MCN population was within the physiological range (Mason 1983) and was achieved with current injection of $\pm 0.2 \mu A/cm^2$ generating a $\approx \pm 1 mV$ change in the RP. Implementing such a variable RP led to a transition from four to three types of firing behaviors of the whole MCN population (MCN displaying irregular, phasic or continuous spiking discharge). Moreover, the addition of three levels of RP (RP $\approx -1 mV$; RP ; RP $\approx +1 mV$) led to nine subtypes of firing behaviors in the MCN population. Note that the percentage of silent neurons in the population was redistributed between the MCNs displaying either irregular or phasic or continuous firing and RP $\approx -1 mV$. These subtypes represent, in most cases, silent neurons under iso-osmotic conditions. However, during a rise in osmolality, each subtype will make a transition toward its respective type of firing behavior.

Alternatively, smoothing the overall firing rate-to-osmolality curve might be achieved by varying the weight of the synaptic event amplitude and/or frequency from one neuron to another. However, this possibility was not considered further because previous simulations using the present MCN model clearly demonstrated that synaptic inputs had variable impact on the firing frequency (Nadeau and Mougnot 2011). Moreover, the precise distribution of the synaptic event amplitude and frequency at the level of the MCN population remains unknown, thereby limiting the realistic implementation of this mechanism. Despite the fact that synaptic events have no critical role in building the diversity of the firing behaviors in our model, this does not rule out the role of the synaptic inputs in modulating MCN electrical activity. Indeed, both experimental

and simulation studies have shown that synaptic potentials combined with the specific osmodetection capability of the MCN (mechanosensitive channels) had a real impact on the excitation of the MCNs during a change in the plasma osmotic concentration (Nadeau and Mougnot 2011; Richard and Bourque 1995). In addition, the relative population of MCNs displaying a specific firing behavior is modified within the whole MCN population when the osmotic concentration increases (Wakerley et al. 1978). Under such a change in osmolality, both the amplitude and frequency of the synaptic events might constitute major determinants in generating the transition between the firing behaviors, as well as in shaping the frequency of the spiking discharges (Nadeau and Mougnot 2011).

4.6.2 Insight from the simulation : spike propagation failure and facilitation of vesicular release are critical determinants underlying the overall [AVP]

To predict the appropriate overall [AVP] in response to a specific level of osmotic pressure, the firing rate of the MCN population was converted into [AVP]. The slope of the [AVP]-to-osmolality relationship was identical to experimental data carried out *in vivo* (Bourque 1998; Weisinger et al. 1993), thus validating our model of stimulus-secretion coupling (osmolality-induced AVP secretion). However, a translation of 10 mosmol/l was required to superimpose the predicted and the experimental relationships. This translation might arise from the model of osmodetection implemented in the present MCN model that was built from *in vitro* experimental data (Nadeau and Mougnot 2011). Therefore, the quantitative simulation of [AVP] might be more representative of experimental results obtained *in vitro*. However, this discrepancy was ameliorated by including a correction factor of +10 mosmol/l into the model. This correction created a rightward shift of the [AVP]-to-osmolality relationship that greatly improved the physiological realism of the simulation, allowing the MCN population model to make realistic *in vivo* predictions of [AVP] dynamics.

AVP stimulus-secretion coupling depends on several critical mechanisms downstream of the soma-generated spike activity (Cazalis et al. 1985; Nordmann and Stuenkel 1986; Bondy et al. 1987; Bicknell 1988; Hobbach et al. 1988; Bielefeldt and Jackson 1993). However, a precise estimation of the impact of these individual mechanisms on AVP stimulus-secretion coupling is difficult to achieve experimentally, and we took advantage of the physiological realism of our MCN population model to quantify the role of each mechanism in AVP stimulus-secretion coupling. To do this quantification, each

mechanism was retrieved individually from the model before simulating the [AVP]-toosmolality relationship. The frequency-dependent facilitation of AVP secretion is an important mechanism implicated in [AVP] regulation within the range of osmotic conditions tested (-20 to + 30 mosmol/l). Indeed, removing this mechanism caused a global collapse of the overall [AVP] (mean absolute change of 2.59 pg/ml), which is more pronounced in the high range of osmotic concentrations.

The spike propagation failure mechanism is also critical, but its quantitative impact on the overall [AVP] is smaller because the removal of this mechanism triggered an AVP oversecretion with a mean absolute change of 0.58 pg/ml. Note that under extreme plasma hyperosmolality (+30 mosmol/l), there is a large discrepancy between the experimental and the simulated [AVP] value. This discrepancy is likely attributed to the experimental protocol used to collect data (Weisinger et al. 1993). Indeed, the use of hypovolemic rats to create large plasma hyperosmolality likely introduced an exaggerated [AVP] in the experimental data because hypovolemia is accompanied by a large increase in AVP secretion (Dunn et al. 1973). This additional volemic effect on [AVP] is only visible near +30 mosmol because significant dehydration (and thus, hypovolemia) is required to cause such a large plasma hyperosmolality. Because the current simulation does not implement volemic stimuli to adjust [AVP], the exaggerated responses cannot be appropriately computed at extreme plasma hyperosmolality. Some experimental studies have observed the presence of a time-dependent fatigue of AVP secretion (Cazalis et al. 1985; Bicknell 1988). Such a mechanism that occurs during a burst of electrical activity implies that only the spikes elicited during the first 9- 18 sec are efficient for AVP secretion (Cazalis et al. 1985). The implementation of a specific time-dependent fatigue mechanism in the secretion coupling model was not considered further in this study because we assumed that this mechanism was implicitly included in the simulation. First, under iso-osmotic conditions, time-dependent fatigue was included in the mean release of AVP per spike. This mean is based on the overall AVP secretion and the mean firing rate of the MCN population. Second, the time-dependent fatigue was also included when the osmotic concentration increased. Indeed, the simulated frequency-dependent facilitation mechanism was implemented using data obtained with an experimental protocol using artificial trains of spikes elicited at different frequencies and lengths to estimate the frequency-dependent facilitation of AVP release (Cazalis et al. 1985; Bicknell 1988).

4.6.3 Insight from the simulation : The large theoretical range of mean AVP release per spike introduces flexibility into the model

In addition to testing for the frequency-dependent facilitation of AVP secretion and for spike propagation failure, we used our model to estimate which hypothetical value of mean AVP release per spike (mAVP/spike ; see method) would be quantitatively realistic to simulate [AVP] (Leng et al. 2008a ; Leng et al. 2008b ; Leng and Ludwig 2008 ; Morris 1976). The simulation indicated that the initial assumption for a mAVP/spike of $1.3 \cdot 10^{-5} pg$ (see table 1) was realistic to fit the experimental data (Weisinger et al. 1993). This later study was considered as a reference study (Bourque 1998) because of the loglinear analysis that correctly weighted the lower [AVP] and the use of a high sensitivity assay to estimate [AVP] (AVP sensitivity 0.3 pmol/l).

In addition, changing the mAVP/spike from the smallest hypothetical value ($0.63 \cdot 10^{-5} pg$) to the largest ($5.67 \cdot 10^{-5} pg$) predicted significant leeway for fine-tuning the simulation as the resulting range of [AVP] was very large (3 pg to 27 pg at +20 mosmol/l). This large span for the hypothetical mAVP/spike might be useful to fine-tune the simulation to fit other experimental data (e.g., (Dunn et al. 1973)) where the AVP concentration is systematically higher or lower than the experimental data used here (Weisinger et al. 1993).

4.6.4 Further development of the model implementing AVP dynamics

The present complex model simulating the quantitative secretion of AVP requires an AVP dynamics model to compute an overall [AVP] from individual AVP release. The later step in the simulation implied several biological parameters such as the distribution volume of AVP. In the present study, we assumed a fixed distribution volume of AVP (60 ml), whatever the change in osmolality. This assumption is valid because the simulation correctly predicts the AVP concentration under iso-osmotic or challenged plasma conditions. However, in reality, this parameter fluctuates every day, and volume changes are, most of the time, associated with changes in osmotic concentration even over a short time-scale, as demonstrated using computational prediction with a high temporal resolution (Nadeau et al. 2010). We tested the effect of changing the distribution volume of AVP (see online resource 2), and the simulation clearly indicated that

varying this parameter did impact the dynamics of the overall [AVP]. However, the effect was much smaller than the one observed experimentally (+20% vs. +185% in the slope of the [AVP]-to-osmolality curve for a 15% change in the volume; see online resource 2). The discrepancy is likely attributed to the lack of active mechanisms in the simulation that modulate the [AVP] as a function of the body fluid volume. These active mechanisms cannot be implemented in the actual simulation because of the lack of detailed experimental data describing the link between the change in body fluid volume and increased MCN excitability or increased AVP secretion. However, it could be interesting in the future to include these active mechanisms in the model to increase its applicability. Moreover, the simulation of the [AVP] dynamics could also be improved. Indeed, the current simulation uses only three parameters to simulate the AVP pharmacodynamics : the AVP distribution volume, the AVP half-life and the AVP secretion trains. In reality, the [AVP] dynamics are more complex : it has been shown that the distribution volume is composed of many reservoirs that exchange AVP with distinct kinetics and that the AVP half-life is specific for each reservoir ((Wilson et al. 1978)). However, the necessary biological parameters to implement this simulation for the rat are not yet available to our knowledge.

4.7 Acknowledgement

This project was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR ; MOP-178002). LN received a scholarship from the NSERC (ESD3-334440-2006). The authors would like to thank Drs. Colin Brown (University of Otago, Dunedin, New Zealand) and Charles Bourque (McGill University, Montreal, Canada) for their valuable comments and suggestions on the preliminary results of the study.

4.8 References

- Bicknell, R. J. (1988). Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *Journal of Experimental Biology*, 139, 51-65.
- Bielefeldt, K., & Jackson, M. B. (1993). A calcium-activated potassium channel causes frequency-dependent action-potential failures in a mammalian nerve terminal. *Journal of Neurophysiology*, 70, 284-298.
- Bondy, C. A., Gainer, H., & Russell, J. T. (1987). Effects of stimulus frequency and potassium channel blockade on the secretion of vasopressin and oxytocin from the

- neurohypophysis. *Neuroendocrinology*, 46, 258-267.
- Bourque, C. W. (1998). Osmoregulation of vasopressin neurons : a synergy of intrinsic and synaptic processes. *Progress in Brain Research*, 119, 59-76.
- Brimble, M. J., & Dyball, R. E. (1977). Characterization of the responses of oxytocin and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *The Journal of Physiology*, 271, 253-271.
- Brown, C. H., Ludwig, M., & Leng, G. (1998). kappa-opioid regulation of neuronal activity in the rat supraoptic nucleus in vivo. *Journal of Neuroscience*, 18, 9480-9488.
- Brown, C. H., Ruan, M., Scott, V., Tobin, V. A., & Ludwig, M. (2008). Multi-factorial somato-dendritic regulation of phasic spike discharge in vasopressin neurons. *Progress in Brain Research*, 170, 219-228.
- Cazalis, M., Dayanithi, G., & Nordmann, J. J. (1985). The role of patterned burst and interburst interval on the excitation-coupling mechanism in the isolated rat neural lobe. *Journal of Physiology*, 369, 45-60.
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 52, 3212-3219.
- Hobbach, H., Hurth, S., Jost, D., & Racké, K. (1988). Effects of tetraethylammonium ions on frequency-dependent vasopressin release from the rat neurohypophysis. *Journal of Physiology*, 397, 539-554.
- Jackson, M. B., Konnerth, a., & Augustine, G. J. (1991). Action potential broadening and frequency-dependent facilitation of calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 380-384.
- Leng, G., Brown, C., Sabatier, N., & Scott, V. (2008a). Population dynamics in vasopressin cells. *Neuroendocrinology*, 88, 160-172.
- Leng, G., & Ludwig, M. (2008). Neurotransmitters and peptides : whispered secrets and public announcements. *Journal of Physiology*, 586, 5625-5632.
- Leng, G., Onaka, T., Caquineau, C., Sabatier, N., Tobin, V. A., & Takayanagi, Y. (2008b). Oxytocin and appetite. *Progress in Brain Research*, 170, 137-151.
- Mason, W. T. (1983). Electrical properties of neurons recorded from the rat supraoptic nucleus in vitro. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 217, 141-161.
- Morris, J. F. (1976). Hormone storage in individual neurosecretory granules of the pituitary gland : A quantitative ultrastructural approach to hormone storage in the neural lobe. *Journal of Endocrinology*, 68, 209-224.

- Nadeau, L., Arbour, D., & Mougnot, D. (2010). Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis. *BMC Physiology*, 10, 17.
- Nadeau, L., & Mougnot, D. (2011). New determinants of firing rates and patterns of vasopressinergic magnocellular neurons : predictions using a mathematical model of osmodetection. *Journal of Computational Neuroscience*, doi : 10.1007/s10827-011-0321-4.
- Nordmann, J. J., & Stuenkel, E. L. (1986). Electrical properties of axons and neurohypophysial nerve terminals and their relationship to secretion in the rat. *Journal of Physiology*, 380, 521-539.
- Poulain, D. A., Brown, D., & Wakerley, J. (1988). Statistical analysis of patterns of electrical activity in vasopressin and oxytocin-secreting neurones. In : *Pulsatility in neuroendocrine systems* (ed. Leng G), 119-154. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Richard, D., & Bourque, C. W. (1995). Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *Journal of Physiology*, 489, 567-577.
- Roper, P., Callaway, J., & Armstrong, W. (2004). Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus : a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study. *Journal of Neuroscience*, 24, 4818- 4831.
- Scott, V., Bishop, V. R., Leng, G., & Brown, C. H. (2009). Dehydration-induced modulation of kappa-opioid inhibition of vasopressin neurone activity. *Journal of Physiology*, 587, 5679-5689.
- Verbalis, J. G. (2003). Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17, 471-503.
- Wakerley, J. B., Poulain, D. A., & Brown, D. (1978). Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Research*, 148, 425-440.
- Wakerley, J. B., Poulain, D. A., Dyball, R. E., & Cross, B. A. (1975). Activity of phasic neurosecretory cells during haemorrhage. *Nature*, 258, 82-84.
- Walters, J. K., & Hatton, G. I. (1974). Supraoptic neuronal activity in rats during five days of water deprivation. *Physiology & behavior*, 13, 661-667.
- Weisinger, R. S., Burns, P., Eddie, L. W., & Wintour, E. M. (1993). Relaxin alters the plasma osmolality-arginine vasopressin relationship in the rat. *Journal of Endocrinology*, 137, 505-510.
- Wilson, K. C., Weitzman, R. E., & Fisher, D. A. (1978). Arginine vasopressin metabolism in dogs. II. Modeling and system analysis. *American Journal of Physiology*, 235, E598-605.

4.9 Fichiers additionnels du troisième article

Comme cet article n'est pas publié, une version finale n'est pas annexé à cette thèse. De plus, les fichiers additionnels de ce troisième article ont été intégré ici plutôt qu'en annexe.

4.9.1 Fichier additionnel 1

Ce fichier présente une analyse de la sensibilité de la méthode quantitative de Poulain et al.1988 à la durée du temps de simulation. Dans leur article, Poulet et al.1988 suggèrent une durée d'enregistrement électrophysiologique minimale de 10 min pour bien déterminer quantitativement les paramètres $mofr$ et $V/mofr$ et ainsi déterminer avec confiance le type de comportement d'un neurone. Notre analyse montre que, pour les simulations, une durée entre 1 min et 2 min est suffisante pour qu'il n'y ait pas d'erreur dans la classification d'un neurone. Par contre, pour avoir une marge de sécurité et pour s'assurer de la stabilité des paramètres $mofr$ et $V/mofr$, une durée de 200 sec a été choisie.

Online Ressource 1 – Impact of the duration of the simulation on the category of firing behaviors

Categorization of the MCNs based on their firing behaviors is a critical prerequisite for validating the simulations used in this study. The recommended duration for the experimental recordings to categorize the firing behavior with confidence was 10 min (Poulain et al. 1988). Here we demonstrate that a simulation of 200 sec is sufficient to categorize the firing behavior of individual MCN. The following table presents the evolution of the mean of firing rate (mofr) and the variance-to-mean ratio (V/mofr) as a function of the duration of the simulation.

Duration (ms)	MCN firing behaviors							
	Phasic		Irregular		Continuous		Silent	
	mofr	V/mofr	mofr	V/mofr	mofr	V/mofr	mofr	V/mofr
30000	2.67	16.22	0.00	0.00	6.47	0.66	0.00	0.00
60000	2.68	16.24	0.05	0.00	6.47	1.10	0.00	0.00
120000	3.26	16.34	0.03	0.00	6.45	0.90	0.00	0.00
180000	3.12	16.36	0.95	12.02	6.44	0.94	0.01	0.00
240000	3.25	16.29	0.71	12.36	6.43	0.90	0.00	0.00
300000	3.40	15.95	0.57	12.48	6.44	0.89	0.00	0.00
360000	3.29	16.13	0.48	12.55	6.43	0.86	0.00	0.00
420000	3.37	16.18	0.81	12.38	6.43	0.82	0.00	0.00
480000	3.33	16.66	1.04	12.36	6.44	0.83	0.00	0.00
540000	3.37	16.42	0.94	12.45	6.44	0.81	0.00	0.00
600000	3.33	16.40	0.85	12.51	6.44	0.81	0.00	0.00

The simulation indicates that a minimal duration of 120 sec is necessary to correctly categorize the firing behavior (grey background). Note that the mofr of the irregular firing pattern changes radically between 120 and 180 sec and stays relatively constant after 180 sec. This change does not impact the category of the firing pattern, but will influence AVP secretion (see text for details). To obtain more reliable values for mofr and V/mofr, the cut-off duration of the simulations was set to 200 sec. This minimal duration required to correctly categorize the firing behavior using simulations is probably shorter because the simulated traces are more stable (less noise) than the experimental traces.

Reference:

Poulain, D. A., Brown, D., & Wakerley, J. (1988). Statistical analysis of patterns of electrical activity in vasopressin and oxytocin-secreting neurones. In: *Pulsatility in neuroendocrine systems* (ed. Leng G), 119-154. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.

4.9.2 Fichier additionnel 2

Ce fichier présente une analyse de l'effet d'un changement du volume de distribution de l'AVP sur la dynamique de [AVP]. En particulier, la relation [AVP]-osmolalité est comparée avec des données expérimentales. La conclusion de cette analyse est qu'il manque des mécanismes actifs dans notre modèle pour pouvoir simuler correctement l'impact d'un changement de volume sur la [AVP].

Online Resource 2 – Effect of AVP distribution volume on [AVP]

Hypovolemia has been shown to be an important factor influencing plasma [AVP] and a reduced body fluid volume triggers a change in the slope of the [AVP]-to-osmolality relationship. In addition, hypovolemia triggers an exponential rise in [AVP], which depends on the reduced volume in percent (Dunn et al. 1973). In this online resource we tested whether these two cases might be caused by a reduction in the AVP distribution volume, or if additional mechanisms are required to account for the increased plasma [AVP].

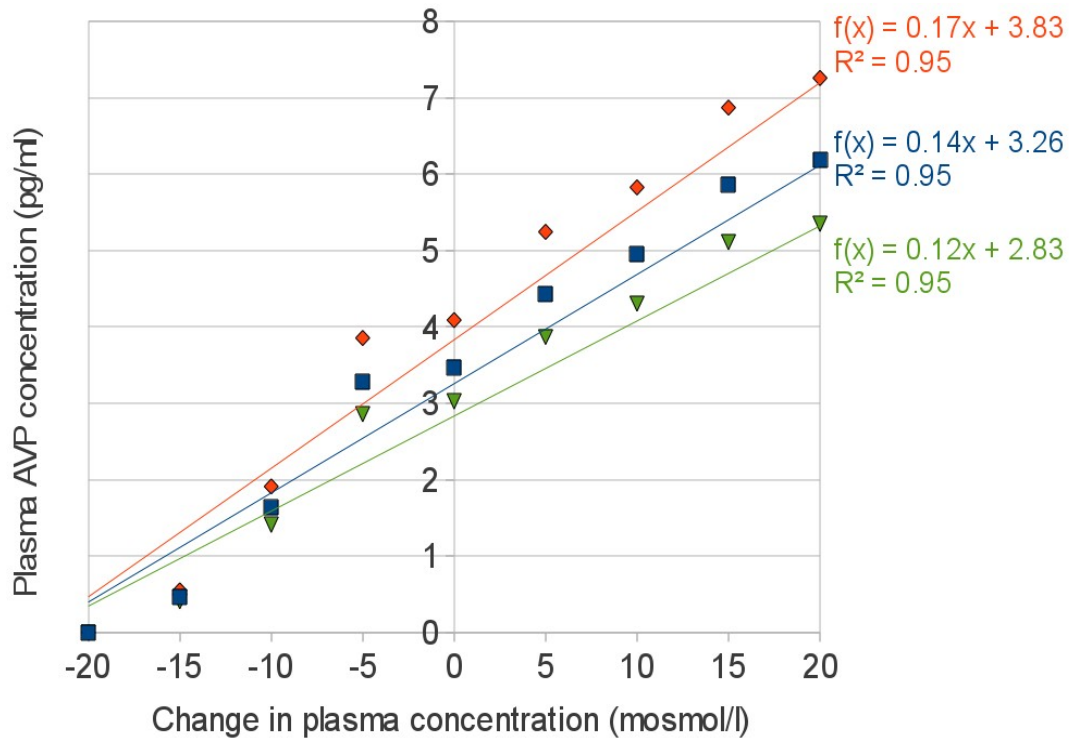


Fig.1: Effect of the AVP distribution volume on plasma [AVP] when osmotic concentration is varied.

This simulation predicted the slope of the [AVP]-to-osmolality relationship in hypovolemia (15% reduction in the AVP distribution volume, 60 ml; orange diamond), in isovolemia (blue square) and in hypervolemia (15% increase in the AVP distribution volume; green triangle). The slope of the [AVP]-to-osmolality was clearly modified (see trend line equations). However, in percent, the change in the simulated slope (+20% slope in hypovolemia) was less important than the change in the slope of the experimental data obtained for an equivalent volume loss (+185%; Figure 6 of Dunn et al. 1973). This discrepancy indicates that the increased slope of the experimental data was not solely caused by a change in volume and that additional active mechanisms stimulating AVP secretion are required.

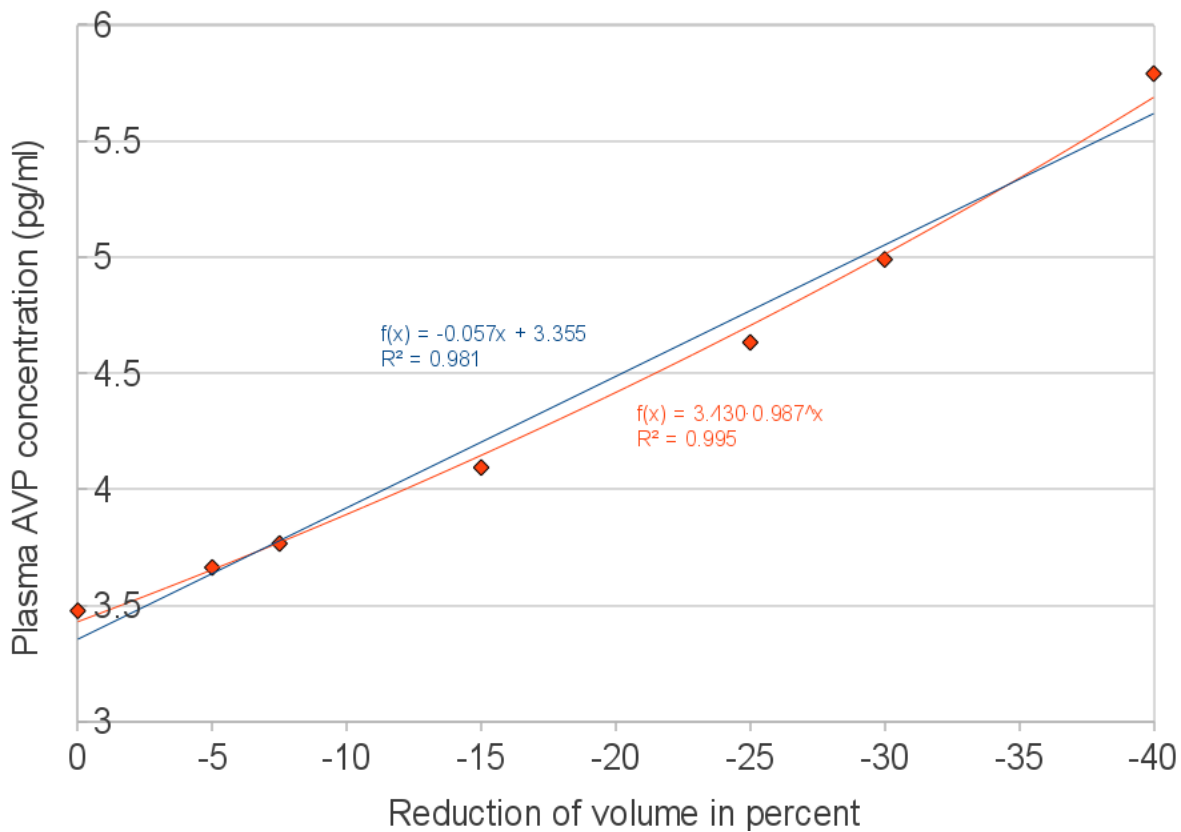


Fig.2: Effect of a reduced AVP distribution volume on plasma [AVP] in iso-osmotic and hypovolemic conditions.

This simulation predicted a weak exponential increase in [AVP] with hypovolemia because R^2 of the linear trend line (0.981) was lower than R^2 of the exponential trend line (0.995). However, the simulated exponential increase in [AVP] due to the distribution volume did not match the experimental data (Figure 7 of Dunn et al. 1973). Indeed, the simulation of a 20% reduction in the distribution volume triggered a weak increase in [AVP] from 3 to 4.5 pg/ml. Contrastingly, a similar decrease in body fluid volume in the rat triggered a massive increase in [AVP] from 1.3 to 40 pg/ml.

Taken together, the huge discrepancy between simulation and experimental data suggests that AVP secretion caused by a change in the body fluid volume is not only a consequence of a passive increase in [AVP] due to the reduction of the AVP distribution volume but is caused by active mechanism(s) protecting the organism from volume loss.

Reference:

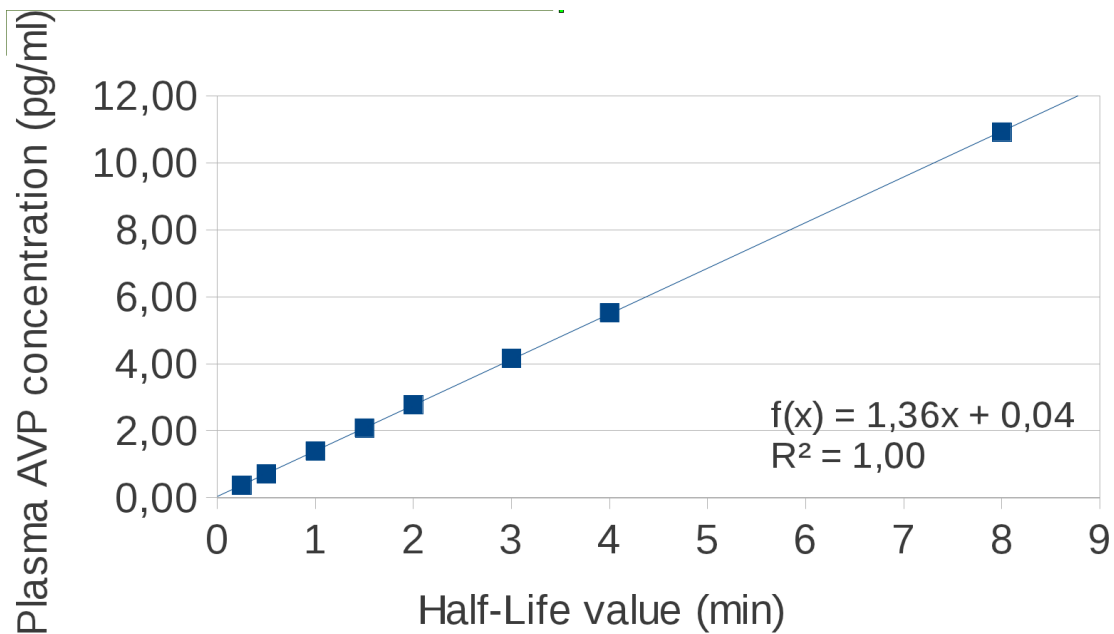
Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 52, 3212-3219.

4.9.3 Fichier additionnel 3

Ce fichier présente une analyse de l'effet d'un changement de la demi vie de l'AVP sur la concentration d'AVP dans le plasma. Comme attendu dans notre simulation, cette relation est linéaire.

Online Resource 3 – Effect of varying the AVP half-life on plasma [AVP]

AVP half-life is a critical parameter for the prediction of plasma [AVP]. Based on the study of Leng and Ludwig (2008), we made the assumption of implementing 2 minutes as for the AVP half-life in our mathematical model. However, other values have been reported for AVP half-life (see table 1), and AVP dynamic might not be described using a single exponential function (Wilson et al., 1978). Therefore, we tested the impact of varying this parameter on plasma [AVP] to explore the leeway that we might introduce to fine-tune AVP half-life in order to predict a realistic plasma [AVP].



Relationship between AVP half-life and plasma [AVP] under iso-osmotic condition (0 mosmol/L).

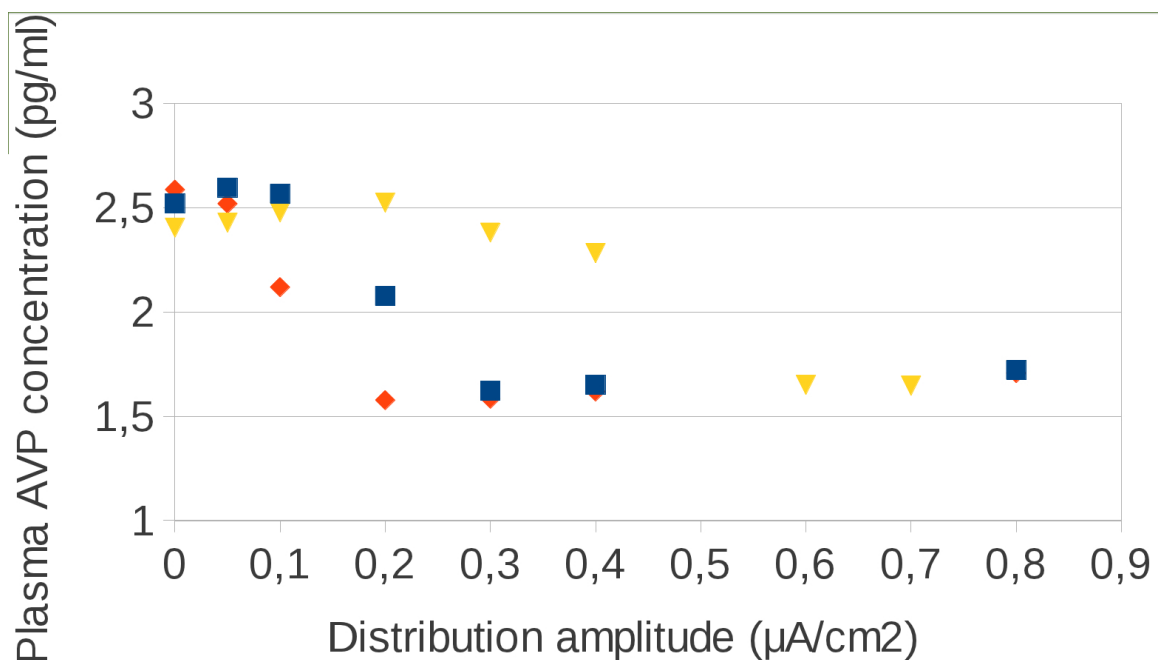
All the parameters, except AVP half-life, used to create this simulation are identical to those presented in Figure 5. As expected, R^2 indicated a pure linear relationship between AVP half-life and plasma [AVP]. Note that the value 5 min presented in table 1 is not a realistic value of AVP half-life. Indeed, that specific value of AVP half-life predicts an unrealistic basal level of plasma [AVP].

4.9.4 Fichier additionnel 4

Ce fichier présente une analyse de l'effet d'un changement de l'amplitude de courant utilisé pour générer la population de neurones magnocellulaires. Il est démontré par cette analyse que le choix fait pour cette valeur dans la simulation est adéquat.

Online Resource 4 – Effect of varying the distribution of the current injection on plasma [AVP]

Implementation of a distribution of the resting membrane potential in the population of MCNs was necessary to obtain a realistic simulation of AVP secretion at the neurohypophysis (see results for detail). The distribution of the current amplitude injected in the MCNs was fixed at $\pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($\approx 1 \text{ mV}$), which corresponds to the standard error reported in Mason's study (1983). However, variation of the membrane potential around the mean resting potential (-67 mV) appears larger ($\approx 20 \text{ mV}$, see results for detail) and such variation might affect the physiological realism of plasma [AVP]. Therefore, the robustness of our assumption of using $0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ was tested by simulating plasma [AVP] as a function of the distribution of the current injection.



Effect of the distribution of the current injection on plasma [AVP] under three different osmotic concentrations : -10 mosmol/L (orange diamond), 0 mosmol/L (blue square) and $+10 \text{ mosmol/L}$ (yellow triangle).

The results validate the assumption of using $\pm 0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ as the distribution of the current injection in the MCNs. At the level of the overall MCN population, the distribution of injected current (-0.2 ; 0 ; $+0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) in each subtype of firing behavior (irregular, phasic and continuous firing) gives the best simulation of plasma [AVP] in response to a change in extracellular osmolality. Note that current distribution below $0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ predicted maximal AVP secretion due to the step-function of the mean firing frequency of the MCN population (see results for detail). Current distribution above $0.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ predicted a low level of plasma [AVP]. This collapse of [AVP] was due to the combined action of (1) the DYN-mediated reduction in burst length in the increased neuronal population displaying a phasic pattern of firing and (2) the efficient conductance

failure occurring in the increased neuronal population displaying a fast continuous firing pattern.

4.10 Informations supplémentaires

4.10.1 MySQL

Dans le but d'augmenter la performance générale des simulations, une base de données MySQL a été créée entre l'article 2 et l'article 3 (objectif 2 et 3 respectivement). Cette base de données conserve les résultats de toutes les simulations. Ainsi, chaque combinaison des paramètres de simulation ne sera calculée qu'une seule fois. L'impact de la base de données sur la performance est observable dans toutes les conditions d'utilisation du programme de simulation. Par exemple, au lieu de lancer une petite simulation chaque fois qu'une fonction d'analyse de potentiels d'action doit être débogée et d'attendre la fin de cette simulation pour modifier la fonction qui en dépend, il suffit d'aller chercher un ou plusieurs trains de potentiels d'action de la longueur de notre choix dans la base de données et ensuite de tester la fonction sur cette séquence de façon instantané. La base de données permet aussi de sauver du temps de calcul quand des simulations composées sont utilisées pour créer des figures. Par exemple, dans la figure 1 du troisième article, le point I=-1.3 du panneau (c) correspond à la même simulation que le point D=1 du panneau (d). Quand le script de gestion des simulations pour la création du panneau (c) est exécuté, le point D=1 est extrait de la base de données au lieu d'être simulé et le résultat est obtenu instantanément au lieu d'être calculé pendant environ 2h comme tous les autres points. La base de données sera encore plus importante quand il sera nécessaire de simuler la sécrétion d'AVP causée par une population de neurones et de retourner une valeur dans le banc d'essai (simulation de l'objectif 1 ; voir discussion). En effet, la base de données permettra d'obtenir instantanément un ensemble de trains de potentiels d'action pour chaque type de neurone et pour chaque concentration osmotique du plasma (voir structure de la base de données dans le tableau 4.6). Ainsi, en faisant des interpolations entre les valeurs similaires, nous éviterons un délai de calcul de plusieurs heures de temps réel pour chaque minute de simulation, car la simulation de l'objectif 1 a une résolution d'une minute.

L'utilisation de la base de données MySQL faite ici n'est pas optimale pour son intégration avec la simulation programmée en Scilab. En effet, Scilab n'a pas d'API (application programming interface) pour se connecter à une base de données MySQL. Il existe une interface nommée « scimysql » entre Scilab et l'API C de MySQL. Cette interface a été intégrée dans un « Scilab toolbox » par la communauté (seulement 2 membres actifs à l'hiver 2010-2011) mais cette interface n'est pas encore au point. Le choix a été fait de ne pas utiliser cette interface et d'utiliser une méthode moins performante mais plus facilement maintenable à moyen terme. Les résultats entrant et sortant de la base de données doivent passer par des fichiers binaires temporaires. Ces

fichiers sont produits par la fonction « save » de Scilab et sont lus par la fonction « load ». Les commandes envoyées à la base de données passent par le client MySQL sur la ligne de commande (Bash). Par ces commandes, les fichiers binaires de trains de potentiels d'action sont stockés dans des variables « blob » de MySQL par la fonction « LOAD_FILE ». Quand un résultat est demandé par le programme, MySQL lui retourne simplement en écrivant le contenu du « blob » préalablement enregistré dans un autre fichier temporaire via la commande « select into dumpfile » de MySQL. La structure de la base de données est présentée dans le tableau 4.6.

Field	Type	Null	Key	Default	Extra
Osmo	double	YES		NULL	
Time	int(11)	YES		NULL	
Current	double	YES		NULL	
Ratio_D	double	YES		NULL	
Ratio_PSP_Freq	double	YES		NULL	
Ratio_PSP_Amp	double	YES		NULL	
Seed	int(11)	YES		NULL	
Record	blob	YES		NULL	

FIGURE 4.6 – Structure de la base de données MySQL utilisée pour emmagasiner les résultats des simulations. « Osmo » est le changement de l’osmolalité. « Time » est la longueur de la simulation en milliseconde. « Current » est la valeur du courant injecté dans le neurone pendant la simulation. « Ratio_D » est un facteur multiplicatif modulant l’augmentation du signal D à chaque spike. « Ratio_PSP_Freq » est un facteur multiplicatif de la fréquence des événements synaptiques excitateurs et inhibiteurs. « Ratio_PSP_Amp » est un facteur multiplicatif du pulse de courant causé par un événement synaptique excitateur et inhibiteur. « Seed » est la valeur de départ du générateur pseudo-aléatoire. « Record » est le fichier binaire Scilab contenant le train de potentiel d’action

Il est important de toujours utiliser les mêmes valeurs de « Seed » pour le générateur de nombres aléatoires. De cette façon, les simulations ayant les mêmes paramètres initiaux produisent des résultats identiques. Ceci permet d’utiliser des entrées de la base de données dont le temps de simulation est plus long que celui demandé par le gestionnaire de simulation dans Scilab et de les raccourcir à la bonne longueur. Par exemple, si le programme demande une simulation d’une longueur de 100 sec et que dans la base de données il y a une simulation identique (même « seed ») mais de 200 sec, il peut récupérer le long train de potentiels d’action et le raccourcir à la taille demandée. S’il est nécessaire d’obtenir la moyenne d’un paramètre alors il est possible d’utiliser d’autres valeurs de Seed (ce qui est fait dans l’article 2). La valeur de « Seed » utilisée la majorité

du temps est 10 et les valeurs additionnelles utilisées si une moyenne doit être faite sont 12 et 13. Il serait aussi possible de faire du « Boot-Strap » (ou « Jackknife » ; selon la définition du ré-échantillonnage statistique) et de couper un train de potentiels d'action trop long en plusieurs séquences plus courtes et de faire des estimés du paramètre moyen sur ces séquences raccourcis. Ceci économiserait du temps de calcul en ayant seulement à effectuer une seule simulation pour obtenir une moyenne ; cette méthode n'a pas été implémentée pour l'instant.

4.10.2 Parallélisation

Pour accélérer les calculs, la simulation a été parallélisée. La parallélisation permet de tirer avantage de tous les noyaux (processeurs) d'un ordinateur au lieu de n'en utiliser qu'un à la fois. Dans notre cas, la parallélisation va diviser par quatre le temps de simulation puisque le serveur principal utilisé pour faire les calculs a 4 processeurs. Les versions de Scilab utilisées dans cette thèse (version 4 et version 5) n'ont pas de capacité multi-cores ou multi-processeurs. Le consortium qui développe Scilab a annoncé que la version 6 supporterait le multi-cores mais pour l'instant ce support est absent. Comme avec l'API MySQL (paragraphe précédent), il existe des « toolbox » supportées par la communauté qui permettent une certaine parallélisation des codes mais elles n'ont pas été utilisées dans cette thèse. Dans notre contexte, il n'est pas utile de paralléliser l'exécution interne de chacune des simulations de neurones. Il est plus judicieux d'automatiser l'exécution simultanée de plusieurs simulations avec des paramètres différents. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des bibliothèques comme MPI pour partager efficacement la mémoire et pour gérer la communication entre les processeurs ; il suffit seulement d'avoir un processus (« thread ») par simulation, les problèmes pouvant être résolus de cette façon sont appelés problème embarrassément parallélisable (« embarrassingly parallel problem »). Pour ce faire, il est nécessaire d'avoir un programme ou un script qui peut faire la gestion des simulations : distribuer une simulation par noyau et récupérer les résultats automatiquement. Un tel script a été écrit pour gérer facilement les simulations comme celle illustrée à la figure 1 de l'article 3. Par contre, comme Scilab n'a pas de capacité de parallélisation, il a fallu utiliser une méthode peu élégante pour l'implémentation parallèle. Le code pour la simulation d'un neurone magnocellulaire a été encapsulé dans un programme Scilab autonome qui peut recevoir par arguments sur la ligne de commande (Bash) tous les paramètres nécessaires pour la simulation. Ce programme autonome écrit les résultats de sa simulation dans un fichier temporaire (nommé selon un des arguments de la ligne de commande). Ainsi, un script externe ayant une liste de paramètres de simulation à tester, le nombre maximum de simulations à lancer en parallèle (plus petit ou égal au nombre de noyaux réels) et une base de données MySQL pour stocker les résultats peut lancer en parallèle plusieurs

instances du programme Scilab sur la ligne de commande et simplement récupérer les résultats une fois que chacun des calculs est terminés. Cette parallélisation est effectuée en utilisant les capacités de parallélisation limitées de Bash : l'opérateur « & » et la fonction « wait ». Cette méthode de parallélisation est particulièrement bien adaptée à la simulation de la sécrétion d'AVP en parallèle (méthode qui a été utilisée pour l'article 3) puisqu'il y a 4 types de neurones magnocellulaires dans le SON et qu'il y a quatre processeurs dans l'ordinateur. Chaque processeur est donc dédié pour la simulation d'un type particulier de neurone magnocellulaire ainsi que son couplage stimulus-sécrétion.

4.11 Liens avec les objectifs

Cet article correspond à l'objectif 3 de cette thèse. Par l'utilisation de la simulation développée pour l'objectif 2, il a été possible de simuler la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques. Les trains de potentiels d'action de toute la population des MCNs de l'hypothalamus (9000 neurones) ont été envoyés dans une simulation du couplage stimulus-sécrétion afin d'obtenir une séquence de relâchement des vésicules de vasopressine. À partir de cette séquence, il a été possible de simuler la dynamique de la sécrétion de vasopressine. Le but de cet objectif était de faire le lien entre les mécanismes de bas niveau (canaux ioniques ; objectif 2) et les fonctions de haut niveau (sécrétion de vasopressine). Ce lien améliore beaucoup le domaine d'application de la simulation puisqu'il est maintenant possible de moduler des canaux ioniques et de prédire un effet quantitatif obtenu au niveau de la sécrétion de vasopressine. Afin d'augmenter l'applicabilité de la simulation, il faudrait maintenant intégrer les simulations de l'objectif 3 avec celle de l'objectif 1. Cette intégration, une fois terminée, permettra de lier non seulement les changements des paramètres microscopiques vers des changements de la concentration de vasopressine, mais aussi vers des changements de tous les paramètres physiologiques de l'homéostasie hydrominérale.

Chapitre 5

Discussion et conclusion

5.1 Atteinte des objectifs

Dans cette thèse, nous avons étudié et émis des hypothèses et nous avons augmenté les acquis et les connaissances globales au sujet de l'homéostasie hydrominérale et, en particulier les connaissances sur la sécrétion de vasopressine par les neurones magnocellulaires en utilisant des modèles et des simulations informatiques. Les trois objectifs de ce doctorat ont été atteints par : (1) la création d'une simulation globale de l'homéostasie hydrominérale du rat (2) par la création d'une simulation d'un neurone magnocellulaire ainsi que des mécanismes d'osmodétections (3) et par la création d'une simulation d'une population de neurones magnocellulaires et du couplage stimulus-sécrétion pour la vasopressine. Les prochaines sections mettront en avant les plus importantes prédictions et les explications qui ont été faites en utilisant les simulations créées pour l'atteinte des objectifs. Ensuite suivront mes réflexions sur la continuité du projet, sur l'utilité des simulations, sur les limitations des simulations et sur la relation entre l'expérimentation et les simulations dans le contexte de l'homéostasie hydrominérale.

5.2 Mise en valeur des prédictions

En parallèle avec l'implémentation et la validation des modèles et des simulations dans le but d'atteindre les objectifs de cette thèse, des explications intéressantes et des prédictions ont été faites grâce aux simulations spécifiques présentées dans cette thèse. Les prochaines sections résumeront pour chaque article, et donc pour chacun des

objectifs, les découvertes intéressantes qui ont été faites pendant l'implémentation des simulations.

5.2.1 Premier article : Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis

Ce premier article présente une simulation de l'homéostasie hydrominérale complète d'un rat et, en particulier, de la régulation circadienne de la vasopressine. Cette simulation a l'avantage de donner un aperçu simultané et global de plusieurs paramètres physiologiques impliqués dans la balance hydrominérale. La simulation est un outil très utile complétant l'expérimentation puisque cette dernière ne peut fournir des données simultanément sur plusieurs paramètres physiologiques et, de plus, sa résolution temporelle est limitée. Grâce aux avantages de la simulation, il a été possible d'améliorer la compréhension de divers phénomènes de l'homéostasie hydrominérale. Les prochaines sous-sections résument les explications et prédictions qui ont été présentées dans les articles inclus dans cette thèse.

5.2.1.1 Existence de trois périodes dans le cycle circadien de l'homéostasie hydrominérale chez le rat

Il était déjà connu que la vasopressine avait une composante circadienne [82, 20]. Par contre, la faible résolution temporelle et le faible nombre de paramètres physiologiques étudiés simultanément dans ces expériences limitaient fortement les conclusions qui pouvaient être tirées [82, 20] au sujet du cycle circadien de l'homéostasie hydrominérale. Par l'utilisation d'une simulation ayant une haute résolution temporelle et pouvant prédire simultanément plusieurs paramètres de l'homéostasie hydrominérale pendant plusieurs jours consécutifs(20), il a été possible de faire des dynamiques moyennes des paramètres de l'homéostasie hydrominérale et de calculer les variations standards de ces moyennes. Grâce à ces moyennes et variations prédites sur plusieurs jours, il a été possible de définir quantitativement trois périodes dans le cycle circadien de l'AVP : la période de sommeil (déplétion), la période de réplétion (environ 19h à 3h) et la période de maintenance (3h à 8h). La période de sommeil est caractérisée par une faible consommation d'eau, une augmentation de la concentration extracellulaire de sodium, une augmentation de la concentration de vasopressine et une perte d'eau. La période de réplétion est la période après l'éveil du rat quand il recommence à boire et pendant laquelle il rétablit sa concentration extracellulaire de sodium. Finalement, la période de mainte-

nance est caractérisée par une stabilité relative des paramètres hydrominérales près de leur point d'équilibre. Cette stabilité se reflète par de faibles variations d'une journée à l'autre pendant cette période. Expérimentalement, il n'est pas possible de faire de telle moyenne et ce type de modélisation d'une fonction physiologique démontre bien l'utilité de compléter l'expérimentation par des simulations. En effet, la simulation ici prédit simultanément la dynamique de six paramètres physiologiques (volume intracellulaire, volume extracellulaire, concentration d'AVP, volume d'urine, consommation d'eau et concentration extracellulaire) à une résolution d'une minute. Or, expérimentalement, il est difficile d'obtenir tous ces paramètres physiologiques sur un seul rat. Il est encore plus difficile de les obtenir simultanément (à l'intérieur d'une minute), encore plus difficile de les obtenir à répétition et, finalement, encore plus difficile de les obtenir à une répétition de 1 min pendant plusieurs jours.

5.2.1.2 Fluctuations quotidiennes de la balance hydrominérale

Malgré la stabilité observée pendant la période de maintenance, la simulation a démontré que les fluctuations hydrominérales d'une journée à une autre, pour le même rat, peuvent être très grandes. La grande amplitude de ces fluctuations, en particulier vers la fin de la période de sommeil, peuvent expliquer les grandes variations observées d'un rat à l'autre dans une population de rat [17]. Il faut souligner que ces fluctuations sont maximales pendant la période de sommeil du rat, ce qui correspond généralement à la période durant laquelle les expériences sont faites sur les rats, augmentant ainsi la variabilité des mesures effectuées. La simulation prédit et recommande donc de faire des expériences préférentiellement pendant la période de maintenance pour toutes les mesures impliquant la balance hydrominérale. Par contre, cette période correspond approximativement à la fin de la nuit et il n'est pas pratique de faire des expériences à ce moment. Il est probablement plus facile de déphaser le cycle circadien des rats en ajustant la luminosité de l'animalerie de façon à ce que leur période de maintenance corresponde à un moment plus propice dans la journée pour faire des expériences et ainsi minimiser l'effet de la variabilité individuelle sur des mesures effectuées sur une population de rats de laboratoire.

5.2.1.3 Importance de l'ingestion d'eau en début de nuit

Nous avons cherché à comprendre quel paramètre pouvait causer d'aussi grandes fluctuations quotidiennes dans la balance hydrominérale et dans la concentration d'AVP. Nous avons fait l'hypothèse que les fluctuations, en particulier celles du milieu de la

période de sommeil (voir Figure 3 de l'article 1 ; section 2.6.2), étaient causées par des fluctuations dans la quantité d'eau bue juste avant la période de sommeil. En effet, le moment de la dernière consommation d'eau du rat est cruciale : s'il va boire juste avant la période de sommeil, il va avoir une réserve d'eau supplémentaire par rapport à un rat qui ne boit pas, et c'est cette réserve qui cause les grandes fluctuations de la concentration de vasopressine. Pour confirmer notre compréhension de ce mécanisme, nous devons comparer deux rats identiques, qui boivent les mêmes quantités d'eau aux mêmes moments dans la journée à l'exception d'une petite quantité d'eau en début de nuit (voir article 1 Figure 4 ; section 2.6.5). Les deux rats sont soumis aux mêmes conditions : ils perdent de l'eau par évaporation et transpiration et gagnent de l'eau métabolique. Le total de ces entrées et sorties d'eau est négatif (voir méthode de l'article 1) et donc, globalement, les rats perdent de l'eau pendant la période de sommeil. À partir d'expérimentation, il aurait été très difficile, voir impossible expérimentalement d'avoir deux rats identiques, buvant exactement la même quantité d'eau au même moment à moins d'avoir plusieurs groupes de jumeaux identiques, étant exactement dans le même état hydrominéral et étant forcé à boire de l'eau exactement au même moment. Par contre, avec la simulation, cette expérience est faite aisément et les résultats sont obtenus rapidement : le rat qui n'est pas forcé à boire de l'eau en début de nuit a une augmentation importante de concentration de vasopressine pendant la nuit (en comparaison avec le rat qui boit), ce qui confirme notre hypothèse, mais montre une diminution plus rapide de la concentration de vasopressine pendant la période de réplétion (diminution causée par le fait que le rat qui n'a pas bu au début de la période de sommeil doit boire de l'eau vers le milieu de la période de sommeil ce qui l'avantage au moment de la réplétion). Cette dernière prédiction de la simulation, bien que cohérente avec notre hypothèse de départ, n'est pas intuitive. La simulation nous a donc permis d'ajouter un élément à notre compréhension de la dynamique des fluctuations hydrominérales.

5.2.1.4 Le compartiment intracellulaire comme tampon

Prenant avantage de la simulation, un autre paramètre qui ne peut être isolé expérimentalement a été étudié : le volume du compartiment intracellulaire. En effet, il n'est pas possible expérimentalement d'étudier aisément l'effet tampon du compartiment intracellulaire sur la dynamique des fluctuations des autres paramètres hydrominéaux. Par contre, ce compartiment a clairement une importance dans la dynamique des paramètres hydrominéaux car il peut échanger de l'eau avec le compartiment extracellulaire et ainsi tamponner rapidement un changement de volume extracellulaire. En comparant la simulation d'une journée d'un rat standard et d'un rat identique mais privé virtuellement de l'effet tampon du compartiment intracellulaire, nous avons pu

observer l'importance de ce compartiment. La simulation a prédit que le rat privé du tampon subissait de plus grandes fluctuations dans ses paramètres hydrominéaux et devait compenser en buvant (19% plus d'eau que le rat normal dans la journée présentée à la figure 5 de l'article 1 ; section 2.6.6) et en urinant en excès.

5.2.1.5 Utilité de la simulation pour établir un protocole expérimental

Pour étendre l'applicabilité de notre simulation et pour faire une preuve de concept que notre simulation peut être utile pour l'industrie pharmaceutique, nous avons modélisé l'effet d'une drogue ayant des effets sur la balance hydrominérale : le furosémide. Le furosémide est un diurétique puissant causant une grande perte de sodium due à son inhibition de l'échangeur NKCC2 situé dans l'anse d'Henle. Cette simulation (voir Figure 7 de l'article 1) nous a permis de prédire la dynamique des paramètres physiologiques hydrominéaux pour un protocole connu de déplétion en sodium et ainsi de valider que le protocole fait bien l'effet recherché sur la balance hydrominérale d'un rat. La simulation a aussi permis d'expliquer certains faits contre intuitifs : par exemple, après la deuxième injection de furosémide et avant que le rat ait accès à de l'eau, le rat est en carence de sodium mais a simultanément une concentration extracellulaire de sodium trop élevée. Cette contradiction est résolue par l'observation que le furosémide fait uriner du liquide qui est hypoosmotique par rapport au plasma et donc le rat perd plus d'eau que de sodium. Ainsi, même s'il est en carence de sodium, il est encore plus en carence d'eau ce qui cause une élévation de la concentration de sodium extracellulaire et donc une hyperosmolarité du plasma. Éventuellement, quand une source d'eau est donnée au rat mais pas de source de sel, il se met à boire et rétablit son volume d'eau, mais ne peut rétablir sa concentration de sodium. Finalement, le rat a un volume normal, une quantité de sodium anormalement basse et donc une concentration extracellulaire de sodium inférieure à la normale. La simulation permet ici d'obtenir facilement une explication des phénomènes et de faire une histoire chronologique des évènements de ce protocole expérimental.

5.2.2 Deuxième article : New determinants of firing rates and patterns of vasopressinergic magnocellular neurons : predictions using a mathematical model of osmodetection.

Dans ce deuxième article, une simulation des neurones magnocellulaires vasopressinergiques est validée dans des conditions normales et dans différentes conditions osmotiques du milieu entourant les neurones, puis des conclusions sont tirées de cer-

tains des tests faits sur la simulation. En particulier, il a été possible de répondre à des interrogations au sujet de ces neurones et de prédire un nouveau mécanisme important de fatigue de la sécrétion de dynorphine qui était inconnu.

5.2.2.1 Quatre types de patrons de décharge de potentiels d'action

Expérimentalement, il a été observé que les neurones magnocellulaires vasopressinergiques ont quatre types de comportement de décharge de potentiels d'action : silencieux, irrégulier, phasique et continu (voir section 1.2.4). Il a été possible, à partir d'un seul neurone simulé, de reproduire tous ces types de comportement de décharge en changeant seulement des paramètres externes au neurone (voir figure 3 de l'article 2 ; section 3.5.5). Par exemple, il a été possible de faire des transitions d'un type de comportement vers un autre en changeant la concentration osmotique du milieu extracellulaire ou en changeant légèrement son potentiel de repos (qui est modulable par des hormones ou par la concentration ionique locale du milieu). Cette observation est particulièrement intéressante car elle permet de proposer l'hypothèse que la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques est homogène, qu'elle est composée d'un seul type de neurone et que c'est le milieu extracellulaire local (incluant les neurotransmetteurs) qui induit la genèse des quatre types de comportements observés. Cependant, bien que cette hypothèse était intéressante, elle a été en partie réfutée pendant la mise en place du troisième article (voir sous-section 5.2.3.1).

5.2.2.2 Présence d'un mécanisme de fatigue de la sécrétion de dynorphine

Pendant la validation de la simulation de neurone ayant des décharges électriques phasiques dans des conditions hyperosmotiques (voir figure 3 de l'article 2 ; section 3.5.5), nous nous sommes aperçu que les prédictions de la simulation n'étaient pas en accord avec l'expérimentation au sujet de la longueur des bouffées de potentiels d'action. En effet, il a été observé expérimentalement qu'un neurone phasique, en réponse à une augmentation de l'osmolalité du milieu l'entourant augmente sa fréquence intra-bouffée de potentiels d'actions (« intraburst firing rate ») et, simultanément, augmentante la longueur de ses bouffées [83, 84, 28] de potentiels d'action. Cependant, la simulation ne se comportait pas comme l'expérience : une augmentation de l'osmolalité causait bien une augmentation de la fréquence intra-bouffée, mais causait aussi une diminution de la longueur des bouffées de potentiels d'action. Or, dans la simulation (et dans la réalité), la longueur des bouffées est régulée par la sécrétion autocrine de dynorphine qui va désinhiber un courant potassique de fuite et arrêter brusquement les bouffées

de potentiels d'action [75]. De plus, dans la simulation, la sécrétion de dynorphine est directement reliée au nombre de potentiels d'action : plus il y a de potentiels d'action (augmentation de la fréquence intra-bouffée), plus il y a de dynorphine libérée et donc, plus les bouffées arrêtent rapidement. Comme il n'y avait pas d'issue pour régler le problème en respectant l'implémentation de la simulation, nous avons du conclure que la simulation, et plus généralement la compréhension de ce mécanisme autocrine, avait une lacune et qu'un mécanisme inconnu additionnel était requis pour expliquer l'allongement des bouffées de potentiel d'action. À partir de différents tests de simulation (changement des fréquences synaptiques relatives entre les entrées inhibitrices et excitatrices, changement du potentiel au repos, modification dans les perméabilités de certain courants et en particulier des courants de fuite, etc), nous avons déduit que la seule façon de résoudre le problème était d'introduire un mécanisme de fatigue de la sécrétion de dynorphine qui est dépendant de la fréquence des potentiels d'action. En introduisant un tel mécanisme dans la simulation, nous avons été capable de résoudre le problème et, maintenant, quand une augmentation de la concentration osmotique extracellulaire survient, la longueur des bouffées de potentiels d'action augmente en même temps que la fréquence intra-bouffée. L'utilisation de la simulation a donc permis de prédire l'existence d'un mécanisme inconnu et nouveau. Des expériences devront être entreprises pour confirmer cette prédiction.

5.2.2.3 Les bouffées de potentiels d'action peuvent être intrinsèquement régénératives

Dans la littérature, il y a certaines incohérences au sujet des bouffées de potentiels d'action des neurones magnocellulaires vasopressinergiques qui ont des décharges de type phasiques. Par exemple, il a été montré que les bouffées enregistrés pendant les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* ont besoin d'une dépolarisation glutamatergique continue pour entretenir ce patron de décharges de potentiels d'action. Si cette dépolarisation est bloquée par un antagoniste glutamatergique (ex. acide kynurénique) alors les bouffées s'arrêtent [85]. Par contre, il a aussi été démontré que l'activité phasique des neurones magnocellulaires dans des expériences *in vitro* n'est pas dépendante des entrées synaptiques, ils sont intrinsèquement régénératives [86, 87]. La simulation a réconcilié ces deux observations contradictoires (l'article 2). En effet, les simulations de neurones phasiques ont prédit que les bouffées de potentiels d'action peuvent être intrinsèquement régénératives ou peuvent être dépendantes de l'activité synaptique, ce sont de petits changements dans le potentiel membranaire au repos du neurone qui font la différence (voir figure 5 de l'article 2 ; section 3.5.6). Cette observation simple peut réconcilier les données *in vivo* et *in vitro* puisque ces expériences sont faites dans des conditions très différentes (les entrées synaptiques sont différentes, la composition

ionique et l'osmolarité du milieu sont différents, les hormones et neurotransmetteurs libérés dans le milieu sont différents, etc) et que plusieurs de ces différences peuvent causer de petits (et même de grands) changements dans la valeur du potentiel de membrane au repos.

5.2.2.4 Effet des entrées synaptiques sur l'activité électrique des MCNs

En plus d'analyser l'effet des entrées synaptiques sur la régénération des bouffées de potentiels d'action, nous avons poussé notre analyse plus loin et l'avons étendue à tous les types de comportement observés chez les MCNs (silencieux, irrégulier, phasique et continu), à plusieurs valeurs de potentiel de membrane (injection de courant) et à plusieurs valeurs de fréquences d'entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices (voir figure 6 de l'article 2; section 3.5.6). À partir de cet ensemble de simulations, nous avons pu déterminer : 1) que les entrées synaptiques excitatrices peuvent faire changer le type de comportement d'un neurone, 2) qu'il y a des types de comportements qui ne sont pas influencés par les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices et 3) qu'il y a des types de comportements qui sont influencés par les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices. Par exemple, quand le neurone a un comportement irrégulier, tous les types d'entrées synaptiques ont une grande influence sur la fréquence des potentiels d'action. Au contraire, quand le neurone a un comportement phasique alors aucun type d'entrée synaptique n'a d'influence sur la fréquence de décharge électrique du neurone car celle-ci est principalement contrôlée par ses propriétés intrinsèques. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que les entrées synaptiques n'ont pas la même fonction pour chacun des deux types de comportements; dans le cas des neurones phasiques, les entrées synaptiques ont comme seule fonction de garder le neurone assez dépolarisé pour permettre les bouffées de potentiels d'action, tandis que pour les neurones de type continu, en plus de dépolariser le neurone, les entrées synaptiques modulent la fréquence de décharge électrique.

5.2.3 Troisième article : Quantitative prediction of vasopressin secretion using a computational population model of rat magnocellular neurons

Dans cet article, une simulation de la sécrétion globale de vasopressine faite par une population de neurones magnocellulaires est utilisée pour simuler la dynamique de la concentration de vasopressine plasmatique dans différentes conditions osmotiques. Les résultats de cet article ont été obtenus par la combinaison de plusieurs simulations

(incluant celle de l'article 2). L'utilisation de ces simulations a également permis d'isoler l'effet de certains mécanismes impliqués dans le couplage stimulus-sécrétion de la vasopressine et d'analyser leurs impacts sur la dynamique de la vasopressine.

5.2.3.1 Isolation du mécanisme causant l'hétérogénéité comportementale des neurones magnocellulaires vasopressinergiques

Un prérequis pour simuler la sécrétion de la vasopressine en fonction de la concentration osmotique du milieu extracellulaire est de simuler la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques pour pouvoir obtenir l'activité électrique globale de la population (voir méthode de l'article 3 ; section 4.2). Or, la simulation de la population des neurones magnocellulaires est complexe, car cette population est composée de neurones ayant des comportements hétérogènes (voir 1.2.4). Il faut donc s'assurer que la population simulée est représentative de la réalité et inclue bien tous les types de comportement en respectant les sous-populations observées expérimentalement pour pouvoir bien prédire l'activité électrique globale. Pour ce faire, on doit être en mesure de déterminer avec certitude le type de comportement du neurone. Or, la méthode utilisée pendant les simulation de l'article 2 n'est pas une méthode fiable pour déterminer le type de comportement. En effet, dans cet article (article 2), nous avons déterminé que des changements dans l'injection de courant mimant des changements du potentiel de membrane étaient capables de faire passer un neurone d'un type de comportement à un autre cependant nous n'utilisons pas de méthode quantitative pour déterminer le type de comportement d'un neurone : nous estimions arbitrairement le type de comportement. Pour augmenter la rigueur de notre étude (voir section 1.4.6 pour les détails), nous avons donc décidé d'utiliser la méthode quantitative de Poulain et al.[5] pour classifier le comportement de décharges des MCNs et nous avons réanalysé l'effet d'un changement de l'injection de courant dans l'article 3 (voir Figure 1 ; section 4.2). De plus, nous avons décidé d'analyser l'effet d'autres paramètres physiologiques sur le comportement des neurones puisqu'il a été démontré expérimentalement que ces paramètres peuvent avoir une influence sur l'activité électrique des neurones : sécrétion de dynorphine, fréquence des entrées synaptiques et amplitude des entrées synaptiques. Il s'est avéré que trois des quatre paramètres testés (injection de courant, sécrétion de dynorphine et fréquence synaptique) avaient la capacité de générer tous les types de comportement dans un même neurone. Même si la fréquence synaptique peut être exclue à cause des valeurs extrêmes (et non physiologiques) nécessaires pour obtenir un comportement de décharges de potentiels d'action de type continu, il reste tout de même deux paramètres possibles. Nous avons donc cherché à savoir quel était le paramètre qui pouvait le mieux expliquer les quatre comportements observés expérimentalement. Pour ce faire, nous avons besoin de critères expérimentaux supplémentaires pouvant nous aider à discer-

ner quel est le mécanisme sous-jacent causant les comportements hétérogènes observés expérimentalement dans les MCNs. Nous avons trouvé ce critère dans une expérience de Scott et al. [88]. Dans cette expérience, un agoniste (U50,488H) et un antagoniste (nor-BNI) des récepteurs κ -opioïde (le récepteur de la dynorphine) sont appliqués sur des neurones ayant un comportement de décharge de potentiels d'action de type irrégulier, phasique ou continu en condition normale. Dépendamment du type de comportement initial, l'effet de l'agoniste et de l'antagoniste n'est pas le même. Nous avons simulé cette expérience afin de déterminer si l'un ou l'autre des mécanismes était cohérent avec ces données publiées. Les trois types de comportement de décharges de potentiels d'action ont été implémentés dans la simulation en utilisant soit l'injection de courant, soit la quantité de dynorphine sécrétée par potentiel d'action. Ensuite, nous avons testé l'effet d'une application virtuelle d'agoniste et d'antagoniste (voir figure 2 de l'article 3 ; section 4.2). Grâce à cette expérience simulée, nous avons constaté que l'injection de courant mimant une dépolarisation membranaire, notre méthode de choix jusqu'à maintenant, ne donnait pas de résultat cohérent avec la réalité pour trois cas sur neuf, tandis que la quantité de dynorphine sécrétée par potentiel d'action donnait des résultats cohérents dans tous les cas (voir figure 2 de l'article 3 ; section 4.2). Nous avons donc pu déterminer grâce à la simulation que le mécanisme le plus probable pour la génération des différents types de comportement de décharges de potentiels d'action est le niveau de sécrétion de dynorphine par potentiel d'action. Cette conclusion n'est pas complètement cohérente avec notre hypothèse formulée à l'article 2 qui prédisait que la population des neurones magnocellulaires était uniforme puisqu'ici nous affirmons que les quatre types de comportement de décharges électriques observés expérimentalement sont en fait le résultat d'une hétérogénéité dans les propriétés des neurones magnocellulaires vasopressinergiques : ils n'ont pas tous les mêmes niveaux de sécrétion (et/ou de sensibilité) à la dynorphine. Par contre, ce que nous affirmons ici est basé sur de meilleures données expérimentales et cette hypothèse est probablement plus près de la réalité physiologique que proposée dans l'article 2. Encore une fois, la simulation s'est avérée être un excellent outil pour augmenter rapidement notre compréhension des mécanismes cellulaires contrôlant l'activité de décharges des potentiels d'action des neurones magnocellulaires vasopressinergique et pour générer des prédictions physiologiques intéressantes qui pourront être vérifiées expérimentalement.

5.2.3.2 La distribution des potentiels membranaires au repos des neurones magnocellulaires est un paramètre critique

À partir de la nouvelle méthode utilisée pour implémenter la population des neurones magnocellulaires (paragraphe précédent) et du couplage-stimulus sécrétion (voir méthode de l'article 3 ; section 4.2), nous avons tenté de reproduire la relation entre

l'osmolalité et la fréquence moyenne des potentiels d'action de la population des neurones magnocellulaires. Dans un premier temps, il s'est avéré que la simulation était incapable de reproduire la relation osmolalité-fréquence de décharge moyenne observée expérimentalement [89] en utilisant une population composée de seulement quatre neurones. En effet, la relation observée expérimentalement est linéaire [89] tandis que celle prédite par la simulation ressemblait à une fonction Heaviside (forme d'escalier). Nous avons trouvé qu'en implémentant une distribution de $\pm 0.2 \mu A/cm^2$, soit environ $\pm 1 mV$, au lieu d'une valeur fixe pour les potentiels membranaires au repos des neurones, nous pouvions régler cette incohérence. En effet, cette distribution des potentiels de repos cause une distribution du seuil des potentiels d'action. Ainsi, au lieu d'avoir une valeur d'osmolalité précise à laquelle tous les neurones d'un même type se mettent à faire feu simultanément, il y a une distribution de valeur d'osmolalité pour lesquelles les neurones peuvent commencer à faire feu, ce qui a pour effet de lisser la relation osmolalité-fréquence moyenne de décharges. Après cette modification, la relation prédite par la simulation devient cohérente avec l'expérimentation. Cette modification de la simulation augmente encore notre compréhension des mécanismes cellulaires régulant la fréquence de décharges des potentiels d'action des neurones magnocellulaires. En effet, au paragraphe précédent nous affirmions l'importance des niveaux de sécrétion de dynorphine. Ici, nous améliorons cette conclusion en affirmant que la distribution de potentiels de membrane au repos observée expérimentalement [90] a une utilité physiologique réelle en diversifiant. C'est cette hétérogénéité des potentiels de repos, et donc du type de comportement des neurones magnocellulaires individuels à l'intérieur de la population qui est responsable de la réponse lisse et continue de la libération d'AVP. Cette réponse lisse et continue est importante puisque la réponse rénale à un changement de vasopressine autour du point d'équilibre est très sensible même pour des changements minimes de concentration.

5.2.3.3 Importance des mécanismes de facilitation de la sécrétion d'AVP et des échecs dans la conduction axonale des potentiels d'action

Une fois la fréquence moyenne de la population validée, il a été possible de prédire la sécrétion de vasopressine puis de prédire la dynamique de la concentration de vasopressine. La simulation a prédit une relation vasopressine/concentration osmotique du plasma qui était cohérente avec l'expérimentation de [91]. De plus, la simulation prédit que le retrait du mécanisme de facilitation a un impact quantitatif supérieur par rapport au retrait du mécanisme d'échec de la propagation des potentiels d'action. En effet, la moyenne du changement absolu de la concentration de vasopressine causé par le retrait temporaire de ces mécanismes de la simulation est respectivement de 2.59 pg/ml et de 0.58 pg/ml. Encore une fois, grâce à la simulation, il a été possible d'isoler l'im-

pact de mécanismes spécifiques et d'étudier leurs effets quantitatifs sur les prédictions de la simulation. Il aurait été très difficile expérimentalement d'étudier l'effet de ces mécanismes sur la concentration de vasopressine et avec la simulation, nous pouvons prédire facilement leur effet.

5.3 Continuité du projet

Dans les prochaines sections, une discussion sur la continuation du projet sera présentée. La première partie aura pour sujet ce qui devra ou pourra être fait pour continuer le projet et la deuxième partie est une réflexion sur la pertinence de continuer le projet.

5.3.1 Objectif 4 : insertion de la simulation créé à l'objectif 3 dans le banc-d'essai créé à l'objectif 1

Pour aller de l'avant, il faudra tout d'abord combiner toutes les simulations pour atteindre ce qui pourrait constituer l'objectif 4 de ce projet. Cette simulation globale combinerait les trois autres simulations et il sera possible, par exemple, de simuler des mécanismes multi-niveaux : comme tester l'effet global d'une drogue affectant un canal ionique des neurones magnocellulaires sur les quantités d'eau et de sodium urinées. Ainsi, on pourra par exemple optimiser la période efficace pour donner une dose de drogue affectant le neurone (niveau bas) selon le rythme circadien (niveau élevé) du rat pour maximiser son effet ou minimiser ses effets secondaires. Pour atteindre cet objectif, il faudra remplacer la boîte qui calcule la concentration de vasopressine dans le banc d'essai par la simulation de la population des neurones magnocellulaires vasopressinergiques et de leur couplage-stimulus sécrétion. Cette étape peut sembler triviale mais ce n'est pas le cas. Il y a plusieurs difficultés à contrecarrer : (1) il faudra trouver des façons d'accélérer le temps de calcul puisque ce sera un obstacle majeur pour rendre la simulation combinée utile et (2) il faudra probablement réajuster (« fine-tuner ») certains des paramètres du modèle. Le temps de calcul sera l'obstacle principal ; la simulation de l'homéostasie hydrominérale (objectif 1) a une résolution graphique d'une minute, mais les variables internes sont mises à jour à une résolution beaucoup plus élevée (résolution gérée par l'intégrateur par défaut de Scicos). Cette haute résolution va poser problème. En effet, quand la boîte noire qui calcule le niveau de vasopressine sera remplacée par la simulation de la population de neurones magnocellulaires vasopressinergiques et par leur couplage-stimulus sécrétion, le temps de calcul augmentera de plusieurs ordres de grandeur. Le calcul de la vasopressine sécrétée en une minute par la

population neuronale prend environs 3h, tandis que pour faire un cycle circadien complet de l'AVP, la simulation de l'homéostasie hydrominérale prend environ 1 minutes. Même en limitant à une minute la résolution des niveaux de vasopressine à 3h de temps réel par minute simulée, une journée complète (1440 minutes) prendra 180 jours à être simulée : ce qui est complètement inacceptable. Il faudra donc que l'implémentation de la simulation de l'objectif 4 soit plus économe en temps de calcul, sinon cette simulation combinée ne sera pas, à toute fin pratique, utilisable pour faire des prédictions. Une solution envisagée pour accélérer les simulations de l'objectif 4 sera d'utiliser la base de données MySQL développée pour l'article 3 (voir section 4.10.1) et ainsi augmenter radicalement la vitesse de calcul de la quantité de vasopressine dans le plasma. Cette méthode nécessitera plus d'espace disque, par contre, les trains de potentiels d'action peuvent être encodés de façon très compacte en enregistrant seulement les positions dans le temps des potentiels d'action. Ainsi, l'espace utilisé sur le disque dur sera minimale et l'accélération sera majeure. Une fois cette méthode implémentée, il sera possible d'ajouter une deuxième couche d'optimisation pour réduire encore plus le temps calcul. En définissant une résolution osmotique maximale dans la base de données (au lieu d'utiliser un continuum de valeurs), il sera possible d'interpoller entre les points stockés de façon à couvrir toute l'étendue des valeurs osmotiques rencontrées dans la simulation de l'homéostasie hydrominérale en faisant un minimum de simulation et en minimisant aussi le nombre de points nécessaires dans la base de données. Par contre, ces méthodes vont être complexifiées par le fait que la concentration de vasopressine est présentement calculée à partir d'un volume fixe de distribution (60 ml) dans la simulation de l'objectif 3. En effet, pour calculer une concentration de vasopressine, une simulation de sa pharmacodynamique est nécessaire et cette simulation requiert le volume de distribution de cette hormone. Pour simplifier les simulations présentées dans l'article 3 et pour minimiser l'impact du volume qui était d'un intérêt secondaire pour les questions que nous nous posons dans cet article, nous avons pris pour acquis que le volume ne changeait pas. Or, une fois combinée avec la simulation de l'homéostasie hydrominérale, la simulation devra utiliser un volume de distribution variable tiré du volume de liquide intra et extracellulaire puisque, comme présenté dans l'article 1, les fluctuations de volume sont intéressantes à étudier au niveau de l'homéostasie hydrominérale du rat. Pour gérer ce volume variable, il y aura deux solutions possibles : stocker la quantité de vasopressine sécrétée dans la base de données et calculer la concentration d'AVP à partir du volume variable à chaque itération (probablement la méthode longue) ou stocker la concentration de vasopressine dans la base de données, mais inclure un nouvel index (le volume) dans la base de données. Bien qu'ajouter un index augmente la taille de la base de données et le temps de recherche, cette méthode serait probablement quand même plus rapide que de calculer la concentration d'AVP en fonction du volume de distribution toutes les minutes.

Un autre défi de l'implémentation de l'objectif 4 est la modulation de la sécrétion de vasopressine par l'hypovolémie. À notre connaissance, il n'y a pas d'article dans la littérature qui explique quantitativement la chaîne de cause à effet liant un changement de volume avec un changement de l'excitation des MCNs. Il faudra éventuellement implémenter ces mécanismes, mais à court terme il serait plus judicieux de simplement garder la modulation de type « black-box » déjà incluse dans la simulation de l'homéostasie hydrominérale (voir méthode de l'article 1) et de l'appliquer sur la concentration d'AVP calculée à partir de la population de neurones. Cette modulation par le volume est toutefois très intéressante et son implémentation pourrait possiblement augmenter l'applicabilité du modèle.

5.3.2 Logiciel et performance

Pour diminuer le temps de calcul des simulations, il serait éventuellement avantageux d'abandonner Scilab et Scicos et de migrer le code des simulations vers un langage plus fondamental et plus rapide comme le C++. En effet, le C++ est plus près du matériel, peut être optimisé plus facilement (par l'utilisateur et par le compilateur) et, étant un langage compilé au lieu d'interprété comme Scilab, est naturellement plus rapide puisque les programmes compilés sont exécutés en langage machine directement au lieu d'être décomposée syntaxiquement (« parsing ») et interprétée pendant l'exécution du programme. De plus, des outils puissants de profillage (« profiling » ; analyse de performance du code) sont disponibles en C++ ce qui peut aider le développeur à améliorer les parties du code les plus exigeantes en temps de calcul. Migrer le code sera une tâche ardue qui nécessitera plusieurs tests et vérifications pour s'assurer qu'il n'y a pas la moindre erreur dans l'implémentation des paramètres essentiels, comme les canaux ioniques des MCNs ou les paramètres de la simulation de l'homéostasie hydrominérale. Une façon de vérifier qu'il n'y a pas de problème d'implémentation pour les MCNs pourrait être la reproduction conforme des figures de l'article de Roper et al.[6], où les courants ioniques sont étudiés individuellement. Cette méthode a été utilisée pour l'implémentation de ces courants en Scilab. Pour l'implémentation de la simulation d'homéostasie hydrominérale en C++, il serait nécessaire de produire les figures de l'article 1. Le temps nécessaire à la migration de la simulation globale de l'homéostasie hydrominérale sera probablement considérable et le gain de vitesse minimal. Par contre, les simulations neuronales pourront probablement être migrées beaucoup plus rapidement et leur gain de vitesse sera aussi plus important que pour l'homéostasie hydrominérale. Les simulations neuronales sont les simulations qui consommeront le plus de temps une fois l'objectif 4 atteint. Ainsi, même si la réduction du temps de calcul après la migration de la simulation de l'homéostasie hydrominérale est mineur, il sera globalement tout de même avantageux de faire la migration vers C++ pour

pouvoir profiter de la réduction maximale du temps de calcul imparti aux simulations neuronales. En plus des fonctions d'intégration numérique des simulations neuronales, l'accès à la base de données MySQL et la parallélisation seront particulièrement accélérées par une migration de Scilab vers C ou C++. Effectivement, comme discuté dans la section 4.10.1 et la section 4.10.2, Scilab n'a pas d'API pour accéder directement à des bases de données MySQL et est difficilement parallélisable, tandis qu'il y a des bibliothèques très performantes en C++ pour faire ces tâches (MySQL++ et MPI++ par exemple). Encore une fois, le passage vers le langage C++ serait donc un avantage, spécialement pendant l'implémentation de l'objectif 4 où l'accès à la base de données devra être performant. Éventuellement, s'il est décidé d'acheter du temps de calcul sur un supercalculateur (ex. CLUMEQ [92]), il ne sera probablement pas possible d'utiliser Scilab, tandis que C++ sera assurément supporté. Il est possible d'exporter une simulation Scicos en code C++, mais le code ainsi obtenu est énorme puisque qu'il est généré automatiquement et il ne serait pas performant en temps de calcul. Il serait donc possible de le faire fonctionner sur un supercalculateur ne supportant pas Scilab, mais ce serait un compromis moins performant.

5.3.2.1 Utilisation d'un autre intégrateur et de pas variables

Pendant la migration vers C++ les simulations pourraient être développées en ayant en tête l'utilisation d'autres intégrateurs numériques ou d'un intégrateur à pas variable. Je rappelle ici que le pas d'intégration est la période de temps entre deux points de la dynamique d'une des variables à intégrer (comme V , le potentiel de membrane) : il s'agit de la résolution temporelle de l'intégration. Il est possible qu'un autre intégrateur puisse être plus performant que ceux testés et utilisés présentement. Par exemple, le logiciel populaire de simulation neuronale nommé « GENESIS »[93] utilise par défaut un intégrateur de type Euler exponentiel[94]. Cet intégrateur est possiblement plus rapide que celui utilisé présentement puisque, dans notre simulation d'un neurone magnocellulaire, plusieurs paramètres ont des dynamiques exponentielles simples (ex : réservoir de calcium, signal de dynorphine ou polarisation causée par les synapses) et qu'un tel intégrateur est optimisé pour de telle dynamique. En plus d'un changement d'intégrateur, il serait avantageux d'utiliser un intégrateur à pas variable. Pour l'instant, le code utilisé n'a pas été pensé pour accommoder facilement ce genre d'intégrateur. Il serait difficile de l'adapter sans changer la majorité du programme. Cependant, pendant la migration vers le langage C++ (voir la section 5.3.2), il serait possible de planifier l'implémentation d'un tel intégrateur. Un intégrateur à pas variable adapte en cours d'intégration la longueur du pas d'intégration. Ainsi, quand une faible résolution est suffisante, le pas est allongé et le temps de calcul est diminué. Quand une haute résolution est requise (ex : simulation d'un potentiel d'action) alors le pas est raccourci

temporairement pour minimiser l'erreur. Pour implémenter un tel algorithme d'ajustement de pas, il faudra trouver un heuristique, c'est à dire une, ou des règles gérant l'augmentation et la diminution des pas, qui sera adapté à nos besoins et qui pourra minimiser le temps de calcul tout en respectant une tolérance à l'erreur prescrite par l'utilisateur. En utilisant un tel intégrateur, la simulation d'un neurone ayant une haute fréquence de décharges de potentiels d'action est beaucoup plus long à calculer qu'un neurone silencieux. Par contre, par rapport à la méthode de pas fixe utilisée présentement, même pour un neurone très actif, le temps de calcul sera réduit. Il pourrait aussi être intéressant d'explorer l'utilisation de méthodes d'intégration utilisant des pas télescopiques[95], car cette méthode a été démontrée comme étant capable d'augmenter les performances d'intégration pour des équations « stiff » semblables à celles utilisées pour modéliser des neurones Hodgkin-Huxley[95].

Les deux dernières améliorations suggérées (intégrateur exponentiel ou intégrateur à pas variable) impliquent que l'on code nous même notre intégrateur en C++. Par contre, dans ce langage, il existe déjà plusieurs bibliothèques offrant des intégrateurs performants et optimisés. Si le code est migré vers C++, il serait profitable d'utiliser ces bibliothèques au lieu de coder nos propres intégrateurs et ainsi d'obtenir du code très performant qui a été optimisé par des spécialistes de ces méthodes numériques.

5.3.2.2 Simulation basée sur une bibliothèque

Une autre piste à explorer pour réduire le temps de calcul pourrait être d'ajouter une couche supplémentaire de base de données. En effet, il a été démontré qu'il est possible d'accélérer d'un ordre de grandeur une simulation de neurone de type Hodgkin-Huxley par l'utilisation d'une base de données qui enregistre et reproduit les potentiels d'action [96] au lieu de les simuler à chaque fois. Cette méthode permet d'utiliser des pas d'intégration beaucoup plus grands, et ainsi de sauver du temps de calcul, puisque les potentiels d'action, la partie de la dynamique qui requiert la plus haute résolution, ne sont pas intégrés mais sont simplement extraits d'une base de données. Cette méthode semble très intéressante, mais les particularités des MCNs vont probablement réduire ou annuler complètement l'augmentation de performance ou compliquer la tâche d'indexation et de présimulation nécessaire pour construire la base de données. En effet, les neurones magnocellulaires simulés implémentent plus de variables qu'un modèle Hodgkin-Huxley standard. Ainsi, au lieu d'avoir une base de données indexées selon seulement V (potentiel de membrane), I (vecteur des courants), m (vecteur des paramètres d'activation des courants) et h (vecteur des paramètres d'inactivation des courants), notre base de données devra inclure aussi les trois réservoirs de calcium et le signal de dynorphine incluant son niveau de fatigue qui est fonction de la fréquence instantanée des potentiels d'action. De plus, les vecteurs I , m et h sont plus longs que

ceux présentés dans l'article de Sun et al. [96], ce qui ajoute encore des possibilités d'index : chacune des variables continues devra être discrétisée et indexée, causant ainsi une croissance très rapide du nombre d'entrées dans la base de données . Il faudra donc envisager que le gain de vitesse de cette méthode (environ quatre fois plus vite dans l'article de Sun et al.) soit complètement perdu dans notre cas particulier, tout dépendant de l'augmentation du temps de recherche dans la base de données et du temps d'accès à l'information qui y est enregistrée.

5.3.3 Améliorations de l'aspect physiologique des modèles présentés

En plus des améliorations techniques, les simulations présentées pourraient être améliorées d'un point de vue physiologique. Une amélioration prioritaire pour le modèle de l'homéostasie hydrominérale devrait être d'ajouter des composantes permettant à la simulation de prédire certains paramètres de l'homéostasie cardiovasculaire : pression sanguine moyenne, pression diastolique et pression systolique. En effet, ces améliorations ouvriraient notre simulation de l'homéostasie hydrominérale au domaine cardiovasculaire et augmenteraient considérablement son utilité et sa visibilité. Inclure des composantes cardiovasculaires dans le modèle impliquerait beaucoup d'ajouts au modèle courant : il faudrait dissocier le compartiment vasculaire du compartiment extracellulaire, car ces deux compartiments sont combinés dans la simulation de l'objectif 1. Ensuite il faudrait implémenter les mécanismes de régulation de ce compartiment (pression osmotique due aux protéines du plasma, échanges alvéolaires, vasoconstriction, etc). Finalement, il faudrait aussi avoir un modèle du coeur qui est assez complexe pour prédire la pression ainsi que de l'aorte puisque les barorécepteurs y sont situés et possiblement de leur centre neuronal situé dans le tronc cérébral. Cette dernière étape risque d'être très complexe et il serait possiblement avantageux de faire un partenariat avec des chercheurs spécialisés sur ce sujet. En plus d'ouvrir le modèle à un plus grand domaine, l'ajout de composantes en lien avec la pression sanguine permettrait d'augmenter la précision et aussi le domaine d'applicabilité des simulations à l'intérieur du sujet de l'homéostasie hydrominérale. La simulation deviendrait plus réaliste en situation d'hypovolémie et, par exemple, la filtration rénale pourrait être ajustée (via le flot glomérulaire) en fonction de la pression sanguine[97]. Il serait aussi intéressant d'améliorer le réalisme de l'implémentation de la sécrétion de l'ANP et de l'ANGII et de leur effet sur les reins. En effet, ces hormones font partie de systèmes complexes mais sont implémentés dans la simulation en seulement quelques équations mathématiques. Il serait intéressant de pousser cette implémentation encore plus loin afin d'améliorer le modèle construit dans cette thèse.

Concernant les simulation des neurones magnocellulaires, une amélioration prioritaire du modèle pourrait être de remplacer les entrées synaptiques aléatoires par des entrées synaptiques ayant une distribution asynchrones comme présentées par Iremonger et Bains [98]. Il serait encore plus intéressant, mais plus long et complexe, de remplacer les entrées synaptiques aléatoires par des simulations des populations de neurones projetant vers le noyau supraoptique comme par exemple les neurones de projection de l'OVLT, du MNPO et du SFO. Un tel modèle pourrait être utile pour simuler des modulations physiologiques ou pharmacologiques de certains courants ioniques des noyaux afférents au MCNs et de voir leurs impacts sur le contrôle de l'activité électrique des neurones magnocellulaires ainsi que sur la balance hydrominérale au niveau de la simulation global de l'objectif 1. Il serait aussi possible d'étudier le réseau qui contrôle l'activité des neurones magnocellulaires et de comprendre l'impact réel de chaque noyau du réseau. Par exemple, il serait possible de simuler l'ablation d'un de ces noyaux et de prédire le comportement altéré du rat (augmentation ou diminution de la prise d'eau et de sel).

5.4 Pertinence de la simulation en physiologie

5.4.1 Productivité liée à la simulation dans le contexte d'étude de cette thèse

Il est difficile d'évaluer quantitativement le « gain scientifique » fait, versus l'effort fourni pour n'importe quel type de recherche. En comparaison avec une expérience en laboratoire bien définie dans le temps, une simulation est encore plus difficile à évaluer puisque les gains scientifiques possibles que l'on peut tirer de la simulation peuvent s'additionner si la même simulation (ou une autre, légèrement modifiée) est réutilisée pour évaluer de nouvelles questions scientifiques. De plus, comme le démarrage d'une simulation et sa validation sont les étapes les plus laborieuses, l'effort mis dans une simulation est plus important au début et devient moindre à mesure que la simulation est réutilisée ou modifiée modérément. En effet, une fois la simulation implémentée et validée, il est plus facile de faire des gains scientifiques (comme des prédictions) en la modifiant légèrement et en étudiant les effets de cette modification, comme par exemple la simulation de l'effet du furosémide sur la balance hydrominérale (objectif 1). La simulation, comme les autres types de méthodes expérimentales correspond donc à un « risque » à prendre qui peut en valoir l'effort ou non. Dans notre cas particulier,

et tout à fait subjectivement, je dirais que la première simulation (de l'homéostasie hydrominérale; objectif 1) n'a pas valu la peine jusqu'à maintenant. Cependant, je changerai peut-être mon avis une fois l'objectif 4 terminé. Au contraire, la simulation des neurones magnocellulaires et la simulation de la population de neurones du SON et du couplage-stimulus sécrétion ont été, toutes les deux, beaucoup plus efficaces en ratio effort/gain. En effet, le travail sur l'homéostasie hydrominérale a été plus difficile puisqu'il a fallu remodeliser et réimplémenter la simulation à plusieurs reprises (voir section 1.3.2 sur les principes de modélisation) pour ajouter ou modifier des composantes du modèle de façon à avoir un modèle simple mais réaliste. L'étape la plus longue de cette partie a été d'explorer la littérature pour trouver des valeurs expérimentales adéquates pour la construction du modèle. À l'inverse, pendant la construction de la simulation des neurones magnocellulaires, la plupart des valeurs nécessaires pour la construction et la validation du modèle étaient concentrées dans les articles de Roper et al. [6, 74], puisque nous réutilisons un modèle déjà existant. De plus, dans les articles de neurones magnocellulaires et de simulation de la population du SON et du couplage stimulus-sécrétion, la simulation a permis d'expliquer et de prédire des phénomènes qui sont, à mon avis, plus intéressants physiologiquement (voir section 5.2 pour la liste des explications et prédictions principales) et donc le gain me paraît plus important. En bref, il est difficile d'évaluer si pour l'instant le gain est équivalent à l'effort fourni, mais ce qui est certain est que si ce projet est continué, les gains vont être plus faciles à obtenir.

5.4.2 Difficulté de maintenance des modèles biologiques

Un problème qui semble persistant au travers des années avec les simulations dans le domaine de l'homéostasie hydrominérale est la difficulté de maintenance : les modèles et les simulations sont créés et après quelques publications sont abandonnés au lieu d'être améliorés itérativement à mesure que les connaissances physiologiques évoluent. Par exemple, les auteurs Toates et Oatley ont produit entre 1970 et 1973 quelques articles de simulation du système digestif d'où nous avons tiré le système digestif de notre simulation de l'homéostasie hydrominérale [99, 100, 101] Par la suite les publications se sont arrêtées, à l'exception d'un court article de Oatley qui suggérait une modification théorique au modèle de 1970 [102]. Leur modèle a été perdu puisqu'à l'époque il nécessitait une palette de caisses de cartes perforées qui a été perdue. De la même façon, les auteurs Wilson, Weitzman et Fisher ont produit un modèle et une simulation très poussés de la distribution et de la dégradation de la vasopressine chez le chien qui étaient basés sur leurs propres données expérimentales [103, 104]. Ces simulations auraient pu être étendues aux humains et aux rats, ce qui aurait été très intéressant. Encore une fois, ils ne publièrent qu'une étude divisée en deux articles (un article d'expérience et

un article de simulation) et les seuls auteurs (selon google scholar) faisant références à leur article de simulation (et non aux expériences les accompagnant) les commentent en disant :

« Unfortunately, this potentially very powerful line of work does not appear to have been continued or taken up by others[105] »

. Il y a plusieurs hypothèses pouvant expliquer cette difficulté de maintenance qui est observée dans la littérature. Par exemple, des causes technologiques (ex : cartes perforées qui ne sont plus utilisables, langage de programmation désuet) peuvent expliquer cette difficulté de maintenance. De plus, il y a des causes liées aux ressources monétaires et humaines. Par exemple, l'expert en simulation quitte le laboratoire ou change de vocation et comme la simulation informatique constitue encore un domaine de transition avec la biologie « classique », l'expertise requise n'est pas forcément facile à trouver. Finalement, il peut aussi y avoir des causes idéologiques, comme la perception que l'effort nécessaire pour construire initialement un modèle et une simulation est plus grand que le gain initial obtenu (voir section 5.4.1). Dû à ces difficultés, même si les améliorations itératives au modèle pourraient être très faciles à faire et pourraient apporter beaucoup à la science, le modèle est abandonné due à l'idée que les simulations n'en valent pas la peine. Certains groupes de recherche essaient cependant de contrecarrer plusieurs de ces difficultés et de démontrer que la simulation informatique présente plusieurs avantages complémentant l'expérimentation. Ils ont fondé, entre autre, le Physiom Project [106]. Ce projet a défini un langage standard pour faire des simulations physiologiques. De cette façon, une simulation fait par un laboratoire peut être aisément combinée dans une autre simulation fait par un autre laboratoire. De plus, il offre la possibilité de placer les simulations en ligne et ainsi d'en augmenter leur visibilité : si un laboratoire ne fait plus avancer une simulation, un autre peut prendre le relais et ainsi diminuer les chances qu'elle soit abandonnée. Nous avons découvert ce projet très tardivement dans le développement de notre modèle et nous n'avons donc pas pu développer notre simulation dans leur langage, ainsi, la maintenance de la simulation de l'homéostasie hydrominérale présentée est possiblement à risque.

Pour les simulations des neurones, la situation semble différente des autres simulations. En effet, ces simulations sont assez simples en général pour être facilement implémentées à partir des équations et des spécifications des articles et ce, peu importe le langage de programmation utilisé. Ainsi, même si un laboratoire arrête un projet de simulation, d'autres peuvent poursuivre aisément. Il y a quand même des groupes, qui, comme le Physiom Project, rassemblent des modèles de neurones dans des bases de données pour les protéger et pour faciliter leur pérennité. Un groupe notable est celui de SenseLab [107].

5.4.3 Difficulté d'obtenir des données expérimentales pour créer les modèles et simulations

Un autre problème avec la modélisation et la simulation est la dépendance vis à vis des données expérimentales. Bien qu'il ne faut pas être obsédé par les données (voir section 1.3.2) ou par le manque de données, un minimum de quantité et de qualité de celles-ci est nécessaire. Il a été difficile tout au long des trois simulations présentées dans cette thèse de trouver des données adéquates en quantité et en qualité. La qualité des données est dépendante de plusieurs éléments : d'abord des paramètres expérimentaux bien contrôlés (ex : la température précise pendant des enregistrements électrophysiologique du SON puisque ce noyau est thermosenseur [108]), des paramètres expérimentaux proches de la réalité physiologique (ex : un milieu d'enregistrement électrophysiologique ayant une osmolalité physiologique), des données expérimentales *in vivo* et *in vitro* cohérentes ainsi que des données qui sont cohérentes d'un laboratoire à un autre, etc. En plus d'avoir des données de qualité, il faut des données ayant une résolution assez élevée pour la simulation (quantité de données). Par exemple, dans l'article 1, il a été difficile d'obtenir des données avec une résolution temporelle adéquate (voir le fichier additionnel 3 de l'article 1 à la section 2.11.3) ou des données avec une résolution en concentration adéquate (concentration d'ANP ou d'aldostérone; voir la méthode de l'article 1 2.4).

De plus, les expériences sont souvent optimisées pour maximiser l'effet d'un mécanisme et pour répondre à une question particulière de l'expérimentateur et, même s'il était facile de récolter d'autres informations intéressantes, ce n'est pas fait, ou du moins, ces données supplémentaires ne sont pas publiées. Il faut donc utiliser des données servant à répondre à une question expérimentale particulière et les normaliser, les filtrer ou les extrapoler pour essayer d'en extraire l'information générale dont on a besoin pour la simulation (par exemple, voir fichier additionnel de l'article 1 et 2).

Il serait aussi possible de faire nous même les expériences nécessaires pour obtenir des informations de qualité en quantité suffisante comme l'on fait Roper et al.2003 [6] ou Wilson et Weitzman [103, 104]. Par contre, en général, le modélisateur n'a pas nécessairement tout le bagage de connaissances requises lui permettant de faire l'expérimentation nécessaire. De plus, les expériences prennent du temps et des ressources. Il faut donc bien planifier les données requises pour faire la simulation et s'assurer qu'elles seront disponibles au moment de l'implémentation. Comme les expériences sont souvent dispendieuses et longues, il n'est pas pratique pour un seul laboratoire de faire toutes les expériences requises pour une simulation. Il faut donc qu'il y ait malgré tout, un certain nombre de données déjà disponibles dans la littérature et que les connaissances

sur l'objet à simuler aient atteint un certain niveau de maturité sinon il devient difficile, voir même impossible, de créer un modèle et une simulation réaliste.

5.4.4 Limitations des simulations

Les simulations présentées ici, ainsi que toutes les simulations biologiques en général, sont basées sur des modèles plus ou moins simplifiés. Il n'est jamais possible d'inclure dans un unique modèle l'ensemble des éléments ayant une influence sur les mécanismes biologiques étudiés. Ainsi, les modèles utilisés dans cette thèse incluent différentes approximations qui limitent l'étendue des conditions physiologiques dans lesquelles ils peuvent faire des prédictions valides. Par exemple, la simulation de l'homéostasie hydrominérale présentée dans le premier article ne donne pas de prédiction valide dans des conditions de privation complète d'eau pendant plus de 24h. En effet, les simulations que nous avons faites dans ces conditions physiologiques sévères divergent de la réalité, car le rat simulé atteint des concentrations de sodium extracellulaire non-physiologiques en moins de 24h. Ce délais est trop court et n'est pas réaliste [109][11]. Ceci est probablement causé par l'absence de certains mécanismes régulateurs mis en oeuvre lors de tel paroxysme. Par exemple, l'approximation que l'eau perdue dans les selles ou par évapotranspiration n'est pas régulée (voir méthode de l'article 1) n'est valide que lors de conditions hydrominérales habituelles. Dans des conditions extrêmes de manque d'eau et d'hyperosmolalité, ces types de perte d'eau sont modulés à la baisse [11] au détriment de l'homéostasie thermique, dans le cas de la sueur. De façon similaire, les simulations des neurones magnocellulaires décrites dans les articles 2 et 3 sont limitées à des conditions osmotiques normales ou à des situations où l'osmolalité et le sodium changent dans un régime physiologique (± 15 mmol). Plusieurs conditions particulières ayant normalement un effet sur la sécrétion de vasopressine ou sur l'activité des neurones magnocellulaires ne peuvent pas être étudiées en utilisant les simulations des articles 2 et 3 sans les modifier. Nous avons répertorié certaines de ces conditions ici :

- L'action des hormones en lien avec l'homéostasie hydrominérale (ex. action de l'ANGII sur la sensibilité osmotique des MSCs [30]). L'effet de ces hormones n'a pas encore été implémenté dans le modèle, mais il s'agit là de la limitation du modèle qui serait la plus facile à implémenter.
- Les communications entre les glies et les neurones du SON[31]. Les récepteurs glycinergique inhibiteurs sensibles à la strychnine n'ont pas été implémentés dans les simulations présentées ici et donc la communication glie-neurone utilisant la taurine ne peut être simulée pour l'instant.
- Les communications entre les organes et le SON passant par le nerf vague (le 10e ième nerf craniens) et ayant un effet sur la quantité de vasopressine sécrétée [110]. Les entrées synaptiques de notre simulation sont aléatoires, et donc il n'est

pas possible d'implémenter une modulation des entrées synaptiques spécifiques au nerf vague.

Il y a possiblement plusieurs autres conditions d'intérêt qui ne peuvent être simulées sans modifier les simulations. Si ce projet continue, il sera possible d'ajouter des éléments aux simulations présentées ici qui pourront augmenter leur réalisme physiologique et ainsi permettre de réduire les limitations des simulations présentées.

5.4.5 Relation avec l'expérimentation

La simulation est loin d'être rendue à un niveau de fiabilité et de complexité où elle peut remplacer les expériences dans son domaine d'applicabilité. De plus, il va toujours falloir qu'il y ait des expériences pour améliorer le modèle et l'étendre. Par contre, même si cela peut sembler contradictoire, il s'agit d'une bonne chose pour le domaine de l'homéostasie hydrominérale et de la vasopressine que les simulations doivent être confirmées par l'expérimentation. En effet, ce domaine est étudié par des groupes restreint de chercheurs, la majorité des études publiées sont des études d'exploration (« data-mining ») et il n'y a que très peu d'études confirmatoires qui répliquent exactement une expérience faite dans un autre laboratoire afin d'essayer d'obtenir les mêmes valeurs expérimentales. Il serait irréaliste, compte tenu des ressources des groupes impliqués, de faire des études confirmatoires pour toutes les affirmations publiées. Par contre, dans le cas des expériences biomédicales, il est souvent statistiquement nécessaire d'avoir une étude exploratoire et une étude confirmatoire pour affirmer la validité d'une hypothèse [111, 112]. Même si une étude exploratoire présente des preuves extrêmement convaincantes (n élevé, p très bas) et a une méthodologie sans faille, elle est sujette à plusieurs phénomènes pouvant générer des faux positifs ou des faux négatifs [111, 112]. Une simulation fiable et bien validée pourrait améliorer la situation en créant des études exploratoires virtuelles générant des hypothèses pouvant être confirmées ou infirmées, augmentant ainsi, ce que les statisticiens Bayésien appellent le « prior » (i.e. la probabilité qu'un fait soit vrai avant l'étude). Ceci pourrait aussi permettre de concentrer l'expérimentation et les ressources pour tester des hypothèses prometteuses générées par la simulation et ainsi optimiser la recherche fait dans ce domaine.

5.5 Conclusion

Ce projet de simulation de l'homéostasie hydrominérale à tous les niveaux d'abstraction étudiés était risqué et aurait pu échouer pour plusieurs raisons qui ont été

détaillées dans cette discussion. Par contre, ces simulations ont permis d'expliquer des phénomènes et d'en prédire d'autres. Elles ont permis de faire des tests quantitatifs sur des mécanismes qui sont difficiles à étudier expérimentalement et ont permis de faire avancer les connaissances sur la physiologie des MCNs, de la vasopressine et des différents compartiments liquidiens de l'organisme. Malgré les difficultés inhérentes aux simulations, je crois que ce projet devrait continuer dans l'avenir. En effet, la partie la plus difficile (l'implémentation initiale) est passée et maintenant il est possible d'améliorer le modèle graduellement en implémentant des parties supplémentaires de façon itérative. Ce serait une perte pour la science si ce projet, comme d'autres simulations du domaine de l'homéostasie hydrominérale l'ont fait par le passé, disparaissait. Même si ces simulations sont loin de pouvoir remplacer l'expérimentation, elles ont beaucoup de potentiel scientifique.

Bibliographie

- [1] CW Bourque. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7) :519–531, Jul 2008.
- [2] JG Verbalis. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice and Research : Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(4) :471–503, Dec 2003.
- [3] LadyofHats. [wiki common](#).
- [4] Synaptitude. [wiki common](#).
- [5] DA Poulain, D Brown, and JB Wakerley. Statistical analysis of patterns of electrical activity in vasopressin and oxytocin-secreting neurones. *Pulsatility in Neuroendocrine System*, 1988.
- [6] P Roper, J Callaway, T Shevchenko, R Teruyama, and W Armstrong. Ahp’s, hap’s and dap’s : how potassium currents regulate the excitability of rat supraoptic neurones. *Journal of Computational Neuroscience*, 15(3) :367–389, 2003.
- [7] E Fermi, J Pasta, and S Ulam. Studies of nonlinear problems. *Los Alamos Scientific Laboratory Report LA-1940*, 5, 1955.
- [8] W Gerstner and WM Kistler. *Spiking Neuron Models*. Cambridge University Press, 2002.
- [9] MN Sawka, LM Burke, ER Eichner, RJ Maughan, SJ Montain, and NS Stachenfeld. American college of sports medicine position stand. exercise and fluid replacement. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 39(2) :377–390, Feb 2007.
- [10] I Rafecas, M Esteve, JA Fernández-López, X Remesar, and M Alemany. Water balance in Zucker obese rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Physiology*, 104(4) :813–8, April 1993.
- [11] SE DICKER and J NUNN. The role of the antidiuretic hormone during water deprivation in rats. *The Journal of Physiology*, 136(2) :235–48, April 1957.
- [12] JT Fitzsimons. The physiology of thirst and sodium appetite. *Monographs of the Physiological Society*, (35) :1–572, 1979.
- [13] KC Berridge, TE Robinson, and JW Aldridge. Dissecting components of reward : ‘liking’, ‘wanting’, and learning. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1) :65–73, February 2009.

- [14] M Leshem. Biobehavior of the human love of salt. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(1) :1–17, January 2009.
- [15] W Martus, D Kim, JL Garvin, and WH Beierwaltes.
- [16] S Patel. Sodium balance—an integrated physiological model and novel approach. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 20(4) :560–569, Jul 2009.
- [17] L Bankir. Antidiuretic action of vasopressin : quantitative aspects and interaction between v1a and v2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*, 51(3) :372–390, Aug 2001.
- [18] WE Segar and WW Moore. The regulation of antidiuretic hormone release in man : I. effects of change in position and ambient temperature on blood adh levels. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(9) :2143–2151, Sep 1968.
- [19] D Terwel, JA ten Haaf, M Markerink, and J Jolles. Changes in plasma vasopressin concentration and plasma osmolality in relation to age and time of day in the male wistar rat. *Acta Endocrinologica*, 126(4) :357, 1992.
- [20] RJ Windle, ML Forsling, and JW Guzek. Daily rhythms in the hormone content of the neurohypophysial system and release of oxytocin and vasopressin in the male rat : effect of constant light. *Journal of Endocrinology*, 133(2) :283–290, May 1992.
- [21] RL Zerbe, DL Henry, and GL Robertson. Vasopressin response to orthostatic hypotension. etiologic and clinical implications. *American Journal of Medicine*, 74(2) :265–271, Feb 1983.
- [22] SM McCann, J Gutkowska, and J Antunes-Rodrigues. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(2) :165–181, Feb 2003.
- [23] A Boussuges, Y Gole, L Mourot, Y Jammes, B Melin, J Regnard, and C Robinet. Haemodynamic changes after prolonged water immersion. *Journal of Sports Science and Medicine*, 27(6) :641–649, Apr 2009.
- [24] JT Fitzsimons. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews*, 78(3) :583–686, Jul 1998.
- [25] CW Bourque. Ionic basis for the intrinsic activation of rat supraoptic neurones by hyperosmotic stimuli. *Journal of Physiology*, 417 :263–277, Oct 1989.
- [26] G Leng and M Ludwig. Neurotransmitters and peptides : whispered secrets and public announcements. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 23) :5625–5632, Dec 2008.
- [27] CH Brown, V Scott, M Ludwig, G Leng, and CW Bourque. Somatodendritic dynorphin release : orchestrating activity patterns of vasopressin neurons. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5) :1236–1242, Nov 2007.

- [28] JB Wakerley, DA Poulain, and D Brown. Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Research*, 148(2) :425–440, June 1978.
- [29] Z Zhang and CW Bourque. Osmometry in osmosensory neurons. *Nature Neuroscience*, 6(10) :1021–1022, 2003.
- [30] Z Zhang and CW Bourque. Amplification of transducer gain by angiotensin II-mediated enhancement of cortical actin density in osmosensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(38) :9536–9544, 2008.
- [31] DL Voisin and CW Bourque. Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends in Neurosciences*, 25(4) :199–205, April 2002.
- [32] R Nissen, B Hu, and LP Renaud. Regulation of spontaneous phasic firing of rat supraoptic vasopressin neurones in vivo by glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, (1995) :415–424, 1995.
- [33] CR Yang, VV Senatorov, and LP Renaud. Organum vasculosum lamina terminalis-evoked postsynaptic responses in rat supraoptic neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, (1994) :59–74, 1994.
- [34] M Grob, G Drolet, and D Mougnot. Specific Na⁺ sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(16) :3974–84, April 2004.
- [35] M Henry, G Drolet, and D Mougnot. Postsynaptic mu-opioid receptor response in the median preoptic nucleus is altered by a systemic sodium challenge in rats. *European Journal of Neuroscience*, 27(5) :1197–1209, Mar 2008.
- [36] K Ono, E Honda, and K Inenaga. Angiotensin ii induces inward currents in subfornical organ neurones of rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(6) :517–523, Jun 2001.
- [37] S Ciura and CW Bourque. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *Journal of Neuroscience*, 26(35) :9069–9075, Aug 2006.
- [38] CH Brown, M Ruan, V Scott, VA Tobin, and M Ludwig. Multi-factorial somatodendritic regulation of phasic spike discharge in vasopressin neurons. *Progress in Brain Research*, 170 :219–228, 2008.
- [39] Office quebecois de la langue francaise. <http://www.granddictionnaire.com>.
- [40] M Pidd. Five simple principle of modelling. In *Proceedings of the 28th conference on Winter simulation*, pages 721–728. IEEE Computer Society, 1996.
- [41] A Korzybski. A non-aristotelian system and its necessity for rigour in mathematics and physics. *Science and Sanity*, 1 :747–761, 1933.

- [42] RG Kalb. Regulation of motor neuron dendrite growth by nmda receptor activation. *Development*, 120(11) :3063–3071, 1994.
- [43] L Squire, FE. Bloom, NC. Spitzer, L R. Squire, D Berg, S du Lac, and A Ghosh. *Neuroscience Textbook Set : Fundamental Neuroscience, Third Edition (Squire, Fundamental Neuroscience)*. Academic Press, 2008.
- [44] M London and M Hausser. Dendritic computation. *Annual Review of Neuroscience*, 28 :503–532, 2005.
- [45] RE Dyball, R Grossmann, G Leng, and K Shibuki. Spike propagation and conduction failure in the rat neural lobe. *The Journal of Physiology*, 401 :241–56, July 1988.
- [46] JJ Nordmann and EL Stuenkel. Electrical properties of axons and neurohypophysial nerve terminals and their relationship to secretion in the rat. *The Journal of Physiology*, 380 :521–39, November 1986.
- [47] CE Carr. Delay line models of sound localization in the barn owl. *Integrative and Comparative Biology*, 33(1) :79, 1993.
- [48] RJ Bicknell. Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *The Journal of Experimental Biology*, 139 :51–65, September 1988.
- [49] G Leng, K Shibuki, and SA Way. Effects of raised extracellular potassium on the excitability of, and hormone release from, the isolated rat neurohypophysis. *The Journal of Physiology*, 399 :591–605, May 1988.
- [50] EL Stuenkel and JJ Nordmann. Intracellular calcium and vasopressin release of rat isolated neurohypophysial nerve endings. *The Journal of Physiology*, 468 :335–55, August 1993.
- [51] HP Hobbach, S Hurth, D Jost, and K Racké. Effects of tetraethylammonium ions on frequency-dependent vasopressin release from the rat neurohypophysis. *The Journal of Physiology*, 397 :539–54, March 1988.
- [52] SI Ortiz-Miranda, G Dayanithi, V Coccia, EE Custer, S Alphantery, E Mazuc, S Treistman, and JR Lemos. μ -Opioid receptor modulates peptide release from rat neurohypophysial terminals by inhibiting $\text{Ca}(2+)$ influx. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(9) :888–94, September 2003.
- [53] AL Hodgkin and AF Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117(4) :500, 1952.
- [54] W. Rall. Branching dendritic trees and motoneuron membrane resistivity. *Experimental Neurology*, 1(5) :491–527, 1959.
- [55] AO Komendantov, N Trayanova, and JG Tasker. Somato-dendritic mechanisms underlying the electrophysiological properties of hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells : a multicompartmental model study. *Journal of Computational Neuroscience*, 23(2) :143–68, October 2007.

- [56] P Cobbett and W T Mason. Whole cell voltage clamp recordings from cultured neurons of the supraoptic area of neonatal rat hypothalamus. *Brain Research*, 409(1) :175–80, April 1987.
- [57] M Tanaka, T R Cummins, K Ishikawa, J A Black, Y Ibata, and S G Waxman. Molecular and functional remodeling of electrogenic membrane of hypothalamic neurons in response to changes in their input. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3) :1088–93, February 1999.
- [58] P Cobbett, P Legendre, and W T Mason. Characterization of three types of potassium current in cultured neurons of rat supraoptic nucleus area. *The Journal of Physiology*, 410 :443–62, March 1989.
- [59] J A Luther and J G Tasker. Voltage-gated currents distinguish parvocellular from magnocellular neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *The Journal of Physiology*, 523 Pt 1 :193–209, February 2000.
- [60] CW Bourque. Transient calcium-dependent potassium current in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 397 :331–47, March 1988.
- [61] T Nagatomo, K Inenaga, and H Yamashita. Transient outward current in adult rat supraoptic neurones with slice patch-clamp technique : inhibition by angiotensin II. *The Journal of Physiology*, 485 (Pt 1 :87–96, May 1995.
- [62] R D Andrew and F E Dudek. Analysis of intracellularly recorded phasic bursting by mammalian neuroendocrine cells. *Journal of Neurophysiology*, 51(3) :552–66, March 1984.
- [63] CW Bourque, JC Randle, and LP Renaud. Calcium-dependent potassium conductance in rat supraoptic nucleus neurosecretory neurons. *Journal of Neurophysiology*, 54(6) :1375–82, December 1985.
- [64] K Kirkpatrick and CW Bourque. Activity dependence and functional role of the apamin-sensitive K⁺ current in rat supraoptic neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 494 (Pt 2 :389–98, July 1996.
- [65] CW Bourque and DA Brown. Apamin and d-tubocurarine block the afterhyperpolarization of rat supraoptic neurosecretory neurons. *Neuroscience letters*, 82(2) :185–90, November 1987.
- [66] K Kirkpatrick and CW Bourque. Effects of neurotensin on rat supraoptic nucleus neurones in vitro. *The Journal of Physiology*, 482 (Pt 2 :373–81, January 1995.
- [67] AM Dopico, H Widmer, G Wang, JR Lemos, and SN Treistman. Rat supraoptic magnocellular neurones show distinct large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel subtypes in cell bodies versus nerve endings. *The Journal of Physiology*, 519 Pt 1 :101–14, August 1999.

- [68] RC Foehring and WE Armstrong. Pharmacological dissection of high-voltage-activated Ca^{2+} current types in acutely dissociated rat supraoptic magnocellular neurons. *Journal of Neurophysiology*, 76(2) :977–83, August 1996.
- [69] N Joux, V Chevalleyre, G Alonso, L Boissin-Agasse, F C Moos, M G Desarménien, and N Hussy. High voltage-activated Ca^{2+} currents in rat supraoptic neurones : biophysical properties and expression of the various channel α 1 subunits. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(7) :638–49, July 2001.
- [70] TE Fisher and CW Bourque. Voltage-gated calcium currents in the magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 486 (Pt 3 :571–80, August 1995.
- [71] M Ghamari-Langroudi and CW Bourque. Flufenamic acid blocks depolarizing afterpotentials and phasic firing in rat supraoptic neurones. *The Journal of Physiology*, 545(Pt 2) :537–42, December 2002.
- [72] J Han, C Gnatenco, CD Sladek, and D Kim. Background and tandem-pore potassium channels in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *The Journal of Physiology*, 546(Pt 3) :625–39, February 2003.
- [73] Z Li and GI Hatton. Ca^{2+} release from internal stores : role in generating depolarizing after-potentials in rat supraoptic neurones. *The Journal of Physiology*, 498 (Pt 2 :339–50, January 1997.
- [74] P Roper, J Callaway, and W Armstrong. Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus : a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study. *The Journal of Neuroscience*, 24(20) :4818–4831, May 2004.
- [75] CH Brown, G Leng, M Ludwig, and CW Bourque. Endogenous activation of supraoptic nucleus kappa-opioid receptors terminates spontaneous phasic bursts in rat magnocellular neurosecretory cells. *Journal of Neurophysiology*, 95(5) :3235–44, May 2006.
- [76] SH Oliet and CW Bourque. Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *American Journal of Physiology*, pages 1475–1479, 1993.
- [77] SHR Oliet and CW Bourque. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature Publishing Group*, 364, 1993.
- [78] G Leng, CH Brown, PM Bull, D Brown, S Scullion, J Currie, RE Blackburn-Munro, J Feng, T Onaka, JG Verbalis, J A Russell, and M Ludwig. Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input : an experimental and theoretical analysis. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(17) :6967–77, September 2001.

- [79] N Sabatier, CH Brown, M Ludwig, and G Leng. Phasic spike patterning in rat supraoptic neurones in vivo and in vitro. *The Journal of Physiology*, pages 161–180, 2004.
- [80] MB Gutman, J Ciriello, and GJ Mogenson. Effects of plasma angiotensin ii and hypernatremia on subfornical organ neurons. *American Journal of Physiology*, 254(5 Pt 2) :R746–R754, May 1988.
- [81] BS Huang, S Ahmadi, M Ahmad, RA White, and FHH Leenen. Central neuronal activation and pressor responses induced by circulating ang ii : role of the brain aldosterone-”ouabain” pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(2) :H422–H430, Aug 2010.
- [82] TG Granda, A Velasco, and A Rausch. Variations and interrelation between vasopressin and plasma osmolality in diabetic rats with insulin treatment. *Life Sciences*, 63(15) :1305–1313, 1998.
- [83] MJ Brimble and REJ Dyball. Characterization of the responses of oxytocin-and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *The Journal of Physiology*, pages 253–271, 1977.
- [84] MJ Brimble, REJ Dyball, and Mary L Forsling. Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. *The Journal of Physiology*, (1978) :69–78, 1978.
- [85] CH Brown, PM Bull, and CW Bourque. Phasic bursts in rat magnocellular neurosecretory cells are not intrinsically regenerative in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 19 :2977–2983, 2004.
- [86] RD Andrew. Endogenous bursting by rat supraoptic neuroendocrine cells is calcium dependent. *The Journal of Physiology*, pages 451–465, 1987.
- [87] GI Hatton. Phasic bursting activity of rat paraventricular neurones in the absence of synaptic transmission. *The Journal of Physiology*, 327(1) :273, 1982.
- [88] VB Scott, R Valerie, G Leng, and CH Brown. Dehydration-induced modulation of κ -opioid inhibition of vasopressin neurone activity. *The Journal of Physiology*, pages 5679–5689, 2009.
- [89] CW Bourque. *Osmoregulation of vasopressin neurons : a synergy of intrinsic and synaptic processes.*, volume 119. 1998.
- [90] WT Mason. Electrical properties of neurons recorded from the rat supraoptic nucleus in vitro. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 217(1207) :141–61, January 1983.
- [91] RS Weisinger, P Burns, LW Eddie, and EM. Relaxin alters the plasma osmolality-arginine vasopressin relationship in the rat. *Journal of Endocrinology*, 137 :505–510, 1993.

- [92] <https://www.clumeq.mcgill.ca/>.
- [93] <http://www.genesis-sim.org/>.
- [94] E De Schutter and D Beeman. Speeding Up GENESIS Simulations.
- [95] C Gear. Telescopic projective methods for parabolic differential equations. *Journal of Computational Physics*, 187(1) :95–109, May 2003.
- [96] Y Sun, D Zhou, AV Rangan, and D Cai. Library-based numerical reduction of the Hodgkin-Huxley neuron for network simulation. *Journal of Computational Neuroscience*, 27(3) :369–90, December 2009.
- [97] JL Sondeen, GA Gonzaludo, JA Loveday, GE Deshon, CB Clifford, MM Hunt, WG Rodkey, and CE Wade. Renal responses to graded hemorrhage in conscious pig. *The American Journal of Physiology*, 259(1 Pt 2) :R119–25, July 1990.
- [98] KJ Iremonger and JS Bains. Integration of asynchronously released quanta prolongs the postsynaptic spike window. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(25) :6684–91, June 2007.
- [99] FM Toates and K Oatley. Computer simulation of thirst and water balance. *Medical & Biological Engineering*, 8(1) :71–87, January 1970.
- [100] K Oatley and FM Toates. Frequency analysis of the thirst control system. *Nature*, 232(5312) :562–4, August 1971.
- [101] K Oatley and FM Toates. Osmotic inhibition of eating as a subtractive process. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 82(2) :268–77, February 1973.
- [102] K Oatley. Control of water-excretion by antidiuretic hormone : some aspects of modelling the system. *Medical & Biological engineering & Computing*, 15(6) :579–88, November 1977.
- [103] KC Wilson, RE Weitzman, and A Fisher. Arginine vasopressin metabolism in dogs. II. Modeling and system analysis. *American Physiological Society*, 1978.
- [104] RE Weitzman and DA Fisher. Arginine vasopressin metabolism in dogs. I. Evidence for a receptor-mediated mechanism. *American Physiological Society*, 1978.
- [105] P Bie, JL Andersen, and LJ Andersen. *Degradation of neurohypophysial peptides*, pages 201–219. 1991.
- [106] NSR. <http://www.physiome.org/>.
- [107] SenseLab. <http://senselab.med.yale.edu/>.
- [108] JR Sudbury, S Ciura, R Sharif-Naeini, and CW Bourque. Osmotic and thermal control of magnocellular neurosecretory neurons - role of an N-terminal variant of trpv1. *The European Journal of Neuroscience*, 32(12) :2022–30, December 2010.

- [109] TE Bridges and NV James. The Hypothalamo-Neurohypophysial System of Native Australian Desert Rodents the Vasopressin and Oxytocin Contents of Hypothalamus and Posterior Pituitary of *Notomys Alexis* and *Pseudomys Australis* Compared with those of the Laboratory Rat and Mouse in DIF. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 60(3) :265–283, June 1982.
- [110] Y Xiong, R Liu, Y Xu, L Duan, R Cao, L Tu, Z Li, G Zhao, and Z Rao. Effects of vagotomy, splanchnic nerve lesion, and fluorocitrate on the transmission of acute hyperosmotic stress signals to the supraoptic nucleus. *Journal of Neuroscience Research*, 89(2) :256–66, February 2011.
- [111] EJ Wagenmakers, R Wetzels, and D Borsboom. Why Psychologists Must Change the Way They Analyze Their Data : The Case of Psi. *inpress, Journal of Personality and Social Psychology*, <http://dl.dropbox.com/u/1018886/Bem6.pdf>.
- [112] JPA Ioannidis. Why most published research findings are false. *NEONATAL INTENSIVE CARE*, 19(3) :42, 2006.

Chapitre 6

Annexes

6.1 Version finale du premier article publié

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis

Louis Nadeau, Danielle Arbour, Didier Mougnot*

Abstract

Background: In mammals, vasopressin (AVP) is released from magnocellular neurons of the hypothalamus when osmotic pressure exceeds a fixed set-point. AVP participates to the hydromineral homeostasis (HH) by controlling water excretion at the level of the kidneys. Our current understanding of the HH and AVP secretion is the result of a vast amount of data collected over the five past decades. This experimental data was collected using a number of systems under different conditions, giving a fragmented view of the components involved in HH.

Results: Here, we present a high-level model of the rat HH based on selected published results to predict short-term (hours) to long-term (days) variation of six major homeostatic parameters: (1) the extracellular sodium concentration, (2) the AVP concentration, (3) the intracellular volume, (4) the extracellular volume, (5) the urine volume and (6) the water intake. The simulation generates quantitative predictions like the daily mean of the extracellular sodium concentration (142.2 mmol/L), the AVP concentration, (1.7 pg/ml), the intracellular volume (45.3 ml/100 g body weight - bw), the extracellular volume (22.6 ml/100 g bw), the urine volume (11.8 ml/100 g bw) and the cumulative water intake (18 ml/100 g bw). The simulation also computes the dynamics of all these parameters with a high temporal resolution of one minute. This high resolution predicts the circadian fluctuation of the AVP secretion (5 ± 2 pg/ml) and defines the limits of a restoration and a maintenance phase in the HH (2.1 pg/ml). Moreover, the simulation can predict the action of pharmacological compounds that disrupt the HH. As an example, we tested the action of a diuretic (furosemide) combined with a sodium deficient diet to generate quantitative prediction on the extracellular sodium concentration (134 mmol/L) and the need-induced water intake (20.3 ml/100 g bw). These simulated data are compatible with experimental data (136 ± 3 mmol/L and 17.5 ± 3.5 ml/100 g bw, respectively).

Conclusion: The quantitative agreement of the predictions with published experimental data indicates that our simplified model of the HH integrates most of the essential systems to predict realistic physiological values and dynamics under a set of normal and perturbed hydromineral conditions.

Background

Body water is distributed between the intracellular fluid (ICF) and the extracellular fluid (ECF) compartments (interstitial tissue, vascular space), whose volume depends on the osmotic pressure exerted by their electrolyte composition. Due to the selective permeability of biological membranes, sodium (Na^+) and accompanying anions are mostly restricted to the ECF compartment, while potassium (K^+) is confined to the

ICF compartment. Therefore, these two ions are the effective electrolytes creating the osmotic pressure and affecting the movement of water between the two body water compartments. In mammals, the maintenance of osmotic pressure is crucial for the integrity of the cells and organs and small variations from a stable set-point trigger compensatory responses to restore the body fluid osmolality. These homeostatic responses mainly control the retention of water and Na^+ at the level of the kidneys [1,2], as well as fluid and Na^+ ingestive behaviors [3]. For instance, plasma hyperosmolality triggers rapid homeostatic responses like vasopressin (AVP) secretion,

* Correspondence: didier.mougnot@neurosciences.ulaval.ca
Centre de recherche du CHUQ (CHUL), Neurosciences and Université Laval,
Québec, G1V 4G2, Canada

an increased rate of natriuresis and the sensation of thirst [4-7].

The simultaneous quantification of the ECF osmolality and resulting homeostatic responses at a high temporal resolution would be difficult to measure and study experimentally and one approach would be to design a realistic computational model aimed at simulating the dynamics of the biological parameters under study. This model does not have to be necessarily as complex as the biological function it simulates [8]. However, it should include the essential measurable inputs and outputs and connect them in a manner that carries out the processing that occurs, here the secretion of AVP and the adjustment of the ECF osmolality. In this line, the present model of the hydromineral homeostasis is organized around three distinct systems that define the scope of the simulation: (1) The current state of the ICF and ECF compartment in terms of ion composition and volume; (2) The input/output to the body fluid compartments in terms of regulated and unregulated water and Na^+ intake or loss, respectively and (3) The controllers that specifically regulate water and Na^+ excretion at the level of the kidneys. Note that some of the biological parameters that characterize each of the systems rely on necessary assumptions that are presented in the methods (see the model architecture).

The modeling principle is based on the use of “high-level” functions, i.e., a black-box approach to model the components of each system. Such a modeling approach uses necessary simplifications of the model and does not therefore implement all the complex cascade of hormones and/or cellular mechanisms underlying the output of the black boxes. For instance, the model includes the “aldosterone (ALD) controller” and the “atrial natriuretic peptides (ANPs) controller”, which add to the model the capacity to respond to a certain degree of hypovolemia and hypervolemia, respectively by modulating Na^+ excretion. The secretion of ALD and ANPs is multifactorial and depends on the action of other hormones like angiotensin II and oxytocin [9]. However, considering the experimental data on ALD and ANPs will indirectly include the regulatory action of angiotensin II and oxytocin in this high-level model without a direct implementation of the regulatory action of these hormones in the model. Moreover, the experimental data on ALD, ANPs and AVP introduce in the model the relationship that links the secretion of these hormones to the ECF volume without the need of implementing a complex system of blood pressure control.

The purpose of the present study was to develop a computational simulation of the dynamics of the ECF osmolality and vasopressin release under stable hydro-mineral condition, as well as during osmotic challenges.

Methods

Biological parameters

The present model will specifically be developed for rats since this animal species has historically provided much of the data in the field of the hydromineral homeostasis.

All of the initial values for the biological parameters used in the simulation were compiled from published experimental data and are presented in Table 1. Biological parameters are tightly correlated with the animal's weight. However, a simple linear scaling of the parameters extracted from the literature may be biased by physiopathological condition of the animals under study. For example, obese rats have an expanded skin surface compared to lean rats, a condition that directly affects the amount of water lost by evaporation. In the same line, the amount of metabolic water resulting from the ingested food in obese rats is larger than in lean rats [10]. Therefore, to minimize the introduction of conversion error in the model, the rat's weight was fixed at 255 g, a value that is well within the range of weights reported in the experimental studies referenced. Moreover, data were selected from studies using rats in the same age range because aging directly affects the water balance of rats [11].

Software

The simulation is performed using Scicos, a dynamical system simulator included in the Scilab software <http://www.scilab.org>. Scilab is an open source software that is equivalent to Matlab, the leading software in scientific computing (MathWorks - <http://www.mathworks.com>). Scicos has a graphical user interface (GUI) that is particularly useful for our task of modeling a complex system and the flexibility of the software allows easy substitution of a standard box by a function coded in a different programming language (Fortran or C). The simulation has a time resolution of one minute implying that time-dependent parameters are updated every minute according to the current state.

The model architecture

The “high-level” simulation is organized around three functional systems: (1) the current state of the body fluid compartments, (2) the controllers specifically acting at the level of the kidneys and (3) the inputs/outputs of the body fluid compartments. For the implementation of the model in the computer simulation, each system is represented by one or several black boxes, called meta-boxes. The system “current state of the body fluid compartments” is composed of one meta-box called “body fluids”. The system “inputs/outputs of the body fluid compartments” is composed of four meta-boxes called “kidney”, “digestive system”, “unregulated water balance” and

Table 1 List of the parameters and their physiological value used in the simulation

Parameters	Symbols	Initial values	Physiological values and references
ICF potassium concentration	$[K^+]_{ICF}$	112 mmol/L	112 [12]
AVP concentration	$[AVP]$ (t = 0)	1 pg/ml*	≈ 1 [19]; 1.05 ± 0.4 [11]; 1.7 ± 0.3 [23]; 1.9 ± 1.1 [46]
ECF Na^+ concentration	$[Na^+]_{ECF}$ (t = 0)	140 mmol/L*	≈ 135 [17]; 138 ± 2.6 [22]; 143.3 ± 0.4 [37]; 145.6 ± 1.2 [23]; $146 \pm .8$ [47]
ECF volume	ECF_V (t = 0)	23 ml	23 [12]
ICF volume	ICF_V (t = 0)	46 ml	46 [12]
Rat weight	W	255 g*	150-250 [20]; 210-230 [23]; 245 ± 5 [24]; 250-280 [47]; 250-325 [48]; 262 ± 15 [22]
Sodium clearance	C_{Na^+}	0.0086 ml/min	See Additional file 2[21-24]

The values identified with a star (*) were defined by fine-tuning the simulation within the range of the data reported in the literature. (t = 0) indicates the initial set of the parameter to start the simulation. The value of all these time-dependent parameters is updated every minute during the simulation.

“hydromineral challenges”. Finally, the system “controllers” is composed of one meta-box called “AVP secreting magnocellular neurons” and additional corrections for active natriuresis and/or Na^+ retention. In addition, the simulation includes a timing generator (red clock) and two boxes that summate the sodium changes and the water changes, respectively. Figure 1 illustrates a screenshot of Scicos’ main window, displaying the architecture of the simulation described above. The content of all the meta-boxes are detailed in the following sections

System 1; the meta-box “body fluids”

The body fluids are distributed between the ICF and the ECF compartments. The solute composition of each

compartment differs considerably: Na^+ is the major cation in the ECF, whereas K^+ is dominant in the ICF. In the present simulation we simplified the ECF compartment by merging together the vascular space and the interstitial fluid because the time course describing Na^+ exchange between these two distinct spaces is below one minute [12], the time resolution of the simulation. The ICF K^+ concentration ($[K^+]$) is set as a non-variable parameter in the simulation [12]. This assumption was initially chosen because the large volume of the ICF compartment prevents dramatic changes in the $[K^+]$. In addition, regulation of $[K^+]$ was considered less critical for the integrity of the organism than regulation

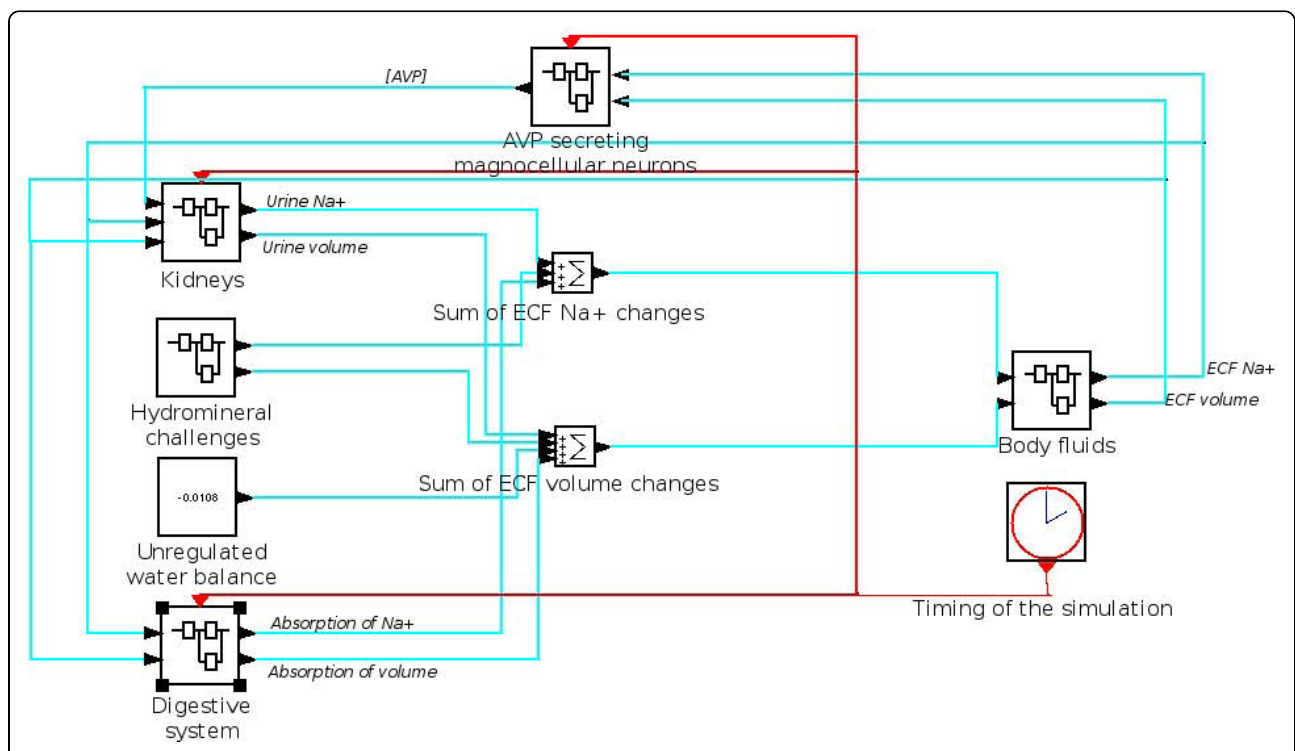


Figure 1 Screenshot of the Scicos’ simulation software displaying the architecture of the simulation. Each meta-box represents a component of the system. Blue arrows indicate the direction flow of the physiological parameters during the simulation. Red arrows carry the time signal of the simulation (1 min).

of $[Na^+]$ [6]. Therefore, time-dependent changes in ICF volume in the simulation result from water movement driven by changes in ECF $[Na^+]$.

The ECF $[Na^+]$ was preferred over the ECF osmotic pressure because osmotic pressure depends on additional parameters including the level of sugars, proteins and urea. However, a correction was included in the simulation to account for the osmotic weight of these parameters (see next section).

Altogether, the body-fluid compartments are simulated by a meta-box that dynamically integrates three biological parameters: (1) the ECF volume, (2) the ECF $[Na^+]$ and (3) the ICF volume. The physiological set-point of these parameters is indicated in Table 1.

System 2; the meta-box "AVP secreting magnocellular neurons"

This meta-box is the main controller of the simulation. It simulates the regulation of AVP concentration in the plasma and it contains three items: (1) a mathematical equation adjusting the AVP concentration as a function of the ECF osmolality, (2) a time-dependent degradation of AVP and (3) a circadian modulation of AVP secretion.

(1) The mathematical equation was created using experimental measurement from Dunn et al., 1973. In this paper and other reports, it is shown that the AVP level is a linear function of the plasma osmolality and an exponential function of the volume [13-16]. In addition, a correction was included in the equation to reflect the volume-dependent change in the slope of AVP secretion reported in the experimental data. Using a linear regression based on Figure six of Dunn et al. (1973), the correction term of the slope was set at 11. The ECF $[Na^+]$ in the equation was also corrected for the contribution of sugar, proteins and urea to plasma osmolality according to the approximation stated in Verbalis, 2003, but using the values for the rat (14 mosmol/L) [17]. The resulting AVP level is calculated using the following equation:

$$[AVP(t)] = \left(0.91 - \frac{11 \cdot ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)}\right) \cdot (200 \cdot ([Na^+]_{ECF}(t) - 0.1375)) + 1.3 \cdot e^{-\frac{17 \cdot ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)}} \quad (1)$$

All symbols are defined in Table 1. The Delta (Δ) symbol denotes the difference between the current state in the simulation and the initial state defined in Table 1. All the numerical values are based on the fits of the experimental data reported in Dunn et al. (1973). Since a negative value for hormone secretion is meaningless, we avoid non-physiological values by allowing "ECF $_{\Delta V}$ (t)" to be strictly negative (or zero) in the equation and

by forcing AVP level to be positive (or zero). Note that the change in AVP secretion caused by osmotic fluctuation is larger than the change caused by volume fluctuation (see Additional file 1).

(2) A time-dependent degradation of AVP was added to the model so that 15% of circulating AVP is cleared every minute when AVP secretion is reduced [18] (see discussion).

(3) A circadian pattern of AVP secretion is also included in the model. This implementation was derived from data presented in Figure one of Graugaard-Jensen et al. (2006). Thus, the total AVP concentration is linearly reduced at a speed of 5%/h starting at 2 AM to reach a maximum of 30% reduction at 8 AM. Then, the negative modulation of AVP secretion is progressively inactivated from 8 AM to 11 AM before being controlled by the current state of the ECF $[Na^+]$ (see discussion).

System 3; the meta-box "Kidney"

This meta-box is designed to dynamically simulate the rate of urine flow and the rate of Na^+ excretion by the kidneys (passive Na^+ clearance and active natriuresis or Na^+ retention).

The rate of urine flow is calculated every minute in the simulation. The calculation is adapted from an equation that expresses the rate of urine flow as a function of AVP in humans [6]. Here, the basal AVP level was linearly rescaled from 1 pg/ml (mean basal level in Humans [19]) to 2.3 pg/ml (mean basal level in rats [20]). The rate of urine flow was also scaled so that the flow caused by 2.3 pg/ml of AVP corresponds to 6 μ l/min/100 g of body weight (bw). This value corresponds to the normal rate of urine flow in the rat [17]. The maximum rate of urine flow, in the absence of AVP, was fixed at 138 μ l/min/100 g bw that corresponds to 80 ml/day/100 g bw [19].

The value of Na^+ clearance used in the model (table 1) was calculated from experimental data reported in four distinct studies [21-24] and calculations are presented in Additional file 2. Na^+ clearance combined with the action of the AVP controller are however, not sufficient to overcome the small variations in ECF volume resulting from the change in ECF osmolality (data not shown). We thus, implement two additional controllers in the model to introduce a volume-dependent change in Na^+ excretion (active natriuresis) or in Na^+ retention. These active controllers will be referred to as the atrial natriuretic peptides (ANP) factor and as the aldosterone (ALD) factor, respectively. ANP_{factor} is a multiplicative factor (≥ 1) on Na^+ excretion that accounts for an increase in ECF volume over the volume set-point (table 1). ALD_{factor} is a multiplicative factor (≤ 1) on Na^+ excretion that accounts for a decrease in ECF volume below the volume set-point.

The rate of Na^+ excretion is calculated every minute with the following equation:

$$\text{Na}_{\text{urine}}^+ = \left[\text{Na}_{\text{ECF}}^+ \right] \cdot C_{\text{Na}^+} \cdot \text{ALD}_{\text{factor}} \cdot \text{ANP}_{\text{factor}} \quad (2)$$

$\text{Na}_{\text{urine}}^+$ refers to the millimoles of Na^+ excreted during the current minute of the simulation. $[\text{Na}_{\text{ECF}}^+]$ is the ECF $[\text{Na}^+]$ one minute before the current minute. C_{Na^+} is the Na^+ clearance defined in Table 1.

$\text{ANP}_{\text{factor}}$ was calculated from Paul et al. (1988) in two separated steps: (1) The plasma ANP concentration was first computed as a function of the expansion of the plasma volume (from Figure four in Paul et al., 1988) and a linear interpolation was added between the experimental values. The maximum ANP level was set to 2000 pg/ml (the upper limit appearing in Figure four of Paul et al., 1988) to prevent a non-linear error in case of large volume changes. (2) The increase (in percent) in natriuresis was associated with the plasma ANP concentration (from Figure five in Paul et al., 1988) and this percentage is used as the $\text{ANP}_{\text{factor}}$.

$\text{ALD}_{\text{factor}}$ was based from two studies [25,26]. Figure oneB of Stricker et al. (1979) was first adapted to express the aldosterone concentration as a function of the ECF volume instead of the plasma volume. The study of Morris et al. (1973) was then adapted to compute $\text{ALD}_{\text{factor}}$ as a function of the aldosterone concentration. Here the dose of aldosterone (μg) was converted to aldosterone concentration by dividing the dose by the volume of plasma. Moreover, a linear interpolation including an $\text{ALD}_{\text{factor}}$ with an upper limit of 1 (for aldosterone concentration of 0 ng/100 ml) and a lower limit of 0.2 (for aldosterone concentration of 200 ng/100 ml) was introduced to the conversion of the experimental data.

System 3; the meta-box "Digestive system"

This meta-box is created to simulate water and Na^+ intake. It contains a digestive module and a motivation module making this meta-box the most complex of the model. The "digestive module" simulates the transition of orally ingested water from the stomach to the intestine and its final absorption in the ECF. This module reproduces the intestine and stomach modules generated by Toates et al. (1970), which was based on experimental data from two studies [27,28]. Our model includes the same time constants for (1) the active and passive exchange of water and Na^+ between the stomach, intestine and ECF, and (2) the emptying of water content from the stomach to the intestine.

The motivation module takes the decision of drinking distilled water or Na^+ -containing water. These decisions are based on two simple rules that are sufficient to reproduce realistic behavior.

Rule 1: If ECF $[\text{Na}^+]$ exceeds the pre-established set-point by a threshold of 4% [5,29], the motivation module allows intake of distilled water until the ECF $[\text{Na}^+]$ is restored, or until the stomach is full (volume of 5 ml). In the latter case, water intake stops until the stomach volume is reduced to a comfortable level (3.1 ml) by emptying water into the intestines and by passive diffusion to the ECF.

Rule 2: If ECF $[\text{Na}^+]$ is normal (142 mmol/L) or slightly lower, the motivation module allows intake of Na^+ -containing water (50 mmol/L or 0.28% of Na^+) to model unregulated drinking [30]. In the simulation, unregulated drinking is triggered randomly following a statistical distribution, which is a translated sinusoidal to account for the circadian modulation of fluid and electrolyte intake.

There is no access to dry food in the model and the introduction of Na^+ -containing water compensates for the lack of this essential source of Na^+ . The amount of Na^+ contained in the water is adjusted to approximately match the daily amount of Na^+ ingested by a rat of 255 g fed with regular pellets (0.3% Na^+). Instead of randomly injecting Na^+ in the model, the sodium input is associated with water input since in reality the feeding and drinking period are associated in rat.

System 3; the box "Unregulated water balance"

This box includes a constant factor that accounts for the balance between the loss of water in sweat (22 ml/day) and feces (4 ml/day) versus water gained from eating food (2.6 ml/day) and metabolic processes (7.9 ml/day). Reference values were obtained from [10] and were linearly scaled for a rat of 255 g. In the simulation, the water balance is negative (-0.0108 ml/min or -15.5 ml/day) implying that the gain of water from food and metabolic process is not sufficient to offset the loss of water from sweat and feces. Therefore, the water intake through drinking has to overpass the urine volume to prevent the loss of body fluid.

System 3; the meta-box "Hydromineral challenges"

This box contains two distinct hydromineral challenges that can be switched on during the simulation. All of the virtual challenges occur during the sleeping period of the rat, a period during which most of the experimental protocols are performed in laboratories. Simulation of hydromineral challenges, inducing either intracellular or extracellular dehydration, are intended to predict changes in the ECF $[\text{Na}^+]$ and volume, in the ICF volume as well as the changes in AVP secretion.

Challenge 1: intracellular dehydration This virtual challenge simulates the effect of a short-term (10 minutes) jugular injection of 1 mmole Na^+ . This injection of Na^+ *per se* (without water) was intended to mimic a rise in extracellular osmolality creating an intracellular

dehydration. This challenge evokes AVP secretion and osmotic thirst leading to water intake.

Challenge 2: extracellular dehydration This challenge simulates the effect of a loop diuretic (furosemide) that is known to induce a rapid urinary loss of Na^+ and water. The resulting loss of fluid stimulates AVP secretion and hypovolemic thirst leading to water and salt intake. The effects of furosemide were simulated by substituting the regular kidney output of the model (see meta-box “kidney” above) by a computed furosemide output. This specific output consisting of a modified urine flow rate and $[\text{Na}^+]$ induced by the furosemide injections were calculated from two studies reporting the dynamics of these parameters after furosemide treatment [31,32]. Linear interpolation of the data illustrated in Figure one in Kikkoji *et al.* (1988) and in Figure one in Horii *et al.* (1988) served to calculate the urine flow rate and $[\text{Na}^+]$, respectively.

Experimental measurements

Experiments were carried out according to the recommendations of the Canadian Council on animal care and approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Université Laval.

Experimental data were collected from 18 male Wistar rats (8 weeks postnatal) to validate the predictive results obtained with the simulation of extracellular dehydration (furosemide injections). The experimental protocol combines two subcutaneous injections of furosemide (10 mg/kg) and a Na^+ deficient diet (0.01-0.02% NaCl ; TD 90228, Harlan Teklad, WI) that extends over 20 h. Figure 2 illustrates the timeline of the experimental protocol where time 0 in the experimental protocol corresponds to 8 AM in the simulation. During the first 4 h, the rats were housed individually in metabolic cages

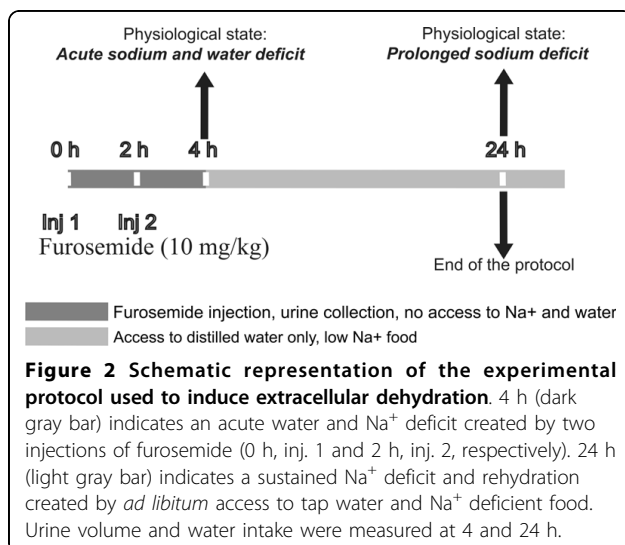
without access to water and food. At time 0 (8 AM), the rats received the first furosemide injection, followed by the second injection 2 h later (10 AM). At time 4 h (12 AM), urine was collected and the urine volume was measured. The rats were housed individually in regular plastic cages where they had access to tap water (0.001% sodium) and to Na^+ deficient food for 20 h. In the simulation the rat did not have access to food and the lack of this Na^+ source was compensated by water containing Na^+ . The Na^+ content was adjusted to match the amount of Na^+ ingested during exposure to the Na^+ deficient food (≈ 2 mg/100 g bw).

Results

The following section presents the computed predictions of the dynamics of six parameters of interest: the body fluid compartments (ECF $[\text{Na}^+]$ and volume; ICF volume), the AVP level and the water intake and excretion under balanced hydromineral conditions (control) and during two evoked hydromineral challenges.

Computed predictions under control hydromineral conditions

Here, the control conditions refer to a rat being active during the night and sleeping during the day. The rat has free access to water and sodium by bouts, randomly and mostly distributed during the night. These control conditions in our simulation are not “steady-state” simulation. Indeed constant inputs and outputs do not represent physiological conditions for a rat (except under anesthesia and continuous water and salt perfusion). The simulation under control conditions quantifies the mean level of the six parameters of interest for 24 h, over a period of 20 consecutive days. The mean and standard deviation of each parameter over that long-term simulation are presented in table 2. Note that the predicted ECF $[\text{Na}^+]$, ECF and ICF volume remain stable over the long-term simulation and agree with the physiological expectations. Beyond these global data, the simulation predicts significant differences between the sleeping period (8 AM to 8 PM) and the waking period (8 PM to 8 AM) of the rat over the period of 20 consecutive days. The low probability of unregulated drinking that occurs during the sleeping period is correlated with a weak cumulative water intake (12 ± 4 ml) and a moderate increase (2.1%) in ECF $[\text{Na}^+]$. Indeed, the predicted maximal ECF $[\text{Na}^+]$ for this period is 145 ± 1 mmol/L compared to the daily mean ECF $[\text{Na}^+]$ that includes both the sleeping and the waking period (142 ± 1 mmol/L; paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days). The predicted ECF volume (daily mean: 58 ± 2 ml) reaches a minimum of 54 ± 2 ml (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days) and the ICF volume (daily mean: 116 ± 1 ml) shows a minimum of 113 ± 1 ml during the sleeping



period. These changes are correlated with a progressive increase in AVP, which reaches a maximal level of 7 ± 4 pg/ml compared to the daily mean AVP level of 3 ± 2 pg/ml (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days). During the sleeping period, the urine flow is reduced from 0.021 ± 0.006 ml/min (daily mean) to 0.014 ± 0.004 ml/min (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days) and the urine $[Na^+]$ is increased from 80 ± 25 mmol/L (daily mean) to 91 ± 27 mmol/L (paired t-test, $p < 0.001$, $n = 20$ days)

Interestingly, the high resolution of the long-term simulation (one minute) allows an instantaneous average of each parameter value over the period of the simulation (20 days). This average reduces the inter-day fluctuation of the parameters and highlights the overall trend of the circadian dynamic of the parameters (Figure 3). It clearly indicates that waking period is split into two distinct phases defined here as the restoration phase and the maintenance phase. The onset of the restoration phase corresponds to the peak of AVP level (5 ± 2 pg/ml) and to the maxima of ECF $[Na^+]$ (144 ± 1 mmol/L; Figure 3A and 3B, dotted line 1). The simulation predicts that restoration of AVP concentration (Figure 3B) requires cumulative water absorption of approximately 22 ml (Figure 3F) and has a duration of approximately 8 h. The maintenance phase follows the restoration phase. The onset of this phase corresponds to the time point at which the current AVP concentration is not significantly different from its steady-state concentration observed between 2 and 8 AM. Using the confidence interval of this period (1.2 pg/ml to 2.1 pg/ml, with a confidence level of 95%), the onset of the maintenance phase is set to 2.1 pg/ml of AVP (Figure 3B, dotted line 2). At the beginning of this phase the ECF $[Na^+]$ is restored to a value of 140 ± 1 mmol/L (Figure 3A, dotted line 2). The maintenance phase is essentially composed of unregulated drinking that reflects the mean Na^+ and water consumption expected for a rat of about 255 g. The maintenance phase is characterized by a weak variability

of the AVP level and a relative stability of the parameters of the body fluid compartment.

Validation of the model by experimental data

It is essential to validate the predictions of the simulation produced under balanced hydromineral condition. This step is crucial to insure that the prediction of each parameter of interest over a period of 24 h agree with physiological expectations and are supported by published experimental data. However, these experimental data have to fulfill criteria for compatibility with the present model: They have to be sampled from adult animals and from rat strain that do not present physiological conditions (Wistar, Sprague-Dawley and Long-Evans rat strain). The animals have to be housed in regular laboratory conditions (*ad libitum* access to regular food diet and water, 12 h circadian cycle, normal temperature). Table 2 summarizes the prediction of the mean and standard deviation of each parameter of the simulation tested over a period of 20 consecutive days and it presents experimental data collected from many studies, which are in agreement with the simulated parameters.

In addition to the validation of the daily means over a long-term simulation, it is important to validate the high-resolution (one minute) dynamic of the simulation. The lack of experimental data approaching the present temporal resolution is critical. However, few studies did collect data with a high enough resolution to validate the simulated dynamics [33-36]. Additional file 3 compares the dynamics of the water intake (input), urine volume (output) and AVP concentration (controller) with these experimental data. The goodness of fit of our simulated parameters was considered satisfactory if the mean of the experimental data is included within the standard deviation of the simulated parameter for 24 h. Additional file 3 indicates that the simulated dynamic of water intake, urine volume and AVP concentration are

Table 2 Long-term predictions of the physiological parameters of the simulation

Parameters	Mean	SD	Physiological values and references
Mean ECF Volume (ml/100 g)	22.6	0.6	$\approx 21.9^{**}$ [10]; 22.3 ± 0.8 [49] $\approx 23.7^{**}$ [50]; ≈ 23.1 [12]; 23.2 ± 2.4 [51]; 24 ± 2 [52]
Mean ECF $[Na^+]$ (mmol/L)	142.2	0.7	138 ± 2.6 [22]; 140 ± 3 [53]; 141 ± 2 [46]; 141.6 ± 0.3 [54]; 142 ± 1 [55]; 143.3 ± 0.4 [37]; 129 to 150 [17]
Mean AVP (pg/ml) during the maintenance phase	1.7	0.9	1.1 ± 0.21 [56]; 1.7 ± 0.3 [23]; 1.8 ± 0.3 [54]; 1.9 ± 1.1 [46]; 2.3 ± 0.9 [20]; 2.5 ± 1.3 [53]
Urine Volume (ml/100 g)	11.8	3.4	10.8 ± 3.6 [57]; 8.9 ± 5.9 [17]; 13 [19]; 13 ± 2 [58]; 14 ± 1 [34]
Water intake (ml/100 g)	18.0	3.7	15.2 ± 1.8 [10]; ≈ 16 [38]; 20 ± 3 [58]
Na^+ intake (mmol/100 g)	0.69	0.17	≈ 0.75 [59]; 0.84 ± 0.02 [34]; 0.97 ± 0.14 [23]
Mean ICF Volume (ml/100 g)	45.3	0.3	≈ 45.9 [12]; 45 ± 1 [50]**; $44.5 \pm 3.1^{**}$ [51]; ≈ 44.6 [10]; $50 \pm 5^{**}$ [52]

Daily mean and standard deviation of each parameter are obtained after 20 consecutive days of simulation under control conditions. All the predictions are coherent with experimental data reported in the literature according to their deviations. Some experimental data had to be normalized for comparison. The *** symbol indicates that the value was obtained by subtracting the ICF or ECF volume of the model from the total water content of the rat measured experimentally.

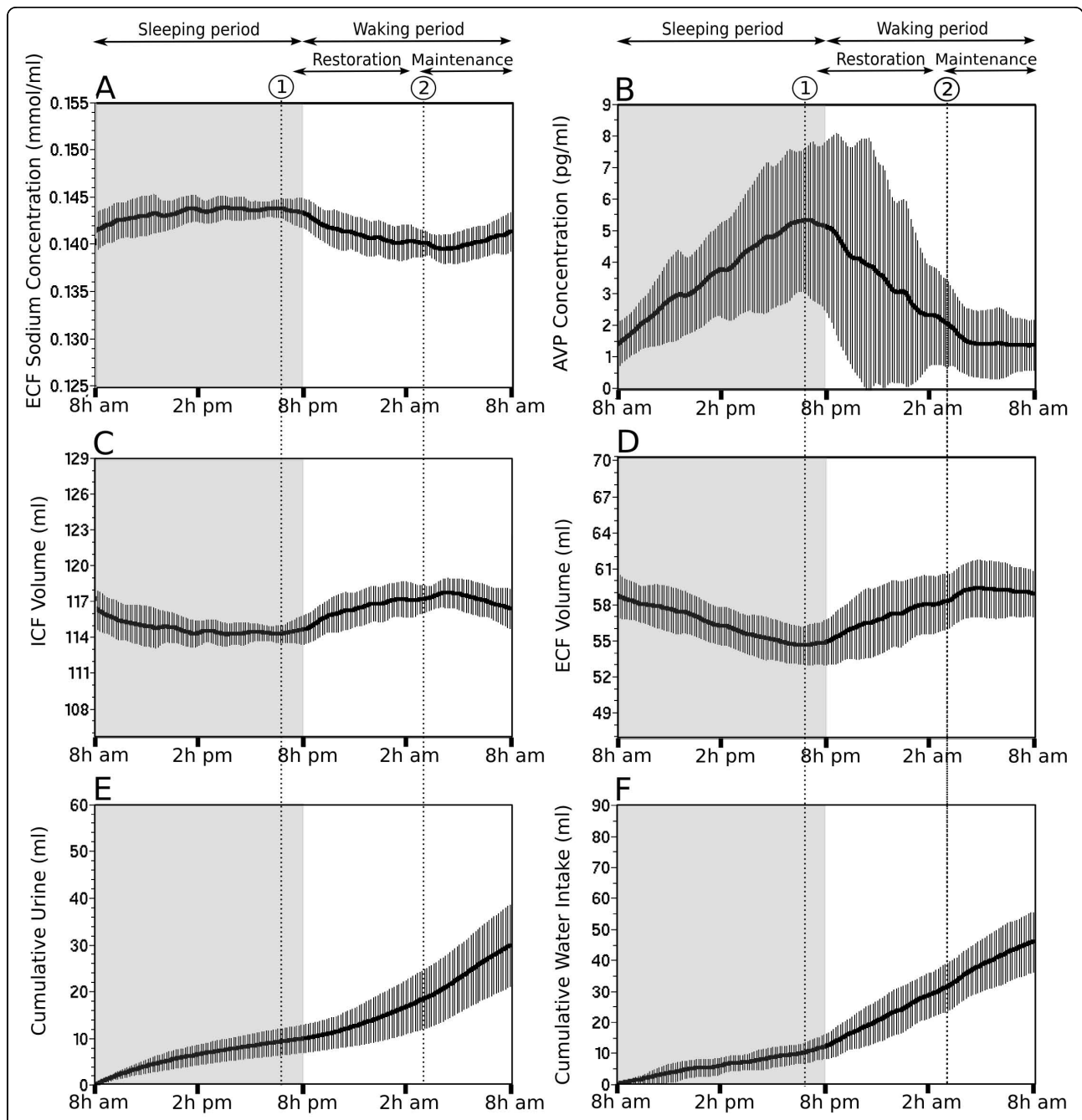


Figure 3 Circadian predictions of the vasopressin release and related physiological parameters generated by a simulation of 20 consecutive days. In the current rat model, the hydromineral status of the body fluid compartments is characterized by the ECF $[Na^+]$ (A), the ICF volume (C) and the ECF volume (D). The inputs/outputs are the cumulative water intake (F) and cumulative urine (E), respectively and the systemic AVP concentration is the controller of the homeostasis (B). In each panel, the value of the parameter is calculated every minute and the solid black line is the mean of the parameter. The vertical bars are the standard deviation. The gray area illustrates the sleeping period of the rat (day) and the white area, the waking period (night). The prediction of the dynamic of the parameters highlights three distinct phases in the circadian fluctuation of the hydromineral balance: (1) the sleeping phase characterized by a progressive rise in ECF $[Na^+]$ and AVP, (2) the restoration phase (onset at the dotted line 1) covers the recovery of AVP from its peak to basal level and (3) the maintenance phase (onset at the dotted line 2) is characterized by the low variability of AVP level and a restored ECF $[Na^+]$ and volume.

in agreement with published experimental data measuring these three parameters at several time points during 24 h.

Role of early water intake in reducing variability of ECF [Na⁺] and circulating AVP level

Data summarized in table 2 highlight the presence of large daily fluctuation in fluid and electrolyte intake over the long-term (here 20 days). These differences mainly depend on the frequency and distribution of unregulated drinking in the simulation (see the meta-box “digestive system in methods) and illustrate the random nature of the daily fluid and electrolyte consumption of the rat. Here the simulation tested the influence of this random consumption on the level and dynamic of the ECF [Na⁺] and AVP for a period of 24 h. The occurrence of a single additional drinking bout (forced drinking) at the onset of the sleeping period (Figure 4F, dotted line 1) delays the increase in ECF [Na⁺] (Figure 4A, gray line), compared to the absence of additional drinking bout (Figure 4A, black line). In this example, the additional drinking bout reduces the circulating level of AVP by about 1 pg/ml (Figure 4B) and shortly delays the onset of the maintenance phase (Figure 4B). The fluctuation of both the ECF and ICF volume are also attenuated (Figure 4C and 4D). These predictions highlight the high sensibility of the system to random daily fluctuation in the frequency and distribution of drinking bout.

Role of the ICF compartment in reducing variability of ECF [Na⁺] and circulating AVP level

The long-term simulation predicts a circadian fluctuation in ICF volume, likely indicating a putative role of the ICF compartment in stabilizing the ECF [Na⁺]. In order to validate that hypothesis, we simulated a lack of water transfer between the ICF and ECF fluid compartments for a period of 24 h (Figure 5C, solid gray line). Interestingly, this test predicts a sharp increase in ECF [Na⁺] during the sleeping period that rapidly exceeds the threshold for drinking (4%, Figure 5A, line 2) and triggers water intake (Figure 5F, dotted line 1). Moreover, the occurrence of sharp rise in ECF [Na⁺] over the threshold is also increased, triggering additional need-induced water intake to restore ECF [Na⁺] (Figure 5F). The simulation also predicts increased AVP level fluctuation (Figure 5B) that contributes to attenuate fluctuation in ECF [Na⁺]. It also appears from this prediction that drinking bouts occurring at the end of the sleeping period and during the waking period (Figure 5F) trigger fluctuation of larger amplitude in the ECF [Na⁺] (Figure 5A) and circulating AVP level (Figure 5B). The water intake needed to compensate for the lack of ICF water transfer is approximately 9 ml over a period of 24 h,

representing 19% of the daily water intake. The fluctuations in ECF [Na⁺], circulating AVP level and drinking bouts are greatly attenuated when the ICF compartment is included in the simulation (Figure 5, solid black line), emphasizing the buffer role of the ICF compartment, working in synergy with circulating AVP to maintain the stability of the ECF [Na⁺] and to lower the daily need of water intake.

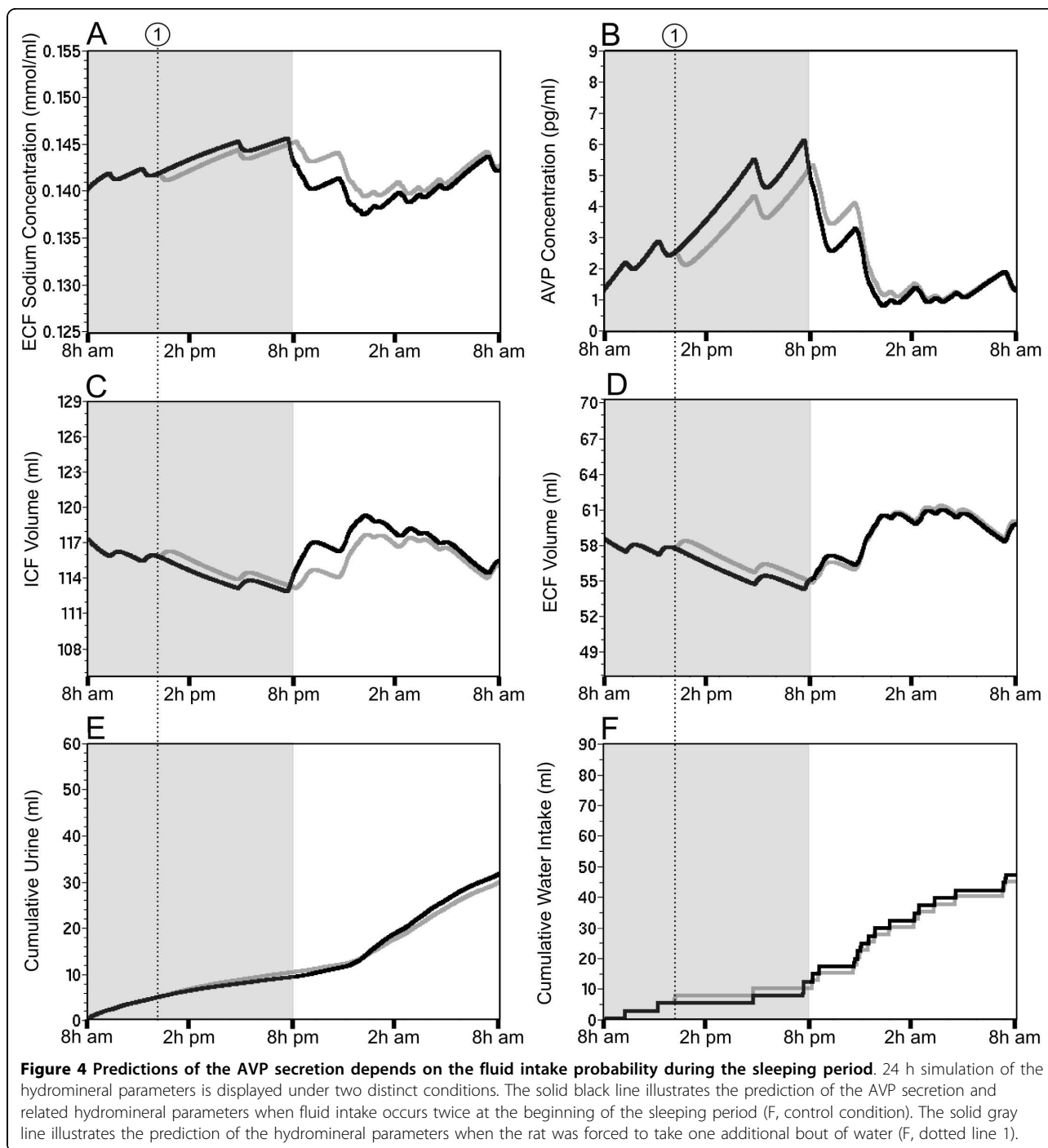
The previous results demonstrate that this model of rat hydromineral homeostasis produces coherent predictions of the major parameters of the system under balanced hydromineral conditions indicating that all essential components are included in the model. The next series of simulations are intended to predict changes in these parameters in response to hydromineral challenges.

Challenge 1: Intracellular (osmotic) dehydration

The challenge consists of injecting 1 mmol Na⁺ over 10 minutes into the ECF compartment. The Na⁺ infusion abruptly raises the ECF [Na⁺], creating a threatening hyperosmotic condition (Figure 6A). The simulation indicates that the responses engaged to restore the ECF [Na⁺] level occur in two distinct phases contributing to an increase in the ECF volume (Figure 6D). The first phase consists of a rapid transfer of water from the ICF to the ECF compartment (Figure 6C, dotted line 1). The reduction in the ICF compartment reaches 3% of its initial volume in a short interval, causing intracellular dehydration. Na⁺ infusion also triggers an immediate rise in AVP levels that is added to the initial increase resulting from the reduced probability of drinking during the sleeping period (Figure 6B). The peak in AVP (3.2 pg/ml) reduces the urine flow rate to optimize water conservation and lower the ECF [Na⁺]. Note that the rise in AVP is concomitant to 5.5 fold increased in urine Na⁺ concentration (data not shown). The second corrective phase consists of water absorption (Figure 6F, line 3). This phase is shortly delayed and is engaged after the ECF [Na⁺] exceeds the pre-established threshold (Figure 6A, line 2) and after the stomach starts exchanging water with the ECF and the intestine. The intake of distilled water also contributes to the increase in ECF volume and also acts to restore the ICF volume. The rapid dilution of the extracellular Na⁺ by exchanging water with the ICF, by ingesting water and by increasing renal Na⁺ excretion are responsible for the quick recovery of the ECF [Na⁺].

Challenge 2: Extracellular (hypovolemic) dehydration

The challenge consists of two injections of furosemide without access to water during the first 4 h. That depletion period is followed by 20 h of a Na⁺ deficient diet and *ad libitum* access to tap water. The challenge starts



at 8 AM (day 1) after one day of simulation under balanced hydromineral conditions (day 0). The 24 h pre-simulation is intended to generate hydromineral parameters that fluctuate slightly from their pre-established set-point. The dynamics of these parameters are presented in Figure 7 as a control (solid black line). Note that cumulative urine volume and water intake at the onset of day 1 are thus, above 0 (Figures 7E, F,

respectively). As expected, furosemide injections rapidly increase the cumulative urine excretion by 10.5 ml (35% of the cumulative urine volume; Figure 7E, gray line) decreasing the ECF volume by approximately 10% (Figure 7D). AVP shows a sharp and massive release (Figure 7B, gray line) with a peak of 8.2 pg/ml during the furosemide protocol. AVP release reduces the urine flow rate to a minimum (0.5 μ l/min predicted after the

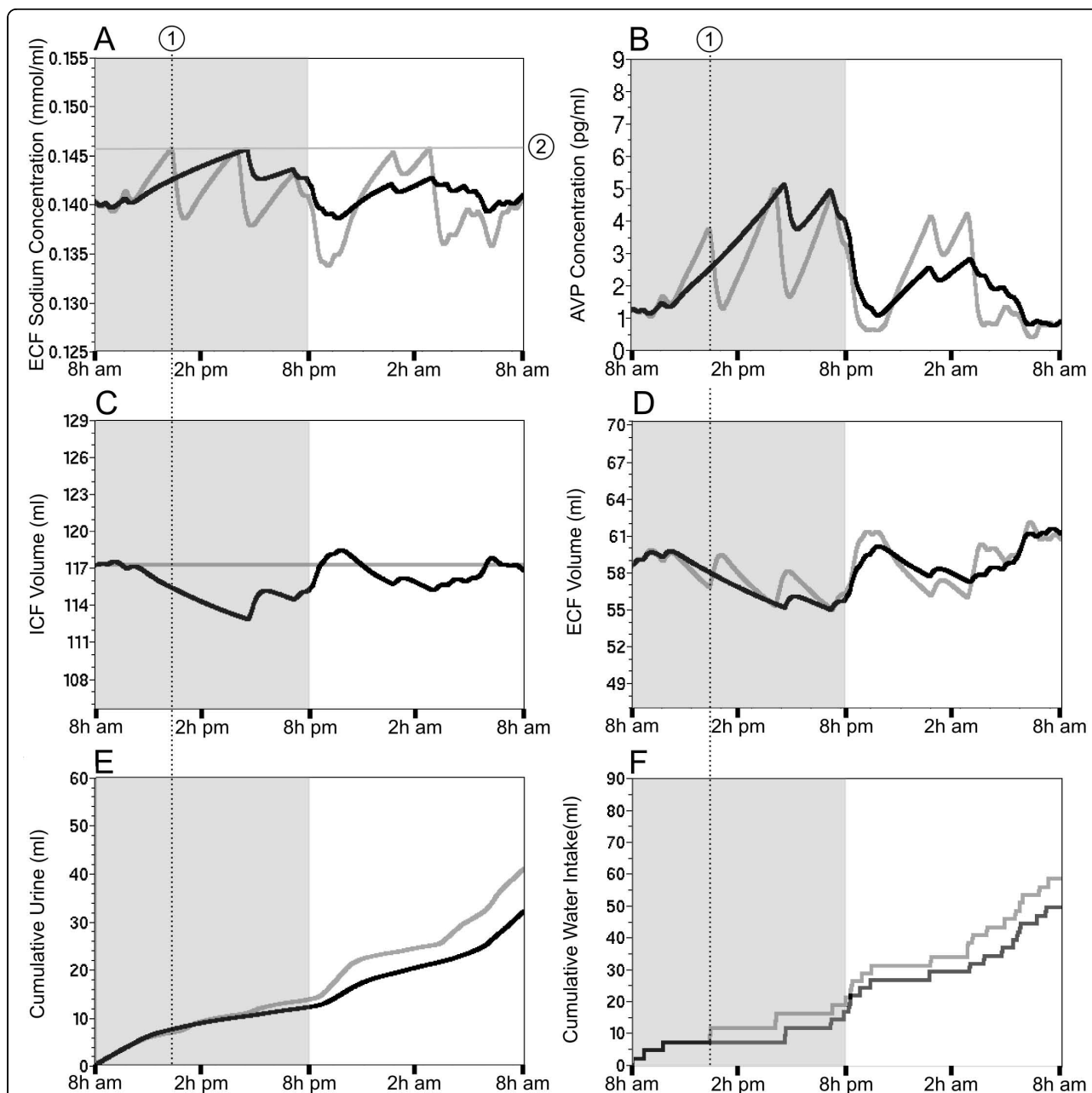
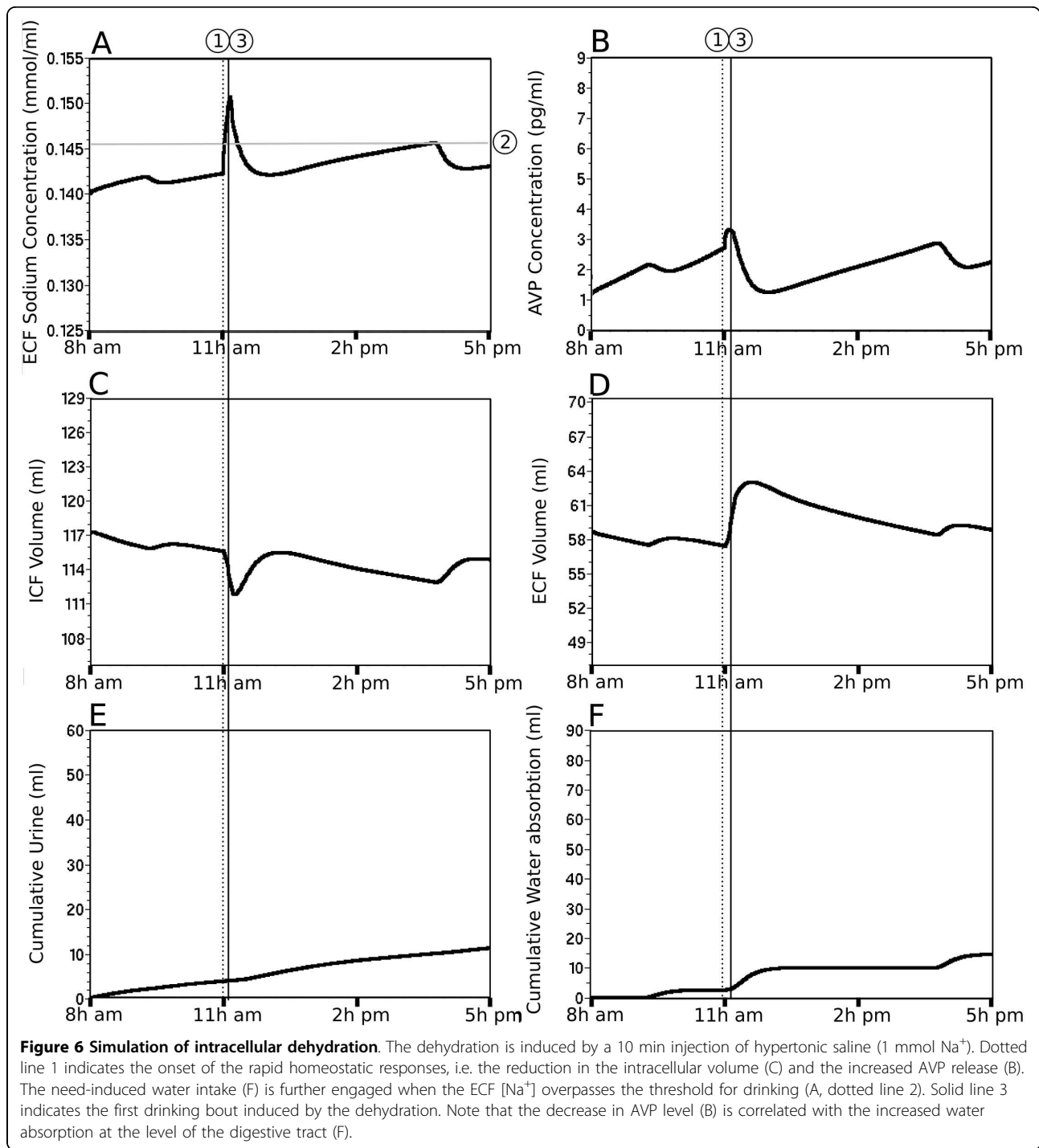


Figure 5 The ICF compartment is essential for the stabilization of the ECF parameters and AVP secretion. The solid black line illustrates the prediction of the hydromineral parameters over a 24 h simulation when water exchange is permitted between the ECF and the ICF compartments (C, control condition). The solid gray line illustrates the same prediction when water exchange between the ECF and the ICF compartments is not permitted (C). In such a simulation, the ECF $[Na^+]$ quickly overpasses the threshold for drinking (A, dotted line 2). The additional need-induced water intake (four threshold crossing, A, dotted line 2) increases the total water intake by approximately 19% (F). Note that the absence of water exchange between the two compartments is characterized by larger fluctuations in the ECF $[Na^+]$ (A) and volume (D), as well as in AVP secretion (B).

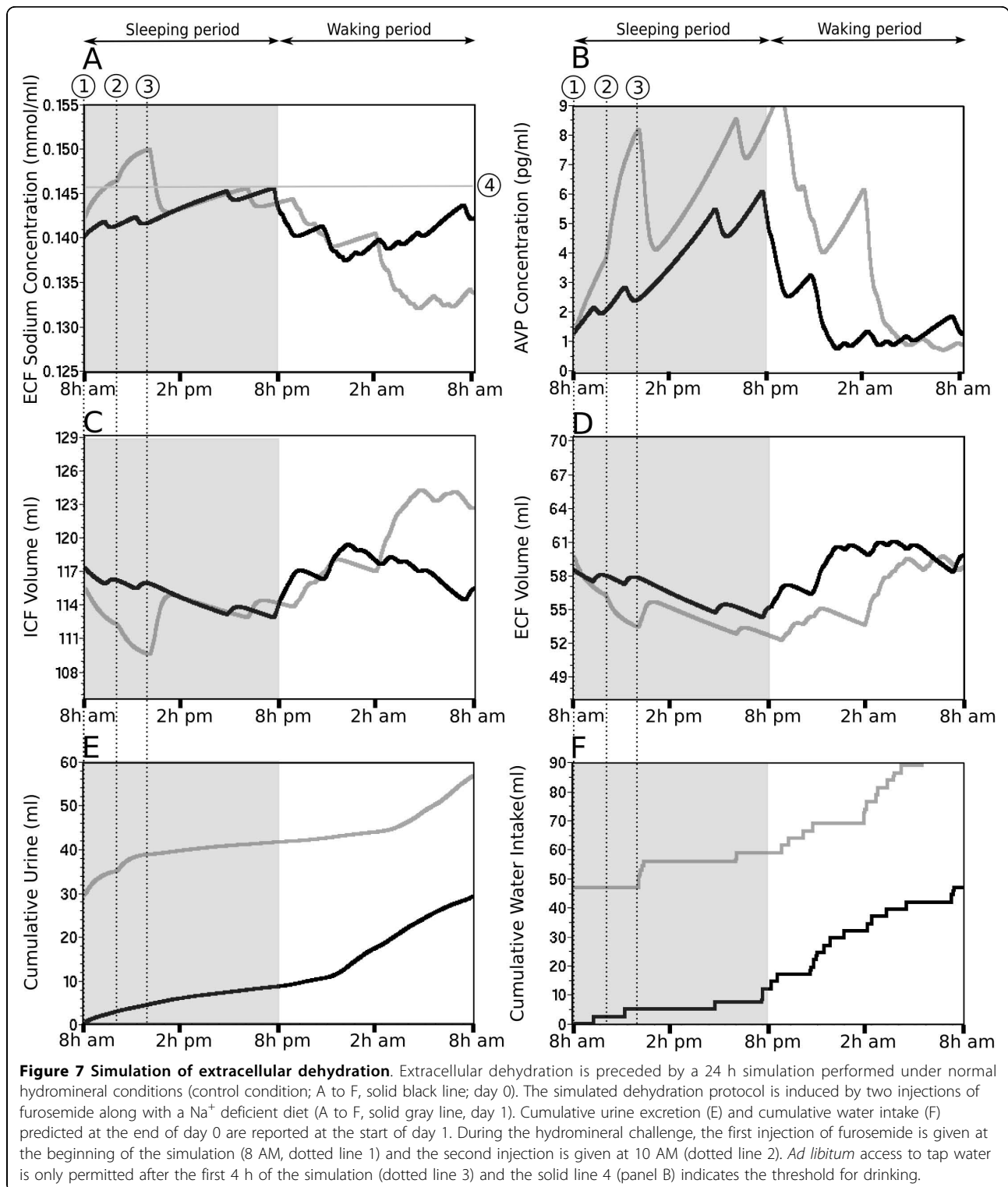
first 4 h of the simulation). Interestingly, the simulation also predicts an increased ECF $[Na^+]$ of approximately 6% (Figure 7A) due to the negative balance between water and Na^+ loss. Note that the rise in $[Na^+]$ exceeds the threshold (Figure 7A, line 4) and would have triggered drinking if water was available. The ICF volume is

simultaneously reduced by 5% (Figure 7C) to buffer the increase in ECF $[Na^+]$. Predictions of all the physiological parameters after 4 h of extracellular dehydration are summarized in Table 3 and compared to the control day. The furosemide treatment induces mild hypovolemia and the simulation predicts water intake as soon as



water is available (Figure 7F). Note the large water intake despite a low unregulated drinking probability during the sleeping period. The simulation predicts that water intake combined with the Na⁺ deficient diet set after the injections progressively reduces the ECF [Na⁺] to 134 mmol/L (Figure 7A), resulting in hyponatremia. The progressive decrease in ECF [Na⁺] is correlated

with low level of ANP and a high level of ALD to minimize renal Na⁺ excretion (0.91 μmol/min after the first 4 h vs. 1.08 μmol/min at the end of the simulation). Moreover, water intake restores both the ICF and ECF volume. However, if repletion of the ECF volume is completed by the end of day 1 (Figure 7D, gray line), the simulation predicts an expansion of the ICF volume



(Figure 7C, gray line). The overload of the ICF compartment likely results from the predicted low ECF [Na⁺] causing an osmotic movement of water to the ICF compartment. Predictions of all of the physiological parameters after 24 h of sodium depletion are summarized

in Table 3. In order to validate the simulation of the extracellular dehydration, predictions for two parameters were compared to measurements carried out on rats in the same range of weight (245 ± 2 g, n = 18). The experimental data indicate that ECF [Na⁺] measured at

Table 3 Predictions of the hydromineral parameters obtained with the simulated extracellular dehydration protocol (furosemide injections combined with a Na⁺ deficient diet)

Parameters	First 4 h (day 0) Control	First 4 h (day 1) Extracellular dehydration	24 h (day 0) Control	24 h (day 1) Extracellular dehydration
Mean ECF [Na ⁺] over the period (mmol/L)	141.6	146.8	141.8	141.3
Mean [AVP] (pg/ml)	2.2	4.5	2.7	4.8
Mean ECF Volume (ml/100 g)	22.7	22.0	22.7	21.7
Mean ICF Volume (ml/100 g)	45.5	44.0	45.4	45.6
ECF [Na ⁺] at the end of the period (mmol/L)	141.8	149.9	142.2	134.0
Cumulative Urine Na ⁺ (mmol/100 g)	0.1	0.3	0.83	1.19
Water intake (ml/100 g)	0.1	3.5*	18.2	20.3
Na ⁺ intake (mmol/100 g)	0.0072	0	0.74	0.41
Urine Volume (ml/100 g)	1.8	4.1	12.4	12.8

Predictions at different time-points (4 h and 24 h) under control condition are listed under day 0 and predictions under Na⁺ deficit are listed under day 1. "*" indicates the amount of water ingested during the first 4 h after access to tap water (see the method for a detailed description of the protocol).

the end of the experimental protocol (136 ± 3 mmol/L), as well as water intake measured 4 and 24 h after the start of the protocol (2.8 ± 2 ml/100 g bw and 17.5 ± 3.5 ml/100 g bw, respectively) are all within the range of the predicted values.

Discussion

The high temporal resolution of the graphical output of the simulation gives new insights into the hydromineral dynamic of the rat and allows the simulation to answer fundamental questions about the homeostatic parameters. The model integrates experimental data of different forms into specific meta-boxes to translate the biological realities into equations (i.e., [Na⁺]_{urine}) or computational algorithms (i.e., the motivation module). Here, we discuss some of the strategic choices we made while building our model.

Assumptions on the inputs to the body fluid compartments

Our model requires a "digestive module" sub-system to simulate the obligatory delays between fluid and Na⁺ intake and their absorption by the body. For that purpose we used the time constants reported in a previous computer simulation of the water balance [12]. In this model, the water and Na⁺ flow rates between digestive compartments were calculated from the water and [Na⁺] content of the stomach and intestine [27,28]. The model also includes passive and active transfer of water and electrolytes across the intestine wall. Various attempts were made to increase the accuracy of this module. For example, a second "digestive module" based on the recent study of Smith *et al.* (2007) was also tested in the model. However, the assumption of a constant rate (mmol/s) for sodium transfer between the digestive compartments [37] does not generate overall predictions in agreement with experimental data.

The model includes need-induced fluid intake, which is triggered when ECF [Na⁺] exceeds the pre-established set-point by 4%. Introducing this threshold in the model is based on two distinct studies [5,29]. In Anderson *et al.* (1990), the authors showed that a mean increase of 10 mosmol/L was needed to trigger drinking in pigs. This increase represents about 4% of the normal osmolality (289 mosmol/L). In the second study performed in humans, the authors presented a relationship between plasma osmolality and thirst sensation [5]. According to their regression function, a 4% increase in osmolality (298 mosmol/L vs. 287 mosmol/L) lead to a score of 5 over 10 in term of thirst sensation.

The "motivation" module of our model includes unregulated drinking, an essential aspect of fluid and electrolyte intake. Water and Na⁺ consumption exceed the daily needs of the rat and physiological stimuli do not stop unregulated drinking [30]. This aspect of fluid intake was therefore introduced in our model to enhance the realism of the prediction generated by the simulation. Moreover, a circadian modulation of unregulated drinking was added to the model. This modulation takes into account the fact that the probability of drinking is not constant over 24 h and the probability of drinking was therefore modeled by a sinusoidal function of time with a minimum at 2 PM and a maximum at 2 AM. The maximum probability was set to the middle of the waking period (2 AM) in agreement with the fact that drinking is correlated with eating [38] and that rats almost exclusively eat during their waking period (night; [36]).

Assumptions on the outputs to the body fluid compartments

It is known that the rate of renal Na⁺ clearance can be slightly affected by hormones such as AVP [39,40]. However, the absence of suitable data on Na⁺ clearance

as a function of AVP concentration and the fact that the effect is negligible in most condition [9] led us to consider a non-variable parameter in the model. This non-variable Na^+ clearance does not imply a fixed Na^+ excretion in the model. Indeed, variable urine Na^+ excretion mechanism was introduced to control ECF $[\text{Na}^+]$ and volume (ANPs factor), as well as a Na^+ retention mechanism (ALD factor). The actions of these mechanisms combined with the action of the AVP controller exert a powerful mechanism of urine concentration.

AVP is the main controller of the model. The measurable AVP concentration in the plasma represents the equilibrium between AVP secreted from the pituitary gland and its clearance [41]. However, in our model, those two components of the equilibrium are not simulated individually, only the resulting AVP level. In order to have a more realistic simulation, we included the delay imposed by the fixed clearance of AVP. When AVP secretion is reduced, an exponential decay of plasma AVP concentration was introduced in our model. This decay was adjusted so that 15% of circulating AVP is cleared every minute [18] until the correct AVP level is reached. In addition, a recent study evaluating the circadian changes of plasma vasopressin in patients presenting nocturia, has reported a circadian modulation of AVP [42]. Inspired by this paper, a modulation of AVP was introduced in the model by assuming that a mechanism lowers the AVP level before the sleeping period of the rat in order to prevent nocturia. Based on Figure one of Graugaard-Jensen *et al.* 2006 (but with a 12 hours phase since rat are active during night and rest during the day), we introduced the following modulation: at 2 AM, the level of AVP is reduced in a linear function of time until a nadir of -30% is reached at 8 AM. Then, AVP concentration is restored to its computed level by 11 AM. It should be noted that the lack of these two regulatory mechanisms controlling the level of circulating AVP greatly impairs the quantitative and dynamic predictions of this parameter and resulting ECF $[\text{Na}^+]$.

Focus on the long-term simulation of hydromineral balance

In the present study, the predictions mainly concern six individual parameters characterizing the hydromineral parameters and homeostatic responses: The ECF $[\text{Na}^+]$ and volume, the ICF volume, the AVP secretion and the cumulative water intake and urine excretion. We simulated normal hydromineral conditions to validate our model in terms of a quantitative prediction of the parameters of interest. Comparison of these predictions with published experimental data (Table 2) allows us to conclude that our model contains at least the minimal and essential sub-systems that are required to model the

hydromineral balance. Moreover, these subsystems are correctly connected using appropriate approximations and time constants to produce overall realistic predictions. Therefore, the present high-level model is appropriate to deliver realistic simulation of AVP secretion and ECF osmolality under normal hydromineral conditions, i.e. when the rat meets regular conditions of laboratory housing. This latter assumption might reduce the precision of any predictions on the biological parameters of interest made under either pathophysiological conditions, or extreme experimental conditions (hemorrhage, severe dehydration) as these specific situations require the implementation of additional regulatory systems.

The simulation over 20 consecutive days predicts relatively large inter-day fluctuations in AVP, in water and electrolyte intake and in urine excretion compared to the stability of the ECF and the ICF parameters (see Table 2). These fluctuations indicate that the daily distribution of fluid and electrolyte intake under normal osmotic conditions is not completely correlated with physiological needs. On the contrary, the fluctuations might reflect the unregulated nature of water intake and suggests that either a deficit, or overload in fluid and Na^+ consumption occur on a daily basis. These large discrepancies may explain the inter-individual variability that has been reported in experimental data. For example, measurement of the urine flow rate and urine osmolality in a population of male Sprague-Dawley rats extended over an almost threefold range (Figure three in Bankir, 2001).

The long-term simulation produced mean data and smoothed the random variations in each parameter tested, leading to the identification of two distinct phases during the active period of the rat: the restoration and the maintenance. The identification of these two phases was based on the prediction of a time-dependent secretion of AVP that is well correlated with the phases of the hydromineral cycle. The predicted dynamics of plasma AVP shows a constant rise over the sleeping period of the rat (daylight) and a decrease during the active period of the rat (night). This pattern of secretion matches the partial experimental observations indicating a circadian pattern in plasma vasopressin level with a peak in secretion at the end of the sleeping period [11,35,36]. However, the temporal resolution of the experimental measurements is not as accurate as the simulation (4 measurements for Windle *et al.* 1992 and 6 for Granda *et al.*, 1998 compared to 1440 for the simulation) and the estimation of the mean experimental AVP level and peak concentration for 24 h might be biased by individual fluctuations as shown in the Additional file 3. The temporal resolution of the simulation, as well as the average of AVP level at each time point

for several consecutive days greatly improves our perception of the circadian secretion of AVP.

Interestingly, the simulation allows the prediction (quantification and dynamic) of parameters that would be difficult to measure experimentally, such as the ICF and ECF volume. Here, the long-term simulation highlights the role of the ICF compartment in the stabilization of the ECF volume. The sleeping period is associated with a progressive decrease in the ECF volume that is concomitant to the decrease in the ICF volume. The parallel depletion of both fluid compartments suggests the importance of water transfer between the ICF and the ECF compartment to attenuate the depletion of the extracellular compartment. The role of the ICF compartment was further demonstrated using a 24-h simulation, during which fluid exchange was blocked. Under these conditions, the threshold for drinking was reached more often and small random perturbations in the ECF $[Na^+]$ or AVP caused by drinking became larger. It should be noted that the role of the ICF compartment as a buffer is a primary and fast compensatory response triggered by all the simulated hydromineral challenges. The predicted reduction in the ECF volume during the night (maximum 7%) is certainly caused by evaporative water loss, which is compensated neither by water intake, nor by metabolic water. However, such a change in volume is not necessarily associated with hypotension. Indeed, blood pressure is regulated by additional mechanisms like vasoconstriction.

Focus on the simulations of hydromineral challenges

The simulations of the hydromineral challenges yielded several important results. The simulation of intracellular dehydration indicates that restoration of the ECF $[Na^+]$ mainly involves two sets of responses with different dynamics. Water transfer from the ICF to the ECF, and AVP secretion are rapid homeostatic responses. Need-induced water intake is delayed and has a high impact on both the ICF volume and ECF $[Na^+]$. However, avid drinking creates hypervolemic conditions and further restoration of the ECF volume involves water and salt excretion that extends over the next 6 h.

The simulation of furosemide injection led to predictions that are in agreement with the experimental data. It also indicates that hyponatremia is only achieved by combining diuretic injections with a Na^+ deficient diet (134.0 mmol/L: predicted ECF $[Na^+]$ vs. 136 ± 3 mmol/L: measured ECF $[Na^+]$ from our experimental protocol). Hyponatremia is correlated with a sustained increase in the ICF volume caused by the osmotic gradient generated between the ECF $[Na^+]$ and ICF $[K^+]$. Furosemide injections *per se* induced hypernatremia, likely resulting from hyponatriuria. Experimental data showed

that blocking Na^+ re-uptake with furosemide injections led to urine $[Na^+]$ ranging from slightly hyponatriuric to hyponatriuric (approx. 120 ± 20 mmol in [43]; approx. 107 ± 22 in [44]; approx. 80 mmol in [31]). Despite a larger hyponatriuria, the data reported in Hori et al., 1988 (Figure oneA) were privileged because they provided the most detailed experimental measurements needed to create an accurate furosemide model. It should be noted that implementation of a higher Na^+ excretion rate in the furosemide model would lower ECF Na^+ content without creating hyponatremia. In this line, we tested the assumption in which we forced isonatremia, approximately 140 mmol/L Na^+ , during the simulated furosemide treatment. This extreme simulation also led to slightly hypernatremic ECF after the first 4 h of simulation (data not shown), suggesting that furosemide treatment *per se* is not sufficient to cause efficient Na^+ depletion of the ECF compartment.

Conclusion

In the present study, we developed a high-level simulation of hydromineral homeostasis. The coherence shown between the simulations (quantification, dynamics) and the experimental data indicates that the model integrates most of the essential components to predict realistic physiological values for the parameters under study. Therefore, the model is able to render quantitative and precise temporal predictions on the ECF osmolality and AVP secretion, as well as on their relationship with the ECF and ICF volume, making it an appropriate tool to predict the state of the rat hydromineral balance when challenged by various osmotic perturbations. Such predictions will help in the design of experimental protocols to test specific hypothesis. For example, we can suggest that the best period to experiment on rat is during the maintenance phase as this is the period where hydromineral fluctuations are less likely. Also, obtaining a global view of all the hydromineral parameters that the simulation can produce with equivalent temporal precision would be difficult or impossible to obtain with *in vivo* measurements. Moreover, one interesting application of the model is its use in predicting the putative action of pharmacological compounds on the hydromineral balance. As an example, we use the present model to simulate furosemide injections and our results are compatible with experimental data demonstrating that our model would be appropriate to test the action of other pharmacological compound affecting the homeostasis in the future.

The use of the model to an extended range of applications requires however, the implementation of additional components. For example, the implementation of a graded Na^+ appetite would be possible by modeling a sophisticated renin-angiotensin-aldosterone system and

digestive module in the model. Interestingly, substitution of the meta-box “vasopressin level” by a biologically inspired simulation of the magnocellular neuron network [45] in future versions of the simulation would allow us to predict how local modulation of neuronal excitability by osmotic challenges and drugs targeting these neurons would influence the dynamics of global homeostatic parameters in rats.

Additional material

Additional file 1: Comparison of the impact of osmotic and volemic fluctuation on vasopressin secretion. This additional file shows the relative impact of the osmotic and volemic fluctuation on the AVP secretion based on equation 1 of the method.

Additional file 2: Calculation of the sodium clearance used in the simulation. Four different calculations of the sodium clearance based on four different paper are presented and their results are averaged in order to generate the sodium clearance value used in the simulation.

Additional file 3: Comparison of the simulated dynamics of three hydromineral parameters with experimental data. This additional file compared the simulated dynamics of the water intake (input), AVP concentration (controller) and urine volume (output) with experimental data and shows that they are in agreement.

Acknowledgements

This project was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) MOP-178002. LN received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, ESD3-334440-2006).

Authors' contributions

LN established the rat model and programmed the simulation using computer software. He wrote the first draft of the present paper and he approves the final version. DA performed the animal experiments, i.e. the furosemide injections and all the measurements of the parameters. Moreover she participated to the criticisms and revisions of the manuscript. DA approved the last version of the manuscript. DM analyzed the experimental and predicted data of the simulation and he suggested all the final improvements of the model. He performed all the writing revisions of the manuscript and approved the last version of the manuscript.

Received: 13 April 2010 Accepted: 25 August 2010

Published: 25 August 2010

References

1. Bourque CW: Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**:519-531.
2. Denton DA, McKinley M, Weisinger RS: Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, **93**:7397-7404.
3. Johnson AK, Thunhorst RL: The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 1997, **18**:292-353.
4. Andersen LJ, Andersen JL, Pump B, Bie P: Natriuresis induced by mild hypernatremia in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002, **282**:R1754-R1761.
5. Thompson CJ, Bland J, Burd J, Baylis PH: The osmotic thresholds for thirst and vasopressin release are similar in healthy man. *Clin Sci (Lond)* 1986, **71**:651-656.
6. Verbalis JG: Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003, **17**:471-503.
7. Zerbe RL, Robertson GL: Osmoregulation of thirst and vasopressin secretion in human subjects: effect of various solutes. *Am J Physiol* 1983, **244**:E607-614.
8. Pidd M: Five simple principles of modelling. In *1996 Winter Simulation Conferences* Edited by: Charnes JM, Morrice DJ, Brunner DT, Swain JJ 1996, 721-728.
9. McCann SM, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J: Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* 2003, **36**:165-181.
10. Rafecas I, Esteve M, Fernandez-Lopez JA, Remesar X, Alemany M: Water balance in Zucker obese rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1993, **104**:813-818.
11. Terwel D, ten Haaf JA, Markerink M, Jolles J: Changes in plasma vasopressin concentration and plasma osmolality in relation to age and time of day in the male Wistar rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992, **126**:357-362.
12. Toates FM, Oatley K: Computer simulation of thirst and water balance. *Med Biol Eng* 1970, **8**:71-87.
13. Barron W, Schreiber J, Lindheimer M: Effect of ovarian steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol* 1986, **250**:E352-361.
14. Barron W, Stamouostas B, Lindheimer M: Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat. *J Clin Invest* 1984, **73**:923-932.
15. Iwasaki Y, Gaskill M, Robertson G: Adaptive resetting of the volume control of vasopressin secretion during sustained hypovolemia. *Am J Physiol* 1995, **268**:R349-357.
16. Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y: Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol* 2004, **286**:E337-346.
17. Krinke GJ, Bullock GR, Bunton T: *The Laboratory Rat*. London, Academic Press 2000.
18. Gauer OH, Tata PS: Vasopressin studies in the rat. IV. The vasopressin-water-equivalent and vasopressin clearance by the kidney. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 1968, **298**:241-257.
19. Bankir L: Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res* 2001, **51**:372-390.
20. Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, Robertson GL: The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest* 1973, **52**:3212-3219.
21. Ahloulay M, Schmitt F, Dechaux M, Bankir L: Vasopressin and urinary concentrating activity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 1999, **25**:213-222.
22. Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA: Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci* 2005, **76**:1805-1815.
23. Jonassen TE, Sorensen AM, Petersen JS, Andreasen F, Christensen S: Increased natriuretic efficiency of furosemide in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 2000, **31**:1224-1230.
24. Shirley DG, Skinner J: The effect of chronic sodium depletion on renal function in conscious rats. *Exp Physiol* 1994, **79**:161-173.
25. Morris DJ, Berek JS, Davis RP: Sex dependence of aldosterone response in rats. *Metabolism* 1973, **22**:923-926.
26. Stricker EM, Vagnucci AH, McDonald RH Jr, Leenen FH: Renin and aldosterone secretions during hypovolemia in rats: relation to NaCl intake. *Am J Physiol* 1979, **237**:R45-51.
27. O'Kelly LI, Falk JL: Water regulation in the rat. II. The effects of preloads of water and sodium chloride on the barpressing performance of thirsty rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 1958, **51**:22-25.
28. O'Kelly LI, Falk JL, Flint D: Water regulation in the rat: I. Gastrointestinal exchange rates of water and sodium chloride in thirsty animals. *Journal of comparative and physiological psychology* 1958, **51**:16-21.
29. Anderson CR, Houpt TR: Hypertonic and hypovolemic stimulation of thirst in pigs. *Am J Physiol* 1990, **258**:R149-154.
30. Fitzsimons JT: Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 1998, **78**:583-686.
31. Hori R, Okumura K, Inui K, Shibata T, Kikkoji T, Kamiya A: A quantitative method of evaluating the diuretic response to furosemide in rats. *Pharmaceutical research* 1988, **5**:694-698.
32. Kikkoji T, Kamiya A, Inui K, Hori R: Urinary excretion and diuretic action of furosemide in rats: increased response to the urinary excretion rate of furosemide in rats with acute renal failure. *Pharmaceutical research* 1988, **5**:699-703.

33. Fitzsimons TJ, Le Magnen J: **Eating as a regulatory control of drinking in the rat.** *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1969, **67**:273-283.
34. Aizman RI, Rabinowitz L, Mayer-Harnisch C: **Circadian rhythms and time course of adaptive sodium and potassium excretion in rats after uninephrectomy.** *Am J Physiol* 1994, **266**:R1454-1462.
35. Granda TG, Velasco A, Rausch A: **Variations and interrelation between vasopressin and plasma osmolality in diabetic rats with insulin treatment.** *Life Sci* 1998, **63**:1305-1313.
36. Windle RJ, Forsling ML, Guzek JW: **Daily rhythms in the hormone content of the neurohypophysial system and release of oxytocin and vasopressin in the male rat: effect of constant light.** *J Endocrinol* 1992, **133**:283-290.
37. Smith CA, Curtis KS, Smith JC, Stricker EM: **Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007, **292**:R2089-2099.
38. Fitzsimons JT: **The physiology of thirst and sodium appetite.** *Monogr Physiol Soc* 1979, 1-572.
39. Elalouf JM, Di Stefano A, de Rouffignac C: **Sensitivities of rat kidney thick ascending limbs and collecting ducts to vasopressin in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:2276-2280.
40. Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K: **Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct.** *Cardiovasc Res* 2001, **51**:470-480.
41. Davison JM, Sheills EA, Barron WM, Robinson AG, Lindheimer MD: **Changes in the metabolic clearance of vasopressin and in plasma vasopressinase throughout human pregnancy.** *J Clin Invest* 1989, **83**:1313-1318.
42. Graugaard-Jensen C, Rittig S, Djurhuus JC: **Nocturia and circadian blood pressure profile in healthy elderly male volunteers.** *The Journal of urology* 2006, **176**:1034-1039, discussion 1039.
43. Dobrowolski L, Sadowski J: **Furosemide-induced renal medullary hypoperfusion in the rat: role of tissue tonicity, prostaglandins and angiotensin II.** *J Physiol* 2005, **567**:613-620.
44. Sonnenberg H: **Effects of furosemide, acetazolamide, and mannitol on medullary collecting-duct function in the rat kidney.** *Pflugers Arch* 1978, **373**:113-123.
45. Roper P, Callaway J, Armstrong W: **Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus: a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study.** *J Neurosci* 2004, **24**:4818-4831.
46. Barron WM, Stamoutsos BA, Lindheimer MD: **Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat.** *J Clin Invest* 1984, **73**:923-932.
47. Kaneko K, Okada K, Ishikawa S, Kuzuya T, Saito T: **Role of atrial natriuretic peptide in natriuresis in volume-expanded rats.** *Am J Physiol* 1987, **253**:R877-882.
48. Dicker SE, Nunn J: **The role of the antidiuretic hormone during water deprivation in rats.** *J Physiol* 1957, **136**:235-248.
49. Nose H, Morimoto T, Ogura K: **Distribution of water losses among fluid compartments of tissues under thermal dehydration in the rat.** *Jpn J Physiol* 1983, **33**:1019-1029.
50. Fitzsimons JT: **Drinking by nephrectomized rats injected with various substances.** *J Physiol* 1961, **155**:563-579.
51. Robinson DH, Conrad KP, Edwards BR: **Comparison of body fluid compartment sizes in Brattleboro homozygous and Long-Evans rats.** *Am J Physiol* 1984, **247**:F234-239.
52. Horowitz M, Samueloff S: **Plasma water shifts during thermal dehydration.** *J Appl Physiol* 1979, **47**:738-744.
53. Barron WM, Durr JA, Schrier RW, Lindheimer MD: **Role of hemodynamic factors in osmoregulatory alterations of rat pregnancy.** *Am J Physiol* 1989, **257**:R909-916.
54. Barron WM, Schreiber J, Lindheimer MD: **Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat.** *Am J Physiol* 1986, **250**:E352-361.
55. Iwasaki Y, Gaskill MB, Robertson GL: **Adaptive resetting of the volume control of vasopressin secretion during sustained hypovolemia.** *Am J Physiol* 1995, **268**:R349-357.
56. Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y: **Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**:E337-346.
57. Paul RV, Ferguson T, Navar LG: **ANF secretion and renal responses to volume expansion with equilibrated blood.** *Am J Physiol* 1988, **255**:F936-943.
58. Yuan K, Jin X, Gao S, Shah A, Kim SY, Kim SZ, Kim SH: **Osmoregulation of natriuretic peptide receptors in bromoethylamine-treated rat kidney.** *Peptides* 2009, **30**:1137-1143.
59. Beierwaltes WH, Arendshorst WJ, Klemmer PJ: **Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension* 1982, **4**:908-915.

doi:10.1186/1472-6793-10-17

Cite this article as: Nadeau et al.: Computational simulation of vasopressin secretion using a rat model of the water and electrolyte homeostasis. *BMC Physiology* 2010 **10**:17.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6.2 Versions finales des fichiers additionnels du premier article publié

Appendix 1: Comparison of the impact of osmotic and volemic fluctuation on vasopressin secretion.

AVP secretion (pg/ml)					
Conditions		Osmotic Contribution			Volemic Contribution
[Na ⁺] (%)	ECF _v (%)	Δax	Δbx	Absolute total Δ(a+b)x	Δc
Hyponatremia -2.86%	-2.86	-0.728	-0.094	0.822	0.814
	0	-0.728	0.000	0.728	0.000
	2.86	-0.728	0.094	0.634	0.000
Normal	-2.86	0.000	0.157	0.157	0.814
	0	0.000	0.000	0.000	0.000
	2.86	0.000	-0.157	0.157	0.000
Hypernatremia +2.86%	-2.86	0.728	0.409	1.137	0.814
	0	0.728	0.000	0.728	0.000
	2.86	0.728	0.409	0.319	0.000

AVP (pg/ml)					
Conditions		Osmotic Contribution			Volemic Contribution
[Na ⁺] (%)	ECF _v (%)	Δax	Δbx	Absolute total Δ(a+b)x	Δc
Hyponatremia -4%	-4	-1.019	-0.273	1.292	1.266
	0	-1.019	0.000	1.019	0.000
	4	-1.019	0.273	0.746	0.000
Normal	-4	0.000	0.220	0.220	1.266
	0	0.000	0.000	0.455	0.000
	4	0.000	-0.220	0.220	0.000
Hypernatremia +4%	-4	1.019	0.713	1.732	1.266
	0	1.019	0.000	1.019	0.000
	4	1.019	-0.713	0.306	0.000

The appendix shows the relative impact of variations in extracellular Na⁺ level (osmolality) and volume on the secretion of AVP, based on equation 1 presented in the methods. This equation can be expressed as $y = (a+b)x + c$ with:
 $a = 0.91$

$$b = -11 \frac{ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)}$$

$$x = 200([\text{Na}^+]_{\text{ECF}} - 0.1375)$$

$$c = 1.3 \cdot e^{-17 \frac{ECF_{\Delta V}(t)}{ECF_V(t=0)}}$$

The first condition (upper table) compares a change of $\pm 2.86\%$ of ECF $[\text{Na}^+]$ (± 4 mmol Na^+) and a change of $\pm 2.86\%$ of ECF volume on AVP secretion. This condition represents typical daily fluctuation of ECF $[\text{Na}^+]$ (142 mmol: daily mean vs. 145 mmol: mean $[\text{Na}^+]$ peak). The second condition (lower table) compares a change of $\pm 4\%$ of ECF $[\text{Na}^+]$ (± 5.6 mmol Na^+) and a change of $\pm 4\%$ of ECF volume on AVP secretion. This condition represents the change in ECF $[\text{Na}^+]$ that was set in the model as the threshold for drinking. The baseline value for each term in equation 1 (obtained with 0% change in ECF $[\text{Na}^+]$ and volume) was subtracted to enhance the relative impact of the changes on AVP secretion.

Appendix 2: Calculation of the fixed sodium clearance for the simulation

Symbol	Description
C_{Na^+}	Sodium clearance
C_{Cr}	Creatinine clearance
FE_{Na^+}	Sodium fractional excretion
GFR	Glomerular filtration rate
$[Na^+]_{ECF}$	ECF sodium concentration
Na^+_{Urine}	Urine sodium excretion rate

Ahloulay et al. 1999

From Table 1 :

$$Na^+_{Urine} = 2.54 \pm 0.34 (mmol/day \cdot 330g \text{ bw}) = 0.00054 \pm 0.00007 (mmol/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (1)$$

In this study the author indicates that plasma $[Na^+]$ was normal (no value given). Therefore, we used a wide $[Na^+]_{ECF}$ in the normal range :

$$[Na^+]_{ECF} = 0.140 \pm 0.005 (mmol/ml) \quad (2)$$

The maximal and minimal Na^+ clearance is computed as followed :

$$Max(C_{Na^+}) = Max(Na^+_{Urine}) / Min([Na^+]_{ECF}) = 0.0045 (ml/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (3)$$

$$Min(C_{Na^+}) = Min(Na^+_{Urine}) / Max([Na^+]_{ECF}) = 0.0032 (ml/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (4)$$

For a rat of 255 g :

$$Max(C_{Na^+}) = 0.012 (ml/min) \text{ and } Min(C_{Na^+}) = 0.0083 (ml/min) \quad (5)$$

Calculated C_{Na^+} of :

$$\boxed{C_{Na^+} = 10.15 \pm 1.85 (\mu l/min)} \quad (6)$$

Boer et al. 2005

Estimation from Figure 2 :

$$FE_{Na^+} = 0.008 \pm 0.001 \quad (7)$$

$$C_{Cr} = 360 \pm 15(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (8)$$

The maximal and minimal Na^+ clearance is computed as followed :

$$Max(C_{Na^+}) = Max(FE_{Na^+}) \cdot Max(GFR) = 0.009 \cdot 375 = 3.3(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (9)$$

$$Min(C_{Na^+}) = Min(FE_{Na^+}) \cdot Min(GFR) = 0.007 \cdot 345 = 2.4(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (10)$$

For a rat of 255 g :

$$Max(C_{Na^+}) = 0.0086(ml/min) \text{ and } Min(C_{Na^+}) = 0.0062(ml/min) \quad (11)$$

Calculated C_{Na^+} of :

$$\boxed{C_{Na^+} = 7.4 \pm 1.2(\mu l/min)} \quad (12)$$

Jonassen et al. 2000

From Table 3 :

$$FE_{Na^+} = 0.0034 \pm 0.0003 \quad (13)$$

From Table 2 :

$$GFR = 962 \pm 58(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (14)$$

The maximal and minimal Na^+ clearance is computed as followed :

$$Max(C_{Na^+}) = Max(FE_{Na^+}) \cdot Max(GFR) = 0.0037 \cdot 1020 = 3.8(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (15)$$

$$Min(C_{Na^+}) = Min(FE_{Na^+}) \cdot Min(GFR) = 0.0031 \cdot 904 = 2.8(\mu l/min \cdot 100g \text{ bw}) \quad (16)$$

For a rat of 255 g :

$$Max(C_{Na^+}) = 0.0096(ml/min) \text{ and } Min(C_{Na^+}) = 0.0071(ml/min) \quad (17)$$

Calculated C_{Na^+} of :

$$\boxed{C_{Na^+} = 8.35 \pm 1.25(\mu l/min)} \quad (18)$$

Shirley et al. 1994

From Figure 1 :

$$Na_{Urine}^+ = 1.8 \pm 0.1(mmol/day) = 0.00125 \pm 0.00007(mmol/min) \quad (19)$$

From Table 1 :

$$[Na_{ECF}^+] = 0.147 \pm 0.001(mmol/ml) \quad (20)$$

The maximal and minimal Na^+ clearance allowed is computed as followed :

$$Max(C_{Na^+}) = Max(Na_{Urine}^+)/Min([Na_{ECF}^+]) = 0.0090(ml/min) \quad (21)$$

$$Min(C_{Na^+}) = Min(Na_{Urine}^+)/Max([Na_{ECF}^+]) = 0.0080(ml/min) \quad (22)$$

The value was not scaled to weight because the rat weight used in the model is in the range of the animal weight used in this study (245 ± 4 g to 264 ± 5)

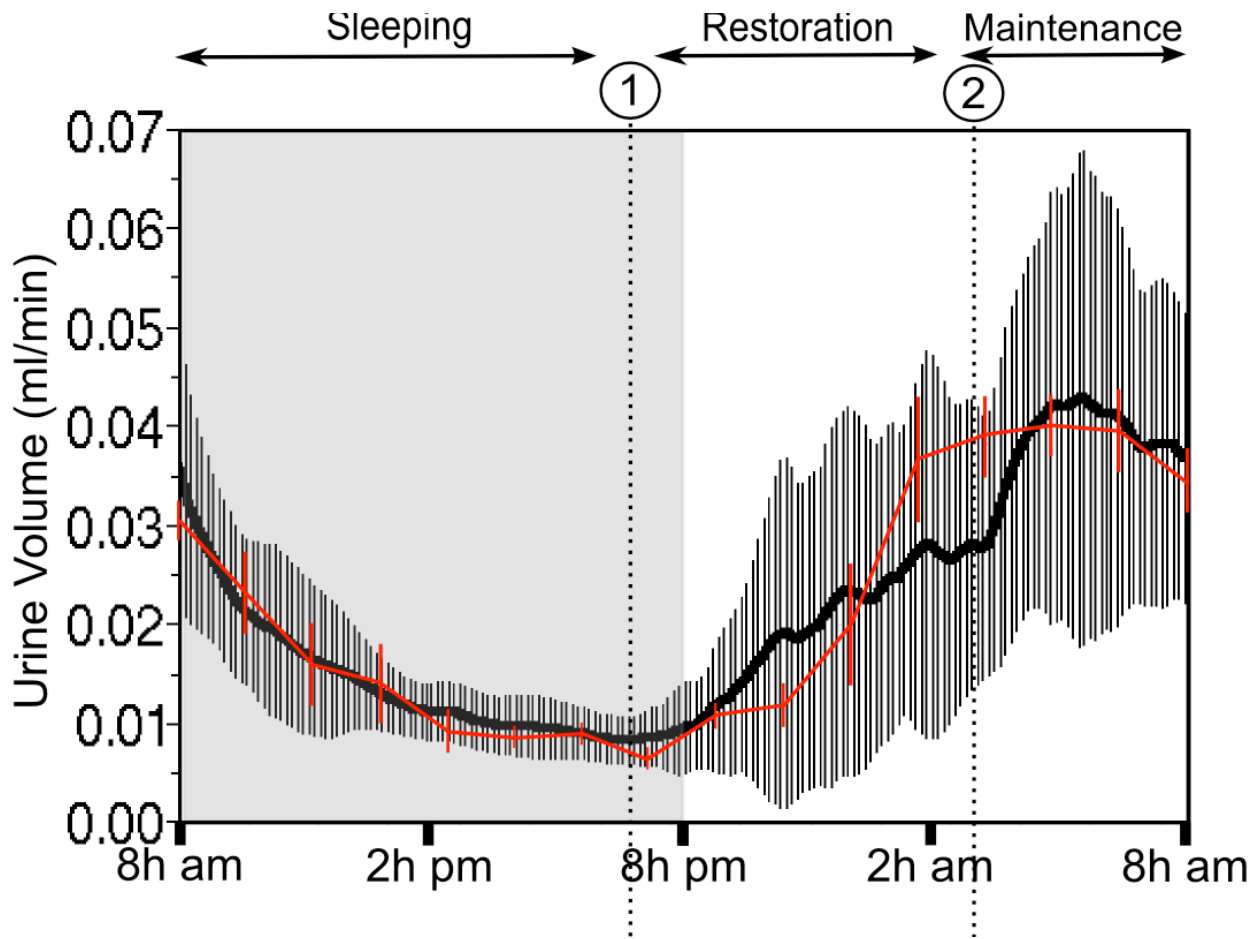
Calculated C_{Na^+} of :

$$\boxed{C_{Na^+} = 8.5 \pm 0.5(\mu l/min)} \quad (23)$$

Sodium clearance value used in the simulation

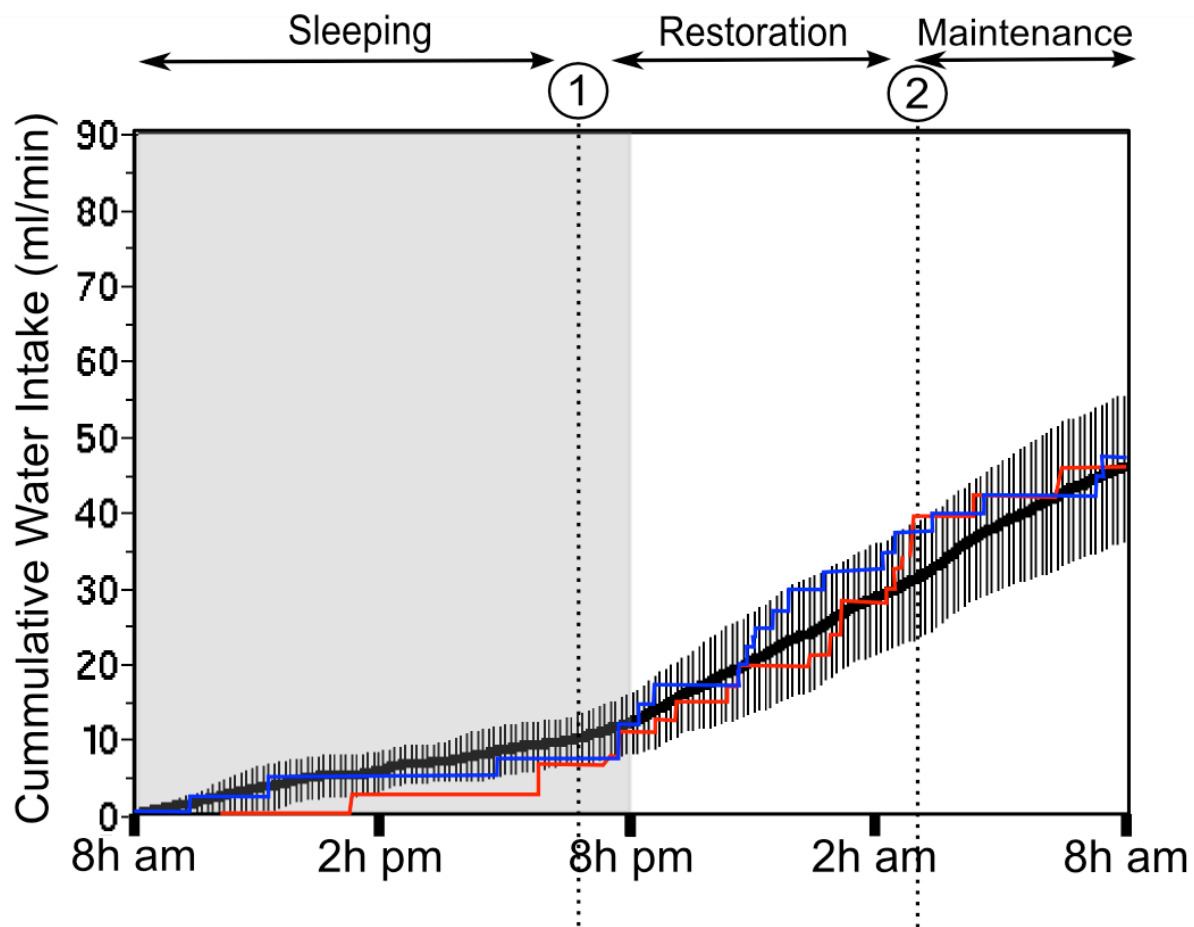
The mean of the calculated values of C_{Na^+} is used in the model : $(10.15 + 8.35 + 7.4 + 8.5)/4 = \boxed{8.6\mu l/min}$. This fixed value of C_{Na^+} is well within the permissible range calculated in the four studies of reference.

Appendix 3: Comparison of the simulated dynamics of three hydromineral parameters with experimental data

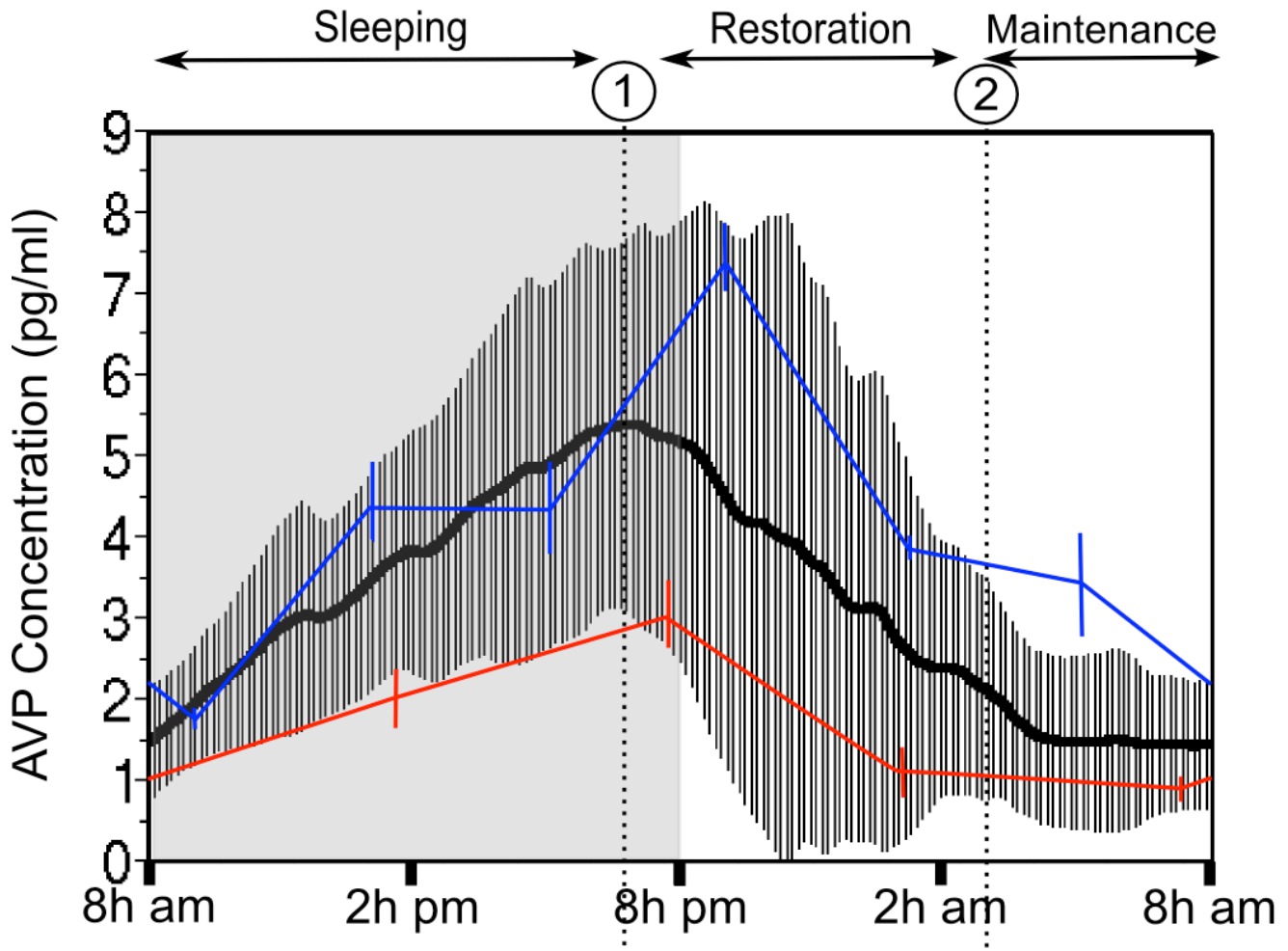


A) Validation of the predicted dynamic of the urine volume.

The thick black line and bars simulate the mean \pm SD of the urine volume over 20 consecutive days. The thin red line and bars illustrate the experimental measurements of the urine volume for 24h (mean \pm SE) obtained from Aizman et al. 1994 (redrawn from Figure 2 with permission from APS: Identifier R393-3). The experimental measurements (16 time points) fit precisely within one order of SD of the predicted value.



B) Validation of the predicted dynamic of cumulative water intake. The thick black line and bars simulate the the mean \pm SD of cumulative water intake over 20 consecutive days. The blue line illustrates one particular trajectory of the simulation. The red line illustrates experimental data obtained from Fitzsimons et al. 1969 (7 rats). These data were linearly rescaled so that the last experimental and predicted value (8h AM, right) is identical. The small discrepancy between the experimental and simulated data observed during the sleeping period is likely caused by the unmatched number of drinking bouts that occur during the period (see results for details).



C) Validation of the predicted dynamic of AVP concentration. The thick black line and bars simulate the mean \pm SD of AVP concentration over 20 consecutive days. The blue and red line illustrates experimental measurements (24h) obtained from Granda et al. 1998 (6 time points; with permission from Elsevier; license # 2473100864208) and from Windle et al. 1992, respectively (with permission from the Society for Endocrinology). These data illustrate the variability of the experimental data and validate the circadian fluctuation of the simulated AVP secretion.

6.3 Version finale du deuxième article publié

New determinants of firing rates and patterns of vasopressinergic magnocellular neurons: predictions using a mathematical model of osmodetection

Louis Nadeau · Didier Mougnot

Received: 17 December 2010 / Revised: 21 February 2011 / Accepted: 22 February 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Arginine vasopressin (AVP), one of the most important hormones involved in hydromineral homeostasis, is secreted by hypothalamic magnocellular neurons (MCNs). Here, we implemented two critical parameters for MCN physiology into a Hodgkin-Huxley simulation of the MCN. By incorporating the mechanosensitive channel (MSC) responsible for osmodetection and the synaptic inputs whose frequencies are modulated by changes in ambient osmolality into our model, we were able to develop an improved model with increased physiological relevance and gain new insight into the determinants of the firing patterns of AVP magnocellular neurons. Our results with this MCN model predict that 1) a single MCN is able to display all the firing patterns experimentally observed: silent, irregular, phasic and continuous firing patterns; 2) under conditions of hyperosmolality, burst durations are regulated by the frequency-dependent fatigue of dynorphin secretion; and 3) the transitions between firing patterns are controlled by EPSP and IPSP frequencies (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz). Moreover, this simulation predicts that EPSPs and IPSPs do not modify the spiking frequency (SF) of phasic firing patterns (0.0034 Hz/Hz [EPSP]; 0.0012 Hz/Hz [IPSP]). Rather, these afferents strongly regulate SF

during irregular and continuous firing patterns (0.075 Hz/Hz [EPSP]; 0.027 Hz/Hz [IPSP]). The use of the realistic MCN model developed here allows for an improved understanding of the determinants driving the firing patterns and spiking frequencies of vasopressinergic magnocellular neurons.

Keywords Dynorphin · Hydromineral homeostasis · Mechanosensitive channel · Osmoreceptor · Stretch-inactivated channel · Supraoptic nucleus

1 Introduction

Arginine vasopressin (AVP) is a neuropeptide that plays a critical role in hydromineral homeostasis (HH). This hormone exhibits anti-diuretic effects at the level of the kidney and causes a reduction in urine volume and an increase in urine concentration. The magnocellular neurons (MCNs) of both the supraoptic and the paraventricular nuclei (SON, PVN) synthesize AVP, which is then released into the general circulation at the level of the neurohypophysis and the median eminence. AVP secretion is regulated by the spiking frequency and firing patterns of MCNs (Bicknell 1988). Interestingly, physiological stimuli that trigger AVP secretion, such as increased plasma osmolality or hypovolemia (Dunn et al. 1973) have also been shown to increase the spiking frequency of MCNs and to modify their pattern of spike discharges (Wakerly et al. 1975; Brimble and Dyball 1977). Indeed, hyperosmolality depolarizes the MCNs of the SON via the activation of a mechanosensitive channel (MSC) (Oliet and Bourque 1993a) in response to reductions in cell membrane stretching induced by

Action Editor: Bard Ermentrout

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10827-011-0321-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. Nadeau · D. Mougnot (✉)
Neurosciences and Université Laval,
Centre de recherche du CHUQ (CHUL),
Québec, G1V 4G2, Canada
e-mail: Didier.Mougnot@crchul.ulaval.ca

changes in osmotic pressure (Zhang et al. 2007). MCNs also receive both excitatory and inhibitory synaptic inputs, and it has been shown that the frequency of excitatory synaptic currents (EPSCs) increases following the direct application of hyperosmotic artificial cerebrospinal fluid (aCSF) in the vascular organ of the lamina terminalis (Richard and Bourque 1995; Trudel and Bourque 2010).

The goal of the present study was to clarify the main determinants of osmolality-induced changes in MCN spiking frequency and firing patterns (Brimble and Dyball 1977; Brown et al. 2007; Wakerley et al. 1978). We specifically addressed whether these changes resulted solely from the MSC-induced depolarization of the MCN (an intrinsic factor), from a change in the frequency of the afferent synaptic transmission (an extrinsic factor), or from both. To investigate the precise role of these two determinants on MCN electrical activity simultaneously, we took advantage of a computational model of vasopressin MCNs. Computational models of MCNs have been developed previously, and their degree of complexity is directly linked to the scientific question addressed by the designers (Leng et al. 2001; Roper et al. 2003, 2004; Komendantov et al. 2007). In the present study, a neuronal Hodgkin-Huxley model was utilized because it can take into account the effects of the MSC, afferent synaptic inputs, and the multiple potential firing patterns of MCNs. In order to accommodate these factors and obtain a realistic simulation of the MCN, we deeply modified a Hodgkin-Huxley model that had been developed previously (Roper et al. 2004).

2 Methods

The following sections describe in detail the biological basis and the mathematical equations used to model the MSC and the synaptic afferents to the MCNs. All numerical integrations were performed using an explicit Euler algorithm with a time step of 1/240 ms coded in Scilab language. Scilab is an open source equivalent to Matlab. The version of the simulation used in this study was Magno-0.42.

2.1 Model of the mechanosensitive channel

The MSC, also called the stretch-inactivated channel (SIC), is a channel whose opening is tightly linked to the mechanical tension of the cellular membrane. Although this channel is present in SON neurons and is the most important intrinsic component involved in osmodetection (Oliet and Bourque 1993a; Bourque 1998), the MSC was not included in Roper’s model (Roper et al. 2004). Here, we used the following equation, which was based on a

modified form of the Hodgkin-Huxley equation, to model the current flowing through the MSC (I_{MSC}):

$$I_{MSC}(t) = g_{MSC} \cdot m_{MSC}(t, \Delta Osm) \cdot (V(t) - E_{MSC}([Na^+]_{out})) \tag{1}$$

g_{MSC} is the conductance of the channel, m_{MSC} is the activation function, $V(t)$ is the membrane potential and E_{MSC} is the reversal potential of I_{MSC} . Note that this equation differs from the classical form of the Hodgkin-Huxley equation at two levels: 1) the m_{MSC} function includes an osmotic dependence, and 2) E_{MSC} is explicitly dependent on the extracellular Na^+ concentration ($[Na^+]_{out}$) to take into account the unusual dependence of E_{MSC} on this cation. Note that E_{MSC} is also related to other cations according to the Goldman-Hodgkin-Katz equation. These two particularities of the current MSC equation are detailed later in the text.

2.2 Osmotic dependence of the activation function m_{MSC}

The activation function (m_{MSC}) of the MSC channel was based on experimental data reported in three distinct studies (Zhang et al. 2007; Zhang and Bourque 2003; Oliet and Bourque 1993b). Online Resource 1 describes in detail all of the assumptions and calculations that led to the equations for computing the activation function of I_{MSC} :

$$\frac{\partial m_{MSC}(t)}{\partial t} = \frac{m_{\infty MSC} - m_{MSC}(t)}{\tau_{m_{MSC}}} \tag{2}$$

$$\text{with } m_{\infty MSC} = 1 + 0.0297 \cdot \Delta Osm \quad \text{and} \quad \tau_{m_{MSC}} = 50000 \tag{3}$$

In addition, saturation for the change in osmolality was included in the simulation: $\Delta Osm > -25$ mosmol/L. This saturation was based on previous experimental data reporting that no change in the MSC current occurred for CSF osmolalities lower than 270 mosmol/L (Oliet and Bourque 1993b). The time constant ($\tau_{m_{MSC}}$) was approximated using the change in conductance and volume of the MCN as a function of time (Zhang et al. 2007).

2.3 Calculation of g_{MSC} and update of g_{Na} and g_K

The Roper’s model of the MCN includes a Na^+ leak channel and a K^+ leak channel, the conductance of which were estimated to be $0.018 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $0.066 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively. However, the fact that the Roper model does not account for the MSC results in an overestimation of g_{Na} and an underestimation of g_K . Therefore, the implementation of the MSC in the present model required an update of the

initial leak g_{Na} and g_K . Online Resource 2 provides a detailed description of the calculation of g_{MSC} ($0.0235 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$), g_{Na} ($0.0169 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) and g_K ($0.0745 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$) used in the present model.

2.4 Reversal potential of I_{MSC}

It has been shown that the Na^+ permeability of the MSC depends on the $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ (Voisin et al. 1999). Therefore, the E_{MSC} should vary as a function of $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$. This characteristic of the MSC was included in the present model of the MCN to adequately simulate the capability of the MCN to detect changes in $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$. The calculation of E_{MSC} was performed using a typical Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) equation for two cations (Na^+ and K^+) at 25°C :

$$E_{MSC} = 26.4 \cdot \ln\left(\frac{P_{Na^+}/P_{K^+} \cdot [\text{Na}^+]_{\text{out}} + [\text{K}^+]_{\text{out}}}{P_{Na^+}/P_{K^+} \cdot [\text{Na}^+]_{\text{in}} + [\text{K}^+]_{\text{in}}}\right) \quad (4)$$

However, Fig. 2 of Voisin et al. clearly indicates that E_{MSC} cannot be calculated using a fixed relative permeability of Na^+ and K^+ ions (P_{Na^+}/P_{K^+}) due to its dependence on $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$. In light of this, we used the following function:

$$P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.182 + ([\text{Na}^+]_{\text{out}} - 105) \cdot 0.00213 \quad (5)$$

Equation (5) was based on a linear fit of the experimental data reported in Fig. 2(d) of Voisin et al. 1999. In order to minimize error, the simulation was restricted to the range of $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ reported in Fig. 2(d) (i.e. from 105 mmol/L to 165 mmol/L). Indeed, any change in the behavior of the channel beyond this range is not known (saturation or non-linearity may occur outside of this range).

2.5 Synaptic transmission afferent to the SON

The vascular organ of the lamina terminalis (OVLT), the median preoptic nucleus (MnPO) and the subformal organ (SFO) have all been shown to respond to changes in osmolality and/or in $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ (Richard and Bourque 1995; McKinley et al. 2004; Tremblay et al. 2010), and this sensory information is then forwarded to the SON. Indeed, perfusion of hyperosmotic aCSF into the OVLT increases the frequency of excitatory post synaptic potentials (EPSPs) in the SON (Bourque 1998). However, no change in the frequency of inhibitory synaptic potentials (IPSPs) was observed (Richard and Bourque 1995). Alternatively, it has been shown that the MnPO sends IPSPs to the SON. It was thus hypothesized that this inhibitory transmission might be important to linearize the SON response to osmotic change (Richard and Bourque 1995; Leng et al. 2001). Synaptic transmission afferent to the SON might be a critical parameter to shape MCN electrical activity induced by changes in

osmolality. This parameter was absent in Roper's model but was implemented in the present model of the MCN.

2.6 EPSP and IPSP frequencies used in the MCN model

The frequency of the EPSPs implemented in the present MCN model is 3.53 Hz (mean of 3.43 Hz (Richard and Bourque 1995) and 3.63 Hz (Trudel and Bourque 2003)) under normal CSF osmolality (295 mosmol/L). Because EPSP frequency is dependent on osmolality, a multiplicative factor (M) was introduced in the model:

$$M = 2.39 \cdot 10^{-22} \cdot Osm^{8.79} \quad (6)$$

This equation was fitted from the data reported in Fig. 5 (a) of Richard and Bourque 1995. This power law does not represent any specific biological mechanism underlying osmolality-induced changes in EPSP frequency. Rather, it is simply used to minimize the fitting error.

The frequency of IPSPs implemented in the present MCN model is 4 Hz (Richard and Bourque 1995; Li et al. 2007) under normal CSF osmolality (295 mosmol/L). In the present model, the IPSP frequency is fixed and does not depend on changes in osmolality (Richard and Bourque 1995).

2.7 EPSP and IPSP amplitude and time constant

Reported amplitudes of synaptic events show a strong heterogeneity among studies (2 to 20 mV) (Inenaga et al. 1997; Li et al. 2007; Shibuya et al. 1998; Wuarin and Dudek 1993; Boehmer et al. 2000; Richard and Bourque 1995). These variations in EPSP amplitude could result from an asynchronous barrage of many small excitatory quanta triggered by electrical stimulation of excitatory fibers (Iremonger and Bains 2007). Each of these quanta displays a small amplitude (0.4 to 9.2 mV, mean 2.1 mV), and the summation of these quanta produced large amplitude EPSPs (2.6 to 18.9 mV, mean 8.4 mV). In our simulation, the mean quantum amplitude observed was 2.1 mV for EPSPs. The same value was used for the IPSPs. In addition, a previous report by Iremonger et al. had observed that the decay of large (summed) EPSPs was slower than the decay of small quanta: 34.9 ms and 17.5 ms, respectively. Therefore, we used 17 ms for the time constant of both EPSPs and IPSPs in our simulation.

3 Results

The first part of the present study consists of the validation of our updated MCN model. This validation was essential to test the implementation of the MSC and its ability to

detect changes in osmolality and/or Na^+ concentration. For that purpose, we compared the simulated results obtained from this model with experimental electrophysiological recordings obtained from *in vitro* preparations (Zhang et al. 2007; Voisin et al. 1999). A realistic model of the MCN should be able to simulate the distinct patterns of spike discharges that have been observed in MCNs *in vivo* and *in vitro* (Brimble and Dyball 1977; Brimble et al. 1978; Wakerley et al. 1978; Andrew and Dudek 1984; Armstrong et al. 1994). The correct prediction of MCN spiking behavior in the context of a change in osmolality is required to predict with high confidence the impact of synaptic transmission on osmolality-dependent changes in firing patterns and spiking frequency.

3.1 IV Curves of the MCN under hypo- and hyperosmotic CSF

One simple way to validate the implementation of the MSC model is to compare the simulated current-to-voltage relationship (IV curve) with experimental data. Experimental data were recorded from isolated MCNs in the presence of TTX (these unpublished data were kindly provided by Dr. Charles W. Bourque from McGill University, Montreal, QC, Canada; see (Zhang et al. 2007) for detailed experimental protocols). To mimic this experimental procedure, we assumed that each MCN is a sphere with a surface area of $1.9516 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$ and set the voltage-activated Na^+ conductance to 0 mS/cm^2 . Figure 1 illustrates the simulated IV curve under isosmotic CSF (295 mosmol/L) that was compared with the mean experimental IV curve of the MCN recorded under isosmotic aCSF ($n=9$). These results indicate that the simulated IV curve under isosmotic conditions was similar to the experimental IV curve (within one standard deviation), thus validating the implementation

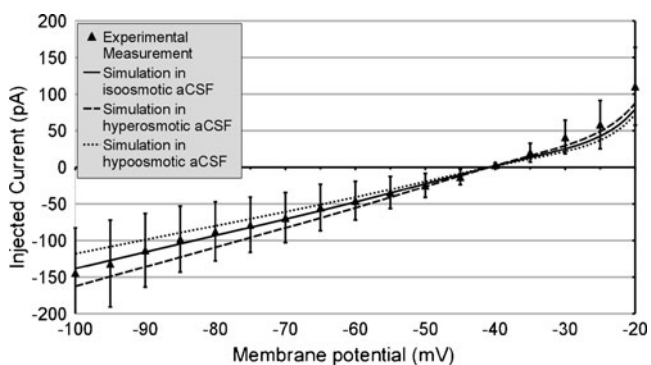


Fig. 1 Comparison of the simulated IV curves with experimental data. IV curves were simulated under control conditions (*black line*), hypoosmotic conditions (*dotted line*) and hyperosmotic conditions (*dashed line*). The mean experimental IV curve was obtained in isosmotic conditions (*black triangle*; $n=9$) and was normalized to -41 mV , the reversal potential of the MSC current in this experiment. The error bars display the standard deviation of the experimental data after normalization

of the MSC and the updated Na^+ and K^+ leak currents employed in the present MCN model. In addition, we also validated the capability of the MSC to detect changes in osmolality by comparing the control IV curve (isosmotic condition) with the IV curve obtained under both hyperosmotic (325 mosmol/l) and hypoosmotic aCSF (265 mosmol/L; Fig. 1).

3.2 IV Curves of the MCN under hypo- and hypernatremic CSF

Changes in the extracellular Na^+ concentration have an impact on the simulated electrical properties of the MCN because they affect the reversal potential of all currents showing Na^+ permeability. However, only the reversal potential of the MSC current will be significantly altered, as experimental data have demonstrated the high Na^+ sensitivity of the MSC (see method: reversal potential of I_{MSC}). In order to validate the implementation of the Na^+ sensitivity of the MSC, we simulated IV curves generated under two distinct CSF $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ (135 and 150 mmol/L Na^+) in the presence or absence of mannitol (Fig. 2). These $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ represent the high and low extremes of physiological fluctuations of the CSF $[\text{Na}^+]$ within the hypo and hypernatremic range, compared to normal aCSF (142 mmol/L of Na^+). The simulated IV curves indicate that the E_{MSC} shifted from -35.8 mV to -30.4 mV when $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ was increased from 135 to 150 Na^+ mmol/L. These simulated values of E_{MSC} were in agreement with the experimental values of E_{MSC} reported previously by Voisin et al. 1999 (Fig. 2(c) $-35 \pm 3 \text{ mV}$ with 135 mmol/L Na^+ and $-30 \pm 4 \text{ mV}$ with 150 mmol/L). The similarity between the simulated and experimental E_{MSC} validates the effective implementation of MSC Na^+ sensitivity in the present MCN model. Moreover, we tested the influence of E_{MSC} on the firing activity of MCNs. This was achieved by

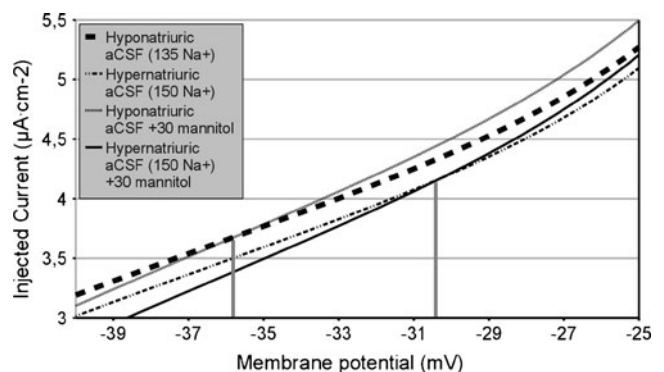


Fig. 2 Validation of the Na^+ sensitivity of the MSC implemented in the MCN model. The simulated reversal potential of the MSC current estimated in hyponatremic aCSF (-35.8 mV) and in hypernatremic aCSF (-30.4 mV) was in agreement with the reversal potential reported in experimental data ($-35 \pm 3 \text{ mV}$ and $-30 \pm 4 \text{ mV}$, respectively). The *vertical gray bars* indicate the reversal potential (mV)

comparing two specific simulations using either mannitol or NaCl to increase osmolality. These simulations indicated that NaCl has a greater impact on MCN spiking frequency (SF, 598 spikes/100 s vs. 498 spikes/100 s) and firing patterns (phasic vs. continuous) than mannitol (Online Resource 3).

3.3 MSC and synaptic impact on osmolality-induced changes in the MCN firing pattern

It has been observed experimentally that changes in osmolality (Brimble and Dyball 1977; Brimble et al. 1978; Wakerley et al. 1978) and/or membrane potential (Andrew and Dudek 1984; Armstrong et al. 1994) can alter the spiking behavior of the MCN. A correct implementation of the intrinsic (the MSC) and extrinsic (afferent synaptic transmission) factors in the MCN model should be able to reproduce these changes in spiking behavior described experimentally (the silent, phasic, irregular and fast continuous firing patterns). Here, we show that the present model of the MCN can simulate the changes in spiking behavior observed experimentally (Fig. 3). For example, a simulated MCN displaying a phasic pattern of bursts (Fig. 3(b1)) makes a qualitative transition towards a silent firing pattern when exposed to hyposmotic aCSF (−30 mosmol/L; Fig. 3(a1)). The same MCN showing phasic spiking behavior (Fig. 3(b1)) makes a transition toward an irregular firing pattern when the membrane potential is increased (Fig. 3(b2)). Similarly, the irregular firing pattern is changed into a continuous firing pattern when osmolality is increased (+30 mosmol/L; Fig. 3(c2)). Interestingly, all of the simulated changes in spiking behavior can be obtained from a single MCN model by simply changing the osmolality and/or membrane potential and not the internal parameters of the model, such as the conductance of the currents implemented in the initial MCN model of Roper et al. (2004). These simulations thus demonstrate that the combined implementation of the MSC and of the synaptic afferents is appropriate and sufficient to generate the four existing firing patterns in a single MCN.

3.4 Prediction of a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal

Experimental recordings have shown that the intraburst frequency and the length of the burst are both increased in response to increased osmolality (Brimble and Dyball 1977; Brimble et al. 1978; Wakerley et al. 1978). However, the simulation of the osmolality-induced phasic spiking pattern is characterized by a decrease in burst length (Fig. 3(b1), (c1)). In the present model of the MCN, the burst length is solely controlled by the dynorphin signal (see (Roper et al. 2004); signal D), which is dependent on

the number of spikes. Consequently, an increased spiking frequency during a burst will reduce the length of the burst. The contradiction between the experimental data showing prolonged burst durations under hyperosmotic conditions and the simulated shorter burst duration strongly suggests that the dynorphin signal might be modulated by a yet unknown mechanism. In the present study, we predict that this mechanism might be a fatigue or a failure mechanism associated with dynorphin secretion. Moreover, this fatigue or failure mechanism has to be frequency dependent. Interestingly, it has been demonstrated that the secretion of AVP at MCN terminals is controlled by a frequency-dependent fatigue (Hobbach et al. 1988). We therefore implemented a frequency-dependent fatigue of the dynorphin signal, based on Fig. 2 of Hobbach et al. (1988). To do this, we used a decreasing exponential that was adjusted using experimental data (Hobbach et al. 1988) to have a value of 1 at 15 Hz and a value of 0.1 at 30 Hz. The function used was:

$$f = \begin{cases} 1 & \text{if } \nu_{inst} < 15 \\ 1.053 - (1 + \exp(\frac{\nu_{inst}-22.5}{-2.5}))^{-1} & \text{if } \nu_{inst} > 15 \end{cases} \quad (7)$$

f is a scaling factor that modulates the increase of the dynorphin signal resulting from the spiking activity of the MCNs. ν_{inst} (Hz) is the instantaneous SF (calculated from the last interspike interval).

Implementation of this fatigue mechanism (Eq. (7)) in the MCN model resolved the observed discrepancy between the simulation and the experimental data. Simulations of MCN spiking activity under hyperosmotic CSF displayed a longer burst duration compared to isosmotic conditions (14, 15 and 19 s burst duration under hyperosmotic conditions vs. 10, 10 and 12 s burst duration under isosmotic conditions; Fig. 4). This simulation validates the presence of a fatigue-dependent mechanism of the dynorphin signal that controls burst duration during osmotic challenges.

3.5 Prediction of the impact of the synaptic events on burst generation

In vivo experiments have shown that phasic bursting is not intrinsically regenerative but requires a sustained glutamatergic drive (Brown et al. 2004 21). In contrast, *in vitro* experiments have shown that bursting activity is intrinsically regenerative and does not require any synaptic inputs (Andrew 1987; Hatton 1982). Here we used a computer simulation to shed additional light on the role of glutamatergic synaptic input on burst generation. To do this, we used two 100 s simulations of a MCN displaying a phasic firing pattern with an injected current of either 1.77 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ or 2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. This small difference in depolarization (about

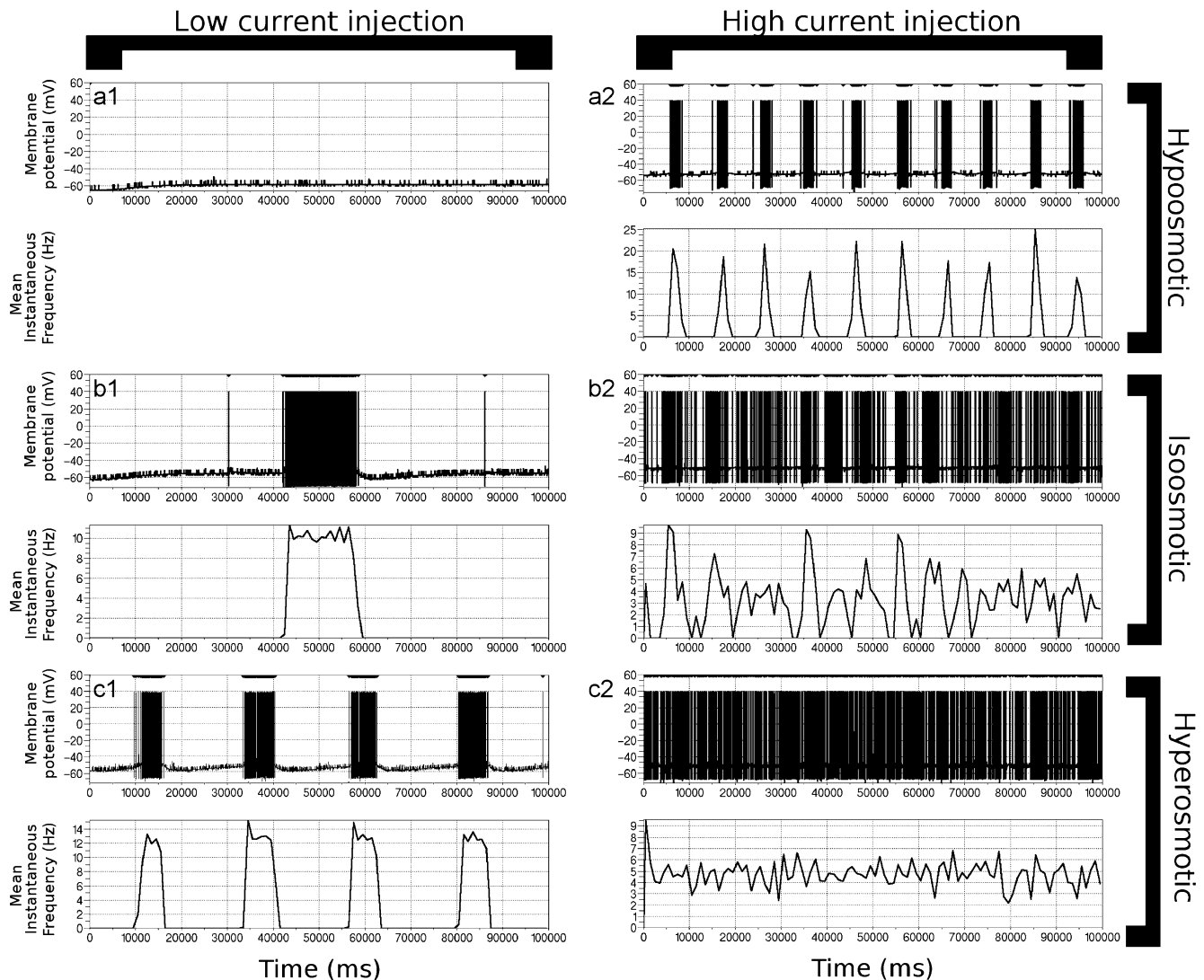


Fig. 3 A single simulated MCN displays qualitative shifts in its firing pattern. The first column illustrates the qualitative transition between different firing patterns induced by a simulated change in osmolality (**a1**: hypoosmotic CSF, -30 mosmol/L; **b1**: isosmotic CSF; **c1**: hyperosmotic CSF, $+30$ mosmol/l). The phasic firing pattern under isosmotic conditions is simulated by a current injection of $1.25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. The second column illustrates the impact of an additional membrane

depolarization ($+1.75 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) superimposed onto the osmolality-induced transitions in firing pattern. The size of the bin for the mean instantaneous frequency is $1,000$ ms. Note that under these modeling conditions, the mean instantaneous spiking frequency is always above 0 Hz in the continuous firing pattern (**c2**). The irregular firing pattern is characterized by a mean instantaneous frequency that is null at many time points of the simulation (**b2**)

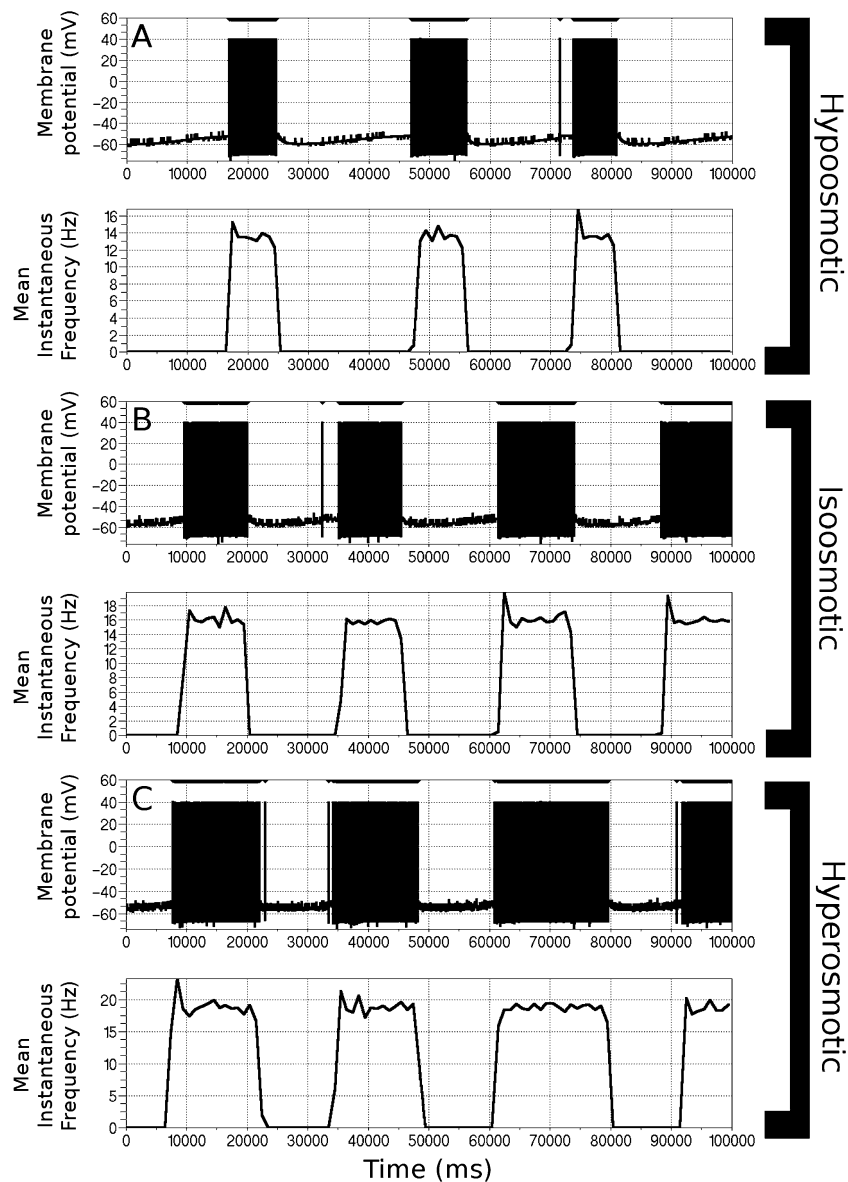
2 mV) between the two simulations was not large enough to change either the firing pattern (from phasic to continuous) or the spiking frequency significantly. In the two simulations, the fast excitatory synaptic transmission was stopped after the first 50 s of simulation. In the first simulation (current injection of $1.77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), the bursting activity of the MCN did not continue after the glutamatergic synaptic input was turned off, indicating that this bursting activity was not regenerative (Fig. 5; left panel). In the second simulation (current injection of $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), the bursting activity was regenerative in the absence of excitatory synaptic input (Fig. 5; right panel). Our results conciliate the discrepancy between the *in vivo* data and *in*

vitro data by demonstrating that membrane depolarization can convert a synaptic-dependent phasic firing pattern into an intrinsically regenerative phasic firing pattern.

3.6 Prediction of the impact of synaptic events on firing rate and spiking behavior

We extended our predictions of the impact of fast synaptic transmission on MCN spiking activity at various membrane potentials: -65 , -57 , -49 and -41 mV (current injections were set to 0 , 1 , 2 and $3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively). Note that these membrane potential values were obtained when the spikes were blocked in the simulation ($g_{\text{Na}}=0$). The

Fig. 4 Simulation of the hyperosmolality-induced extension of the burst duration. A simulation of the phasic firing pattern under isosmotic condition was obtained with a current injection of $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (**b**). Simulations of hyposmotic CSF (-30 mosmol/L) reduced both the spiking frequency and the duration of the burst (**a**). On the contrary, simulation of hyperosmotic CSF ($+30 \text{ mosmol/L}$) increased spiking frequency and burst duration (**c**). Note that the simulation of the hyperosmolality-mediated extension of burst duration requires the implementation of a frequency-dependent fatigue mechanism for the dynorphin signal (see text). The size of the bin for the mean instantaneous frequency is 1000 ms



frequency of inhibitory and excitatory synaptic potentials was set to 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz (Fig. 6). The results from this simulation indicate that the effects of the frequency of synaptic events on the spiking activity of the MCN depends on the nature of synaptic transmission (excitatory vs. inhibitory). Indeed, increased EPSP frequency is associated with increased spiking frequency (Fig. 6). This increased spiking frequency triggers the transition between the spiking behaviors observed at a constant membrane potential, such as from silent to irregular and from irregular to phasic (Fig. 6(a), (b)). The transition from phasic to continuous firing observed at depolarized membrane potentials was also shown to be initiated by EPSPs (Fig. 6(c), (d)). In addition, our results indicate that IPSPs can modulate spiking frequency, particularly when MCNs

fire in an irregular and continuous manner. However, the impact of IPSPs on spiking frequency is lower than the impact of EPSPs, as demonstrated by comparing the slope of the spiking frequency over the frequency of the IPSPs or EPSPs (v_{firing}/v_{IPSP} or v_{firing}/v_{EPSP}). For example, in Fig. 6(d) at coordinate (11.2; 128; 128), the slope of v_{firing} is three times higher along the EPSP axis (0.078 Hz [SF]/Hz [EPSP]) than along the IPSP axis (0.027 Hz [SF]/Hz [IPSP]). Interestingly, when the MCN displays a phasic firing pattern, both EPSPs and IPSPs have little impact on the spiking frequency. For the EPSPs at coordinate ((14.6; 128; 0); Fig. 6(d)), the slope of v_{firing} is 0.075 Hz firing/Hz EPSP for a continuous firing MCN. This value is 22 times higher than the slope of v_{firing} for a MCN firing in the phasic mode (0.0034 Hz firing/Hz EPSP at coordinate (4.32; 128; 0);

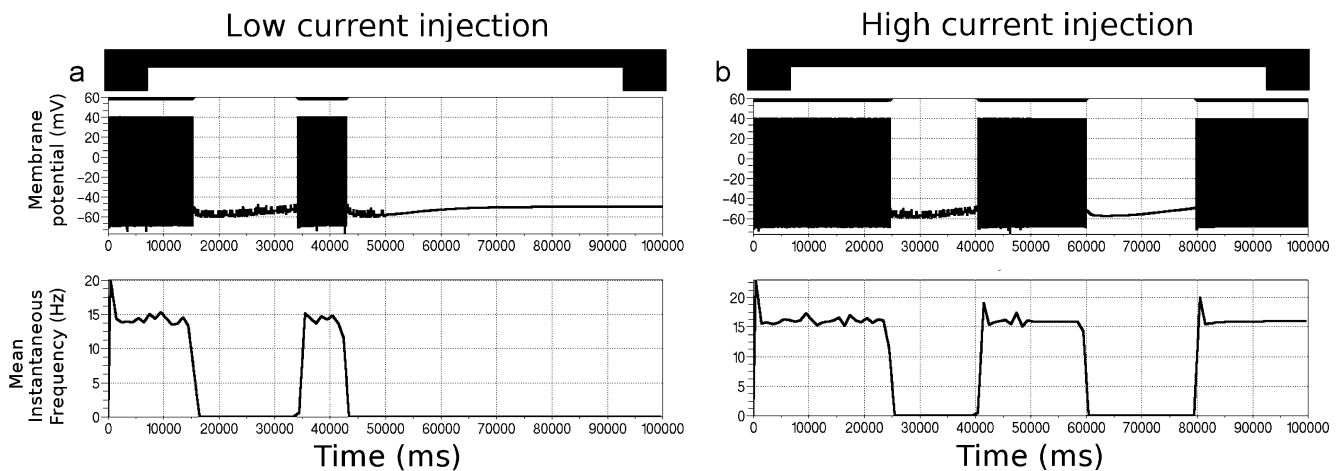


Fig. 5 Synaptic inputs are not sufficient to trigger a regenerative phasic firing pattern. A simulation of the phasic firing pattern can be obtained with a weak current injection ($1.77 \mu\text{A}/\text{cm}^2$). Switching off the synaptic inputs after 50 s stops the firing activity of the MCN (**a**). Additional membrane depolarization (current injection of $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)

produces an intrinsically regenerative firing pattern even when the synaptic inputs are turned off (**b**). Note that the fluctuation of the mean instantaneous spiking frequency is dependent on both excitatory and inhibitory synaptic inputs. The size of the bin for the mean instantaneous frequency is 1000 ms

Fig. 6(a)). Concerning the IPSPs, the ratio between the two slopes of ν_{firing} is 23 (0.027 Hz firing/Hz IPSP at coordinate (14.6; 128; 0); Fig. 6(d) vs. 0.0012 Hz firing/Hz IPSP at coordinate (4.36; 128; 0); Fig. 6(a)).

4 Discussion

In the present study, we developed a realistic computational model of the vasopressin MCN by implementing both the osmotically activated mechanosensitive channel (MSC) and the synaptic inputs in a previously reported Hodgkin-Huxley simulation of the MCN (Roper et al. 2004). The implementation and validation of these parameters allowed us to use this model to provide new insights into the MCN physiology. Indeed, our simulation predicted that a single MCN is able to display qualitative transitions between each of the four distinct types of firing patterns that have been observed experimentally. This prediction is particularly attractive in that it suggests that vasopressin MCNs constitute a homogenous neuronal population in terms of their intrinsic electrical activity-generating properties. Moreover, our simulation of firing activity predicted a frequency-dependent fatigue of dynorphin secretion. This predicted mechanism would be essential to control burst duration during the phasic pattern of spike discharges.

This simulation also predicted the relative influence of EPSPs and IPSPs on the firing pattern and spiking frequency of MCNs. Indeed, our results suggest that the impact of synaptic inputs on transitions between firing patterns and on the spiking frequency within a firing pattern

strongly depend on the range of membrane potentials displayed by the MCNs.

4.1 Insight from the simulation: a single vasopressinergic MCN can display each of the four types of firing pattern

The model and simulations presented in this study predict that a single MCN is able to fire action potentials in all four of the firing patterns that have been observed in *in vivo* experimental recordings: silent neuron, irregular, phasic and continuous firing neuron (Brimble and Dyball 1977; Brown et al. 1998). Interestingly, the transitions between these firing patterns were not due to fine-tuning the intrinsic parameters implemented in the initial model (Roper et al. 2004) (e.g. the conductance and/or time constant of the currents), but solely to the membrane depolarization. Therefore, our simulations predict that the SON is composed of a homogeneous population of vasopressin MCNs with respect to their intrinsic properties (e.g. the type of ion channels, the channel conductances and the channel time-constants). The diversity of spiking behaviors reported under various experimental conditions, including osmotic perturbations (Wakerley et al. 1978), can likely be attributed to variations in membrane depolarization for individual neurons caused by local and heterogeneous ionic concentration, hormone concentration and/or weight of synaptic afferences. In our simulations, depolarization of MCNs was triggered either by a change in the environment of the MCN like hyperosmolality (implementation of the MSC), or by injecting current to simulate the depolarizing effects of neuropeptides, such as angiotensin 2 (AngII) (Z. Li and

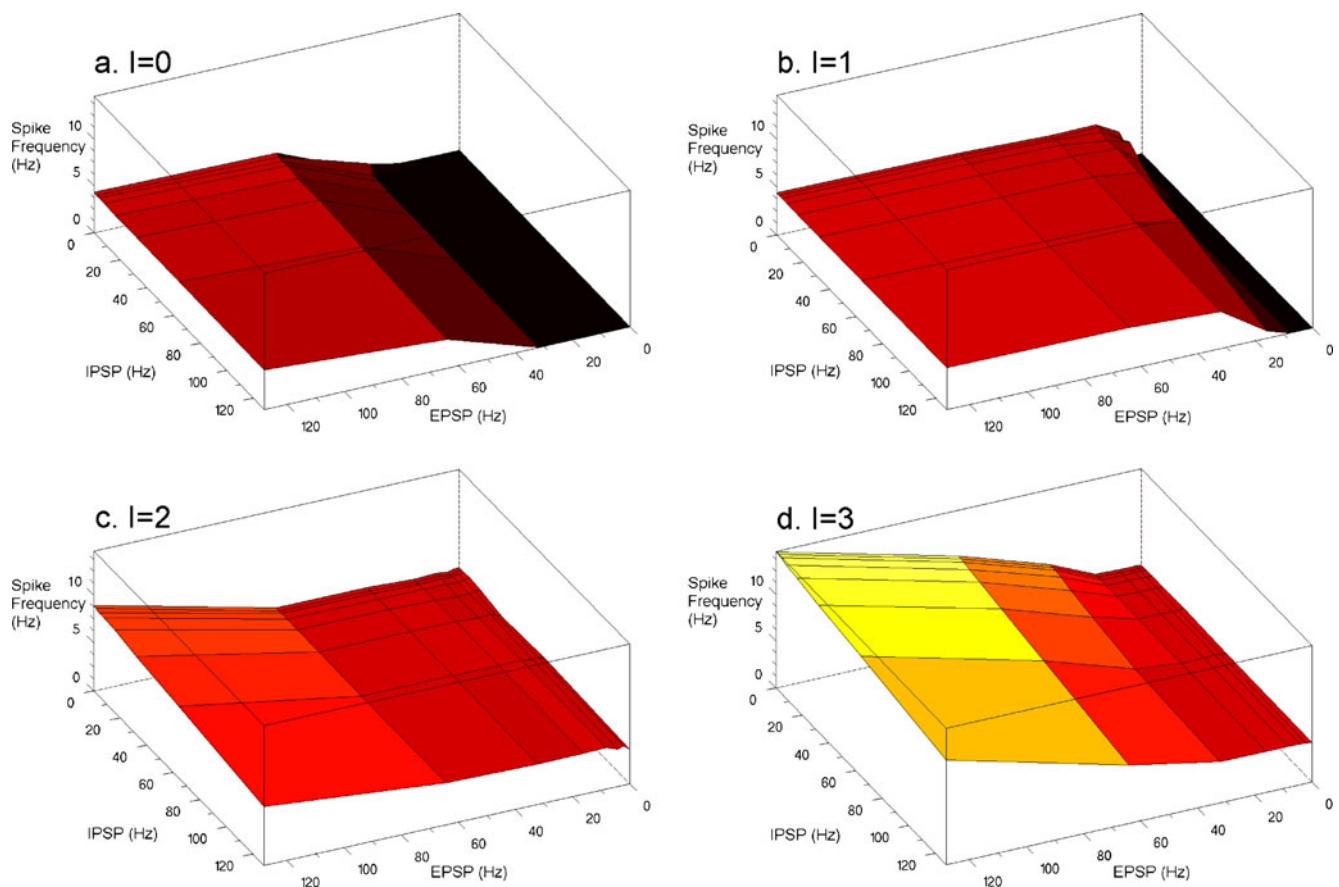


Fig. 6 Synaptic inputs affect the spiking frequency of the MCN. This 3D graph simulates the impact of both the EPSP frequency (X axis) and IPSP frequency (Y axis) on the spiking frequency of the MCN (Z axis). The intersection of two lines along the X and Y axis represents the simulated mean spiking frequency resulting from three tests lasting 110 s each. Note that the resolution of EPSPs and IPSPs is higher in the low frequency range than in the high frequency range, and this is illustrated in the 3D graph by a higher number of lines in the low frequency range of both types of synaptic events. The color code indicates the simulated firing patterns of the MCN: silent MCN (*black area*), irregular firing pattern

representing the transition between the silent and the phasic firing pattern (*dark red area*), phasic firing pattern (*plateau, red area*) and continuous firing pattern (*bright red inclined plane in (c) and yellow inclined plane in (d)*). These firing patterns are generated by a current injection of $0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (**a**), $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (**b**), $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (**c**) and $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (**d**). Both EPSP and IPSP frequency have a high impact on the transition between the firing patterns, but a variable impact on the spiking frequency. Indeed, the EPSP and IPSP frequency affects the spiking frequency during irregular or continuous firing, but not in the phasic firing pattern

Ferguson 1996). The transition between the silent state and phasic firing was triggered by hyperosmolality alone, whereas the transition between the phasic and the continuous firing patterns required an additional current injection (depolarization). These simulations suggest that several depolarizing agents are simultaneously required to obtain a continuous fast-spiking pattern. In support of this, *in vitro* recordings have shown that the combination of AngII and hyperosmolality produces a larger depolarization than hyperosmolality alone (Chakfe and Bourque 2000; Zhang and Bourque 2008). The distribution frequency of synaptic afferents might also be one of the depolarizing agents. Our simulation in which the EPSP frequency was increased mostly predicted the transition from one spiking pattern to another (see below).

4.2 Insight from the simulation: dynorphin release is controlled by a frequency-dependent fatigue mechanism

One key feature of the MCN model developed by Roper and colleagues (Roper et al. 2004) was the implementation of the dynorphin-mediated control of burst duration that characterizes the MCN phasic firing pattern. The model of the dynorphin's mode of action was based on a spike-mediated increment of the dynorphin signal that activates a K^+ leak conductance. Activation of this conductance led to membrane hyperpolarization, which resulted in the termination of spiking activity. This mechanism was validated experimentally (Brown and Bourque 2004). However, the results presented here demonstrate that the Roper model of dynorphin signaling is of limited physiological relevance. Simulations of hyperosmotic conditions using the Roper

model predict that an MSC-mediated membrane depolarization would result in increased intraburst frequency and dynorphin release, which would lead to shortened burst durations. This prediction is in stark contrast with experimental data reporting an extension of the burst duration under hyperosmotic conditions (Brimble and Dyball 1977; Wakerley et al. 1978). Our simulation predicted that a frequency-dependent fatigue mechanism of dynorphin release was essential to correctly model the hyperosmolality-induced increase in burst duration. Here, we developed a mathematical model of this fatigue mechanism in order to simulate the extension of the burst duration caused by hyperosmolality. This model of dynorphin secretion fatigue was adapted from the mechanism underlying the frequency-dependent fatigue of vasopressin secretion reported at MCN terminals (Hobbach et al. 1988). Experimental data showing that dynorphin and dynorphin receptors are stored together in the same vesicles as vasopressin in both the soma and the dendrites of MCNs (Shuster et al. 1999) validate the assumption that a mechanism of frequency-dependent downregulation of vasopressin secretion could be adapted to dynorphin secretion. This model predicted reduced dynorphin secretion per spike and, consequently, increased burst duration. Because this predicted mechanism has not yet been validated experimentally, we also tested alternative assumptions to simulate the extension of burst duration. The hyperosmolality-induced burst extension could also potentially be attributed to additional membrane depolarization or to an increased frequency of synaptic events. Simulations of either of these conditions also predicted increased intraburst spiking frequency, which in turn would lead to increased dynorphin secretion, thereby triggering an early end of the burst.

4.3 Insight from the simulation: impact of synaptic inputs on both the MCN firing rate and firing pattern

Our MCN model and associated simulations allowed us to separately test the impact of EPSPs, IPSPs and membrane potential on the spiking frequency and firing pattern of MCNs. For these simulations, we used EPSP and IPSP frequencies of 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 Hz. This range was wider than the physiological range of synaptic inputs that have been reported to impinge on the MCNs (Bourque and Renaud 1991). This assumption was used because of the paucity of *in vivo* synaptic data increases the possibility of underestimating the synaptic event frequency occurring under particular conditions, such as changes in osmolality. Our results predicted that the transition from one firing pattern to another was dependent on the synaptic event frequency and current injection (membrane depolarization). Moreover, our simulations indicated that an increase or a

decrease in IPSP or EPSP frequency could either have no effect or have a dramatic effect on the MCN firing rate, depending on the initial set of parameters characterizing the MCN (membrane potential, IPSP and EPSP frequency). Indeed, our predictions suggest that the spiking frequency within a characteristic burst of the phasic firing pattern was not dependent on the synaptic event frequency. However, the interspike interval in MCNs displaying a phasic pattern was affected by the frequency of the synaptic events (Online Resource 4). In contrast, the EPSP and/or the IPSP frequency controlled the spiking frequency in MCNs displaying irregular or fast-continuous firing patterns. In addition, our simulation predicted that synaptic events are required to trigger regenerative bursting activity, as shown in *in vivo* experimental recordings (Brown et al. 2004). However, our simulation also predicted that a stronger depolarization of the MCN could trigger regenerative phasic activity that was independent of synaptic inputs. This prediction is in agreement with *in vitro* experimental data (Andrew 1987). In the *in vitro* experiments, the additional depolarization predicted to trigger the regenerative spiking activity might come from the experimental conditions, such as the high ion concentration and/or the presence of glucose in the artificial CSF.

Acknowledgement This project was supported by the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) MOP-178002. LN received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, ESD3-334440-2006).

We would like to thank Myriam Rioux (University of Ottawa, Canada) and Francis Gagnon-Moisano (PTB, Braunschweig, Germany) for valuable suggestions and comments on the study. We also thank Dr. Charles Bourque (McGill University, Montreal, Canada) for his kind gift of experimental data and for his permission to include these data in the present study. Finally, we would to thank Dr. Peter Roper (The University of Utah, U.S.A.) for sharing his source code and for the useful answers to our questions.

References

- Andrew, R. D. (1987). Endogenous bursting by rat supraoptic neuroendocrine cells is calcium dependent. *Journal de Physiologie*, *384*, 451–465.
- Andrew, R. D., & Dudek, F. E. (1984). Analysis of intracellularly recorded phasic bursting by mammalian neuroendocrine cells. *Journal of Neurophysiology*, *51*, 552–566.
- Armstrong, W. E., Smith, B. N., & Tian, M. (1994). Electrophysiological characteristics of immunochemically identified rat oxytocin and vasopressin neurones *in vitro*. *Journal de Physiologie*, *475*, 115–128.
- Bicknell, R. J. (1988). Optimizing release from peptide hormone secretory nerve terminals. *The Journal of Experimental Biology*, *139*, 51–65.
- Boehmer, G., Greffrath, W., Martin, E., & Hermann, S. (2000). Subthreshold oscillation of the membrane potential in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus. *Journal de Physiologie*, *526*, 115–128.

- Bourque, C. W. (1998). Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. *Progress in Brain Research*, *119*, 59–76.
- Bourque, C. W., & Renaud, L. P. (1991). Membrane properties of rat magnocellular neuroendocrine cells *in vivo*. *Brain Research*, *540*, 349–352.
- Brimble, M. J., & Dyball, R. E. (1977). Characterization of the responses of oxytocin- and vasopressin-secreting neurones in the supraoptic nucleus to osmotic stimulation. *Journal de Physiologie*, *271*, 253–271.
- Brimble, M. J., Dyball, R. E., & Forsling, M. L. (1978). Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurones in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Journal de Physiologie*, *278*, 69–78.
- Brown, C. H., & Bourque, C. W. (2004). Autocrine feedback inhibition of plateau potentials terminates phasic bursts in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *Journal de Physiologie*, *557*, 949–960.
- Brown, C. H., Ludwig, M., & Leng, G. (1998). kappa-opioid regulation of neuronal activity in the rat supraoptic nucleus *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, *18*, 9480–9488.
- Brown, C. H., Bull, P. M., & Bourque, C. W. (2004). Phasic bursts in rat magnocellular neurosecretory cells are not intrinsically regenerative *in vivo*. *The European Journal of Neuroscience*, *19*, 2977–2983.
- Brown, C. H., Scott, V., Ludwig, M., Leng, G., & Bourque, C. W. (2007). Somatodendritic dynorphin release: orchestrating activity patterns of vasopressin neurons. *Biochemical Society Transactions*, *35*, 1236–1242.
- Chakfe, Y., & Bourque, C. W. (2000). Excitatory peptides and osmotic pressure modulate mechanosensitive cation channels in concert. *Nature Neuroscience*, *3*, 572–579.
- Dunn, F. L., Brennan, T. J., Nelson, A. E., & Robertson, G. L. (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, *52*, 3212–3219.
- Hatton, G. I. (1982). Phasic bursting activity of rat paraventricular neurones in the absence of synaptic transmission. *Journal of Physiology*, *327*, 273–284.
- Hobbach, H. P., Hurth, S., Jost, D., & Racke, K. (1988). Effects of tetraethylammonium ions on frequency-dependent vasopressin release from the rat neurohypophysis. *Journal de Physiologie*, *397*, 539–554.
- Inenaga, K., Cui, L. N., Nagatomo, T., Honda, E., Ueta, Y., & Yamashita, H. (1997). Osmotic modulation in glutamatergic excitatory synaptic inputs to neurons in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus *in vitro*. *Journal of Neuroendocrinology*, *9*, 63–68.
- Iremonger, K. J., & Bains, J. S. (2007). Integration of asynchronously released quanta prolongs the postsynaptic spike window. *The Journal of Neuroscience*, *27*, 6684–6691.
- Komodantov, A. O., Trayanova, N. A., & Tasker, J. G. (2007). Somato-dendritic mechanisms underlying the electrophysiological properties of hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells: a multicompartmental model study. *Journal of Computational Neuroscience*, *23*, 143–168.
- Leng, G., Brown, C. H., Bull, P. M., Brown, D., Scullion, S., Currie, J., et al. (2001). Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: an experimental and theoretical analysis. *The Journal of Neuroscience*, *21*, 6967–6977.
- Li, Z., & Ferguson, A. V. (1996). Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. *Neuroscience*, *71*, 133–145.
- Li, C., Tripathi, P. K., & Armstrong, W. E. (2007). Differences in spike train variability in rat vasopressin and oxytocin neurons and their relationship to synaptic activity. *Journal de Physiologie*, *581*, 221–240.
- McKinley, M. J., Mathai, M. L., McAllen, R. M., McClear, R. C., Miselis, R. R., Pennington, G. L., et al. (2004). Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *Journal of Neuroendocrinology*, *16*, 340–347.
- Oliet, S. H., & Bourque, C. W. (1993a). Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*, *364*, 341–343.
- Oliet, S. H., & Bourque, C. W. (1993b). Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *The American Journal of Physiology*, *265*, R1475–R1479.
- Richard, D., & Bourque, C. W. (1995). Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis *in vitro*. *Journal de Physiologie*, *489*, 567–577.
- Roper, P., Callaway, J., Shevchenko, T., Teruyama, R., & Armstrong, W. (2003). AHP's, HAP's and DAP's: how potassium currents regulate the excitability of rat supraoptic neurones. *Journal of Computational Neuroscience*, *15*, 367–389.
- Roper, P., Callaway, J., & Armstrong, W. (2004). Burst initiation and termination in phasic vasopressin cells of the rat supraoptic nucleus: a combined mathematical, electrical, and calcium fluorescence study. *The Journal of Neuroscience*, *24*, 4818–4831.
- Shibuya, I., Kabashima, N., Tanaka, K., Setiadjji, V. S., Noguchi, J., Harayama, N., et al. (1998). Patch-clamp analysis of the mechanism of PACAP-induced excitation in rat supraoptic neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, *10*, 759–768.
- Shuster, S. J., Riedl, M., Li, X., Vulchanova, L., & Elde, R. (1999). Stimulus-dependent translocation of kappa opioid receptors to the plasma membrane. *The Journal of Neuroscience*, *19*, 2658–2664.
- Tremblay, C., Berret, E., Henry, M., Nehme, B., Nadeau, L., & Mouginit, D. (2010). A neuronal sodium leak channel is responsible for the detection of sodium in the rat median preoptic nucleus. *Journal of Neurophysiology*. doi:10.1152/jn.00417.2010.
- Trudel, E., & Bourque, C. W. (2003). A rat brain slice preserving synaptic connections between neurons of the suprachiasmatic nucleus, organum vasculosum lamina terminalis and supraoptic nucleus. *Journal of Neuroscience Methods*, *128*, 67–77.
- Trudel, E., & Bourque, C. W. (2010). Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep. *Nature Neuroscience*, *13*, 467–474.
- Voisin, D. L., Chakfe, Y., & Bourque, C. W. (1999). Coincident detection of CSF Na⁺ and osmotic pressure in osmoregulatory neurons of the supraoptic nucleus. *Neuron*, *24*, 453–460.
- Wakerley, J. B., Poulain, D. A., & Brown, D. (1978). Comparison of firing patterns in oxytocin- and vasopressin-releasing neurones during progressive dehydration. *Brain Research*, *148*, 425–440.
- Wakerly, J. B., Poulain, D. A., Dyball, R. E., & Cross, B. A. (1975). Activity of phasic neurosecretory cells during haemorrhage. *Nature*, *258*, 82–84.
- Wuarin, J. P., & Dudek, F. E. (1993). Patch-clamp analysis of spontaneous synaptic currents in supraoptic neuroendocrine cells of the rat hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, *13*, 2323–2331.
- Zhang, Z., & Bourque, C. W. (2003). Osmometry in osmosensory neurons. *Nature Neuroscience*, *6*, 1021–1022.
- Zhang, Z., & Bourque, C. W. (2008). Amplification of transducer gain by angiotensin II-mediated enhancement of cortical actin density in osmosensory neurons. *The Journal of Neuroscience*, *28*, 9536–9544.
- Zhang, Z., Kindrat, A. N., Sharif-Naeini, R., & Bourque, C. W. (2007). Actin filaments mediate mechanical gating during osmosensory transduction in rat supraoptic nucleus neurons. *The Journal of Neuroscience*, *27*, 4008–4013.

6.4 Versions finales des fichiers additionnels du deuxième article publié

Online resource 1 - Calculation of the mechanosensitive channel conductance as a function of the external osmolality

Aim

This file presents and compares two distinct methods used to compute the conductance of the mechanosensitive channel (MSC) as a function of external osmolality. The first method models the direct relationship between the osmolality and the MSC conductance reported in Oliet et al. (1993). The second method models the indirect relationship that involves the osmolality-driven change in the volume of magnocellular neuron (MCN). In this method, a correlation is initially made between the osmolality and the normalized volume of the MCN, based on Zhang et al. (2003). Then, a relationship is calculated between the normalized MCN volume and the change in the MSC conductance that has been established in Zhang et al. (2007).

Symbols

All the symbols appearing in the equations of this file are defined in the following table :

Osm	CSF osmolality (mosmol/L)
ΔOsm	Difference between a specific osmolality and the normal CSF osmolality (295 osmol/L, control)
$g(0)$	Membrane conductance of the MCNs under normal CSF osmolality (295 mosmol/L). This represents a particular condition of the membrane conductance term when $\Delta Osm=0$
$g(\Delta Osm)$	Membrane conductance of the MCNs under a CSF osmolality of $295+\Delta Osm$ mosmol/L
$\Delta g(\Delta Osm)$	Difference between $g(0)$ and $g(\Delta Osm)$
$g_{MSC}(0)$	Conductance of the MSC under normal CSF osmolality
$g_{MSC}(\Delta Osm)$	Conductance of the MSC under a CSF osmolality of $295+\Delta Osm$ mosmol/L
$\Delta g_{MSC}(\Delta Osm)$	Difference between $g_{MSC}(0)$ and $g_{MSC}(\Delta Osm)$
$V(0)$	Normalized volume of MCN under normal CSF osmolality
$V(\Delta Osm)$	Normalized volume of the MCN under a CSF osmolality of $295+\Delta Osm$ mosmol/L
$\pi(0)$	Osmotic pressure under normal CSF osmolality
$\pi(\Delta Osm)$	Osmotic pressure under a CSF osmolality of $295+\Delta Osm$ mosmol/L
$\Delta \pi(\Delta Osm)$	Difference between $\pi(0)$ and $\pi(\Delta Osm)$

Model of the direct relationship between the osmolality and the MSC conductance (based on Oliet et al. 1993)

Figure 3B in Oliet et al.1993 reports a direct relationship between variation in osmolality and the percentage of change in the membrane conductance of the MCN. A linear fit of the experimental measurements led to the following function:

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = 0.0214 \cdot \Delta Osm \quad (A.1)$$

Correlation between the osmolality and the normalized volume of the MCN (based on Zhang et al. 2003)

In Figure 1C, Zhang and colleagues linked the normalized volume of the MCN to the osmolality using a Boyle-van't Hoff osmometry. The Bolye-van't Hoff equation is :

$$V(Osm) = \frac{\pi(0) \cdot (V(0) - b)}{\pi(Osm)} + b \quad (A.2)$$

Substituting a non-osmotic volume fraction of 22.4% (b) and $V(0) = 1$ (normalized volume) in equation A.2:

$$V(Osm) = \frac{\pi(0) \cdot 0.776}{\pi(Osm)} + 0.224 \quad (A.3)$$

This equation is used in the next sections.

Relationship between the normalized MCN volume and the change in the MSC conductance (based on Zhang et al. 2007)

This study demonstrates that a change in the normalized volume of the MCN caused by an osmotic swelling alters the membrane conductance of the MCN. By linearly fitting the change in membrane conductance as a function of the normalized volume (Figure 1), the authors found the following equation :

$$\Delta g(\Delta Osm) = 4nS \cdot (1 - V(Osm)) \quad (A.4)$$

Model of the indirect relationship between the osmolality and the MSC conductance

This model is achieved by combining equation A.3 and A.4. However, to compare this indirect model with the direct model of osmolality and MSC conductance (equation A.1), equation A.4 has to be divided by $g(0)$:

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot (1 - V(Osm)) \quad (A.5)$$

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot \left(1 - \left(\frac{\pi(0) \cdot 0.776}{\pi(Osm)} + 0.224 \right) \right) \quad (A.6)$$

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot \left(0.776 - \frac{\pi(0) \cdot 0.776}{\pi(Osm)} \right) \quad (A.7)$$

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot \left(0.776 \cdot \left(1 - \frac{\pi(0)}{\pi(Osm)} \right) \right) \quad (A.8)$$

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot \left(0.776 \cdot \left(\frac{\pi(Osm) - \pi(0)}{\pi(Osm)} \right) \right) \quad (A.9)$$

$$\frac{\Delta g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4nS}{g(0)} \cdot \left(0.776 \cdot \left(\frac{\Delta \pi(\Delta Osm)}{\pi(Osm)} \right) \right) \quad (A.10)$$

Using the Morse approximation for the osmotic pressure, it is shown that :

$$\frac{\Delta \pi(\Delta Osm)}{\pi(Osm)} \approx \frac{\Delta Osm}{Osm} \quad (A.11)$$

Substituting equation A.11 into equation A.10 gives:

$$\frac{g(\Delta Osm)}{g(0)} = \frac{4 \cdot 0.776 \cdot \Delta Osm}{g(0) \cdot Osm} = \frac{4 \cdot 0.776 \cdot \Delta Osm}{g(0) \cdot (\Delta Osm + 295)} \quad (A.12)$$

If $\Delta Osm \ll 295$ then :

$$\frac{g(\Delta Osm)}{g(0)} \approx \frac{4 \cdot 0.776 \cdot \Delta Osm}{g(0) \cdot 295} = \frac{0.0105 \cdot \Delta Osm}{g(0)} \quad (A.13)$$

Equation A.13 (indirect model) should be equivalent to equation A.1 (direct model). This condition is achieved only if $g(0)=0.49$ nS. However, experimental data obtained from neurons used in Zhang et al., 2003, provided a $g(0)$ of $0.59 \text{ nS} \pm 0.19$ (SD; Charles W. Bourque, personal communication), indicating that both methods are likely equivalent. Here we make the assumption that data from the 2003 study are more accurate than those reported in Oliet et al., 1993 because the former data were obtained from a larger

number of neurons and with a more appropriate experimental protocol. Therefore, $g(0)=0.59$ nS was used in equation A.13 for simulating the membrane conductance of the MCN:

$$\frac{g(\Delta Osm)}{g(0)} \approx 0.0178 \cdot \Delta Osm \quad (\text{A.14})$$

The experimental data indicate that g_{MSC} contributes to about 60% of the membrane conductance at rest ($g(0)$) and that $\Delta g_{MSC}(\Delta Osm)$ contributes to 100 % of $\Delta g(\Delta Osm)$ induced by a change in osmolality (Oliet et al.(1993)). Therefore, we estimate that the relative change in MSC conductance is:

$$\frac{g_{MSC}(\Delta Osm)}{g_{MSC}(0)} = 0.0297 \cdot \Delta Osm \quad (\text{A.15})$$

In our simulation, we used a Hodgkin-Huxley formalism. In this context Δg is not allowed to change because g is fixed and only the activation function m varies. Accordingly, equation A.15 has to be included into $m_{\infty MSC}$:

$$\frac{\partial m_{MSC}(t)}{\partial t} = \frac{m_{\infty MSC} - m_{MSC}(t)}{\tau_{mMSC}} \quad \text{with} \quad m_{\infty MSC} = 1 + 0.0297 \cdot \Delta Osm \quad (\text{A.16})$$

This equation was used in the simulation to compute the MSC conductance. An additional rule was included to limit ΔOsm to values > -25 mosmol/L to emulate the saturation reported by Oliet et al.(1993). The saturation prevents $m_{\infty MSC}$ to reach negative values. Note that the experimental value (-25 mosmol/L) is close to the calculated value obtained with equation A.16 ($-1/0.0297 = -33.7$ mosmol/L) and therefore we used the experimental value in the simulation.

Online Resource 2 - Adjustment of the Na⁺ and K⁺ leak conductance in the MSC model

Aim

This file describes the calculations of the MSC conductance, as well as the update of the Na⁺ and K⁺ leak conductance reported in the initial model of the MSC.

Symbols

All the symbols appearing in the equations of this file are defined in the following table:

Osm	CSF osmolality (mosmol/L)
ΔOsm	Difference between a specific osmolality and the normal CSF osmolality (295 mosmol/L; control)
$V_m(\Delta Osm)$	Resting membrane potential of MCN under a CSF osmolality of 295+ ΔOsm mosmol/L
$V_m(0)$	Resting membrane potential of MCN in normal CSF osmolality (295 mosmol/L)
C	Capacitance of the MCN membrane (1 $\mu F \cdot cm^{-2}$; Roper et al. (2003))
τ	Time constant of the MCN membrane (ms)
$g(\Delta Osm)$	Membrane conductance of the MCNs under a CSF osmolality of 295+ ΔOsm mosmol/L
$g(0)$	Membrane conductance of the MCNs under normal CSF osmolality ($mS \cdot cm^{-2}$). This represents a particular condition of the membrane conductance term when $\Delta Osm=0$
g_{Na}	Leak Na ⁺ conductance ($mS \cdot cm^{-2}$).
g_K	Leak K ⁺ conductance ($mS \cdot cm^{-2}$).
g_{MSC}	MSC conductance ($mS \cdot cm^{-2}$).
$I_{Leak}(Osm)$	Sum of leak current (I_{Na} , I_K , I_{MSC}) at the resting membrane potential.

Roper et al. (2003)

In this study, two equations were used to compute g_{Na} and g_K . These equations are rewritten using our notation :

1) When the MCN is at rest :

$$\dot{V}_m(0) = 0, \quad V_m(0) = -65 \text{ mV}, \quad I_{Leak} = 0 = g_{Na} (V_m(0) - E_{Na}) + g_K (V_m(0) - E_K) \quad (\text{A.17})$$

2) The second equation is based on the RC circuit equation:

$$g(0) = \frac{C}{\tau} = \frac{1}{12} = g_{Na} + g_K \quad (\text{A.18})$$

The time constant used by Roper (12 ms) comes from experimental data reported in Stern and Armstrong (1996). Solving these equations led to conductance values of $g_{Na}=0.018 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $g_K=0.066 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$.

The present MCN model

The equations cited above have been modified to include the contribution of the MSC to the total leak current and to include the osmotic dependence of the resting membrane potential:

$$I_{leak}(Osm) = g_{Na}(V_m(Osm) - E_{Na}) + g_K(V_m(Osm) - E_K) + g_{MSC}(V_m(Osm) - E_{MSC})(Osm \cdot 0.0297 + 1) \quad (\text{A.19})$$

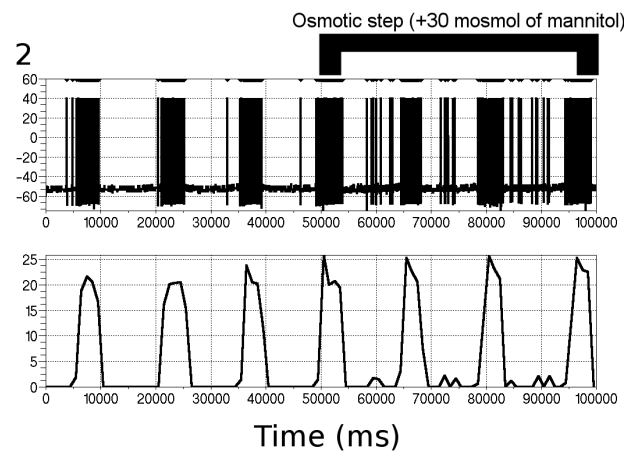
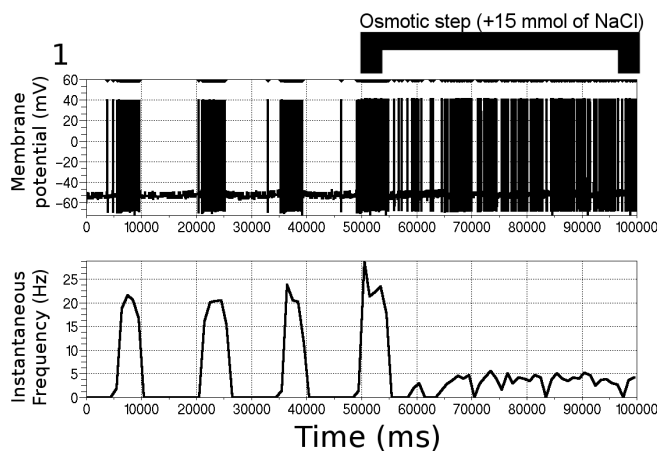
$$g(0) = \frac{C}{\tau} = \frac{1}{8.7} = g_{Na} + g_K + g_{MSC} \quad (\text{A.20})$$

The term $(Osm \cdot 0.0297 + 1)$ is explained with details in Online Resource 1. E_{Na} , E_K and E_{MSC} are 49 mV, -100 mV and -36 mV, respectively. The time constant used in the present study is 8.7 ms, a value extracted from the experimental data reported in Oliet et al.1992 (8.7 ms \pm 0.4 ms at -65 mV). We choose this specific value because all the experimental data selected to built the present MCN model came from studies that were based on the experimental protocol described in Oliet et al., 1992 (Zhang et al.(2003), Zhang et al.(2007), Oliet 1993).

Calculation of g_{Na} , g_K and g_{MSC} requires three equations instead of two (A.19 and A.20). The third equation is obtained by substituting $\Delta Osm=0$ by $\Delta Osm=30$ mosmol and $V_m(0) = -65\text{mV}$ by $V_m(30) = -60.5 \text{ mV}$ in equation A.19. Solving these equations: $g_{Na}=0.0169 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$, $g_K=0.0745 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ and $g_{MSC}=0.0235 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Online Resource 3 – Comparison of the firing activity of the MCN induced by an increase in either osmolality or $[\text{Na}^+]$.

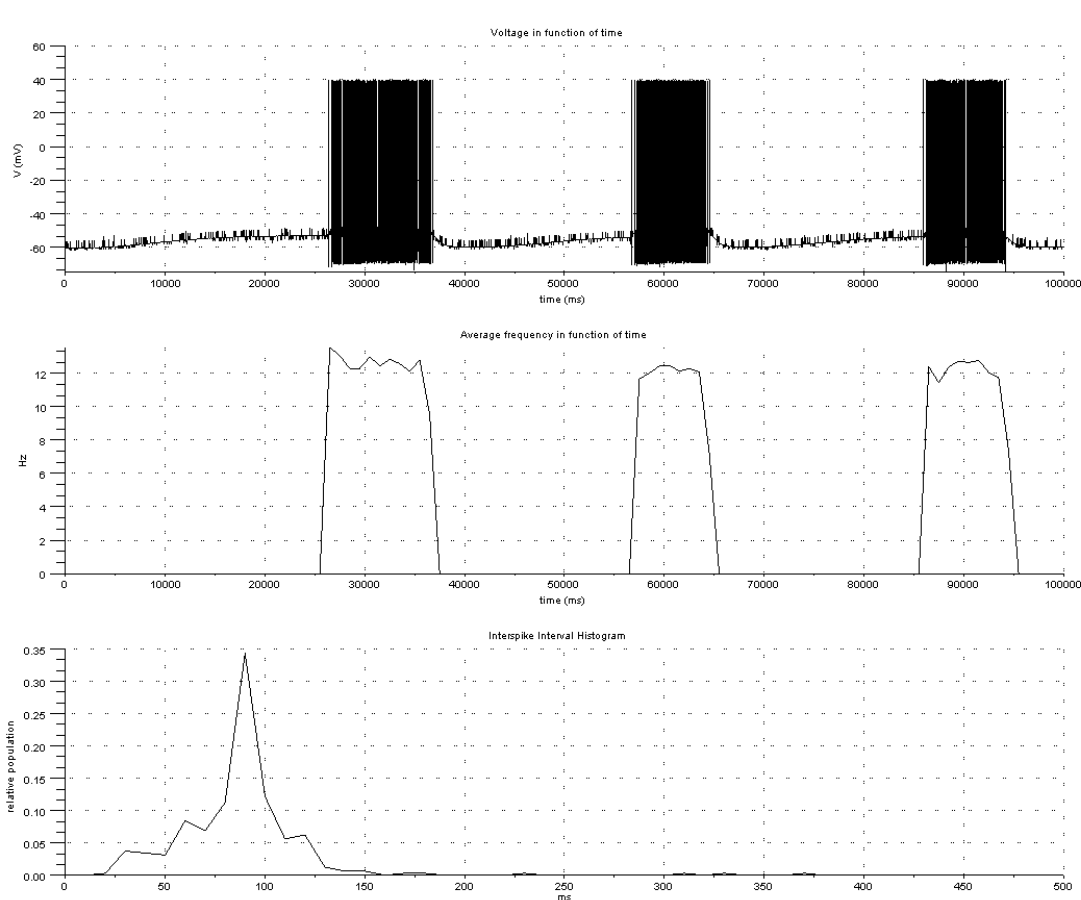
The present simulation tested the effect of two distinct hyperosmotic challenges on the MCN firing pattern and spike frequency. A current of $2.62 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ was injected to insure a phasic firing pattern of the MCN. The first 50 sec of the two simulations are identical because the pseudo-random number generator of the two simulations starts with the same seed. At $t = 50\text{s}$, a stepwise increase in osmolality was triggered by either NaCl (+15 mmol/L, + 30 mosmol/L; panel 1) or mannitol (+30 mosmol/L; panel 2). Note that the rise in $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$ was more efficient than mannitol to increase spike frequency (+2 Hz in the last 50s) and to change the firing pattern (continuous vs. phasic firing).



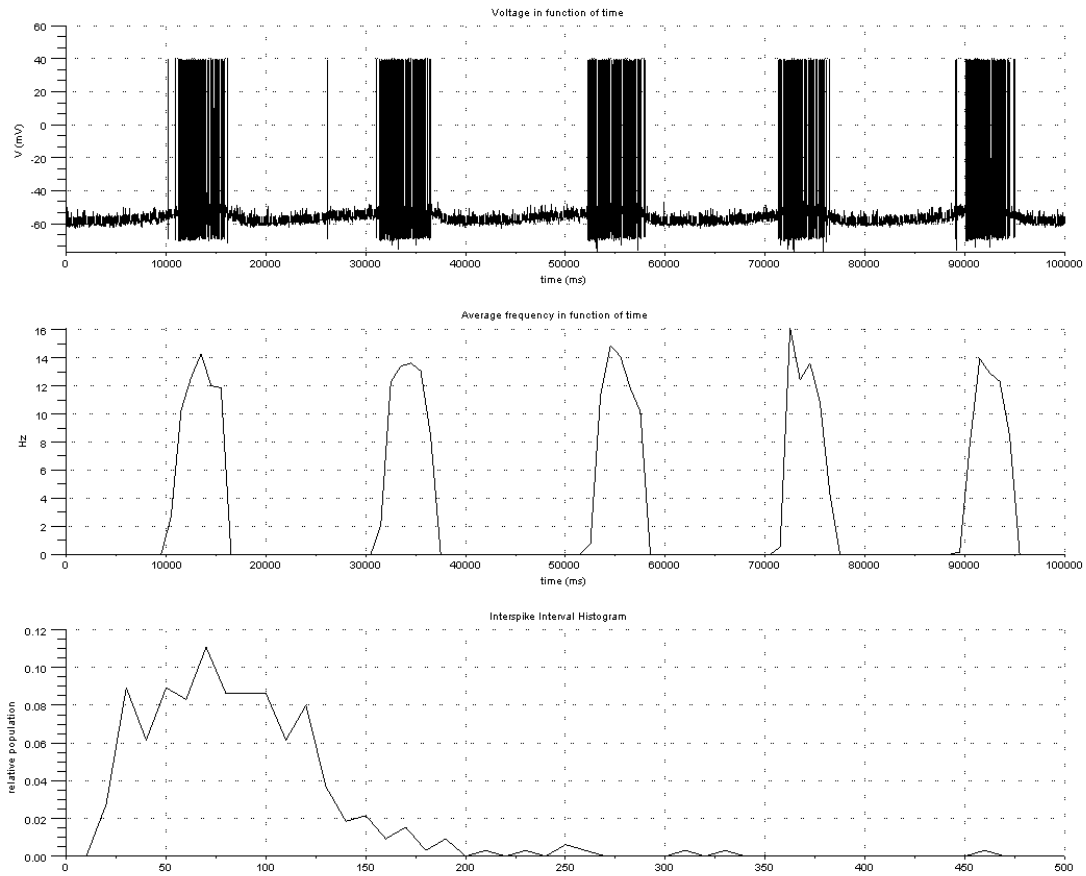
Online Resource 4 –Interspike interval histogram of MCNs displaying a phasic firing pattern

The simulated interspike interval (ISI) is dependent on the frequency of the synaptic inputs. The following figures show the effect of an increased synaptic frequency (EPSP and IPSP simultaneously) on the ISI histogram (ISIH). All the five simulations presented here were created with identical current injection (-1.55 uA/cm²) and identical initial random seed (10). These simulations showed that the mode of the ISIH changed from ≈ 90 ms to ≈ 45 ms when the synaptic frequency varied from 4 Hz to 128 Hz. In addition, note that the overall distribution of the ISIH changed from a symmetrical to a skew distribution.

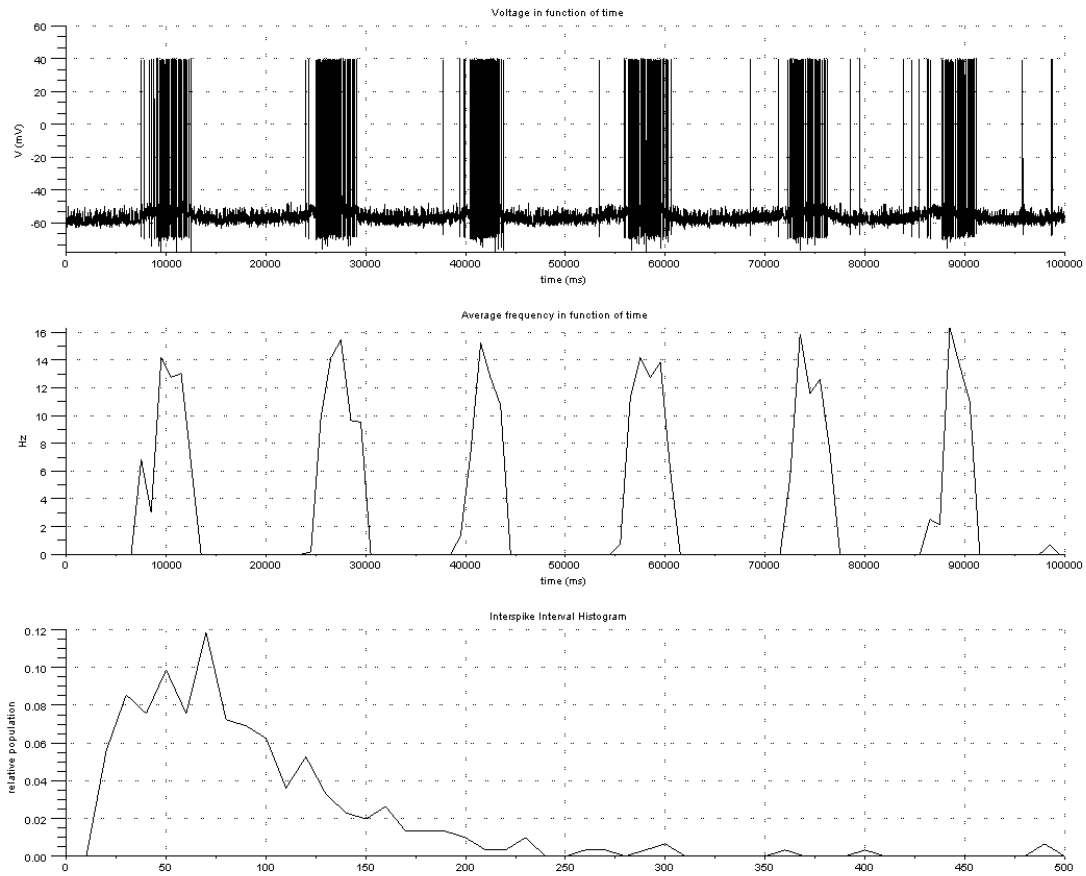
In Sabatier et al. 2004, ISIH were used to distinguish between *in vivo* and *in vitro* phasic firing pattern in the MCNs. In this study, the *in vitro* ISIH displayed a symmetrical distribution with a mode of 174 ± 23 ms, whereas the *in vivo* ISIH showed a skewed distribution with a mode of 45 ± 1.5 ms. Based on these experimental criteria only, we can state that the computational model of the MCN presented in this study shows characteristics of either *in vitro* like neuron (symmetrical distribution but a shorter mode), or *in vivo* realistic phasic neuron (skewed distribution with the correct mode), depending on the frequency of the initial synaptic inputs.



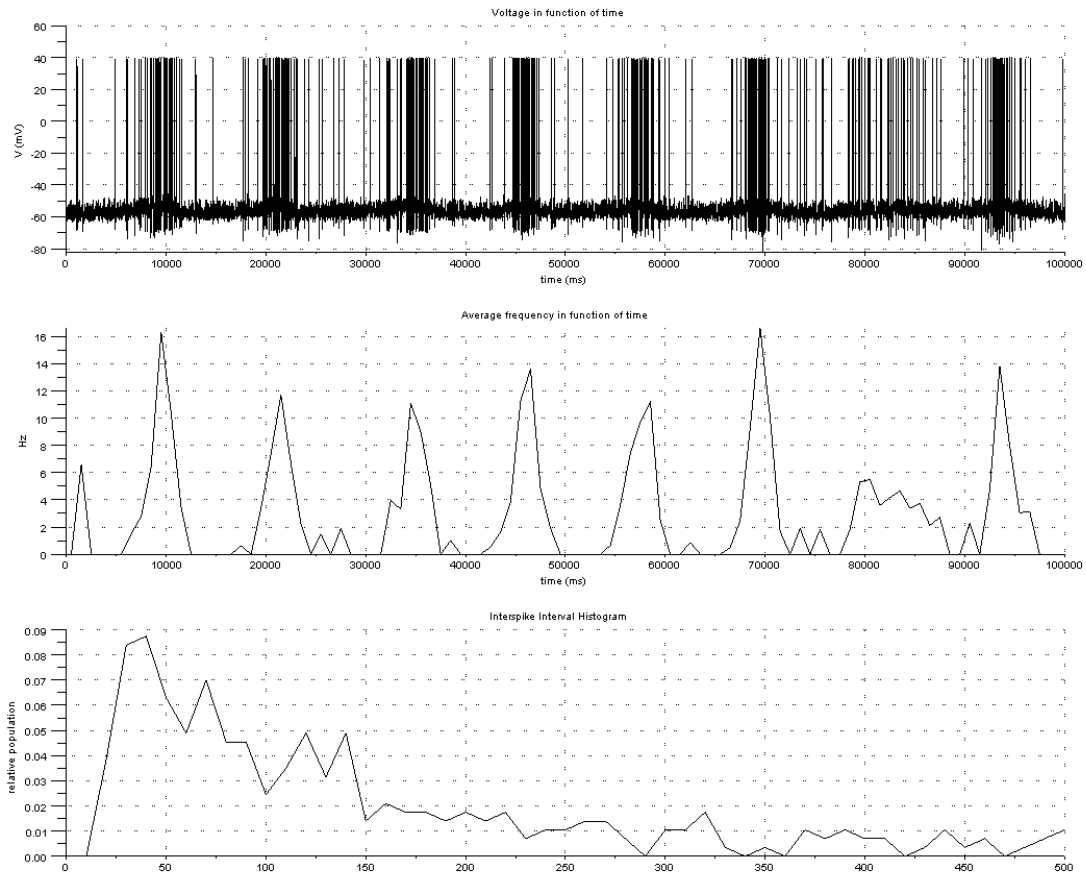
1-Phasic firing simulation created with an EPSP and IPSP frequency of 4 Hz. The top panel illustrates the dynamics of the membrane potential during 100 sec. The middle panel illustrates the mean instantaneous frequency in bin of 1 sec and the bottom panel illustrates the ISIH.



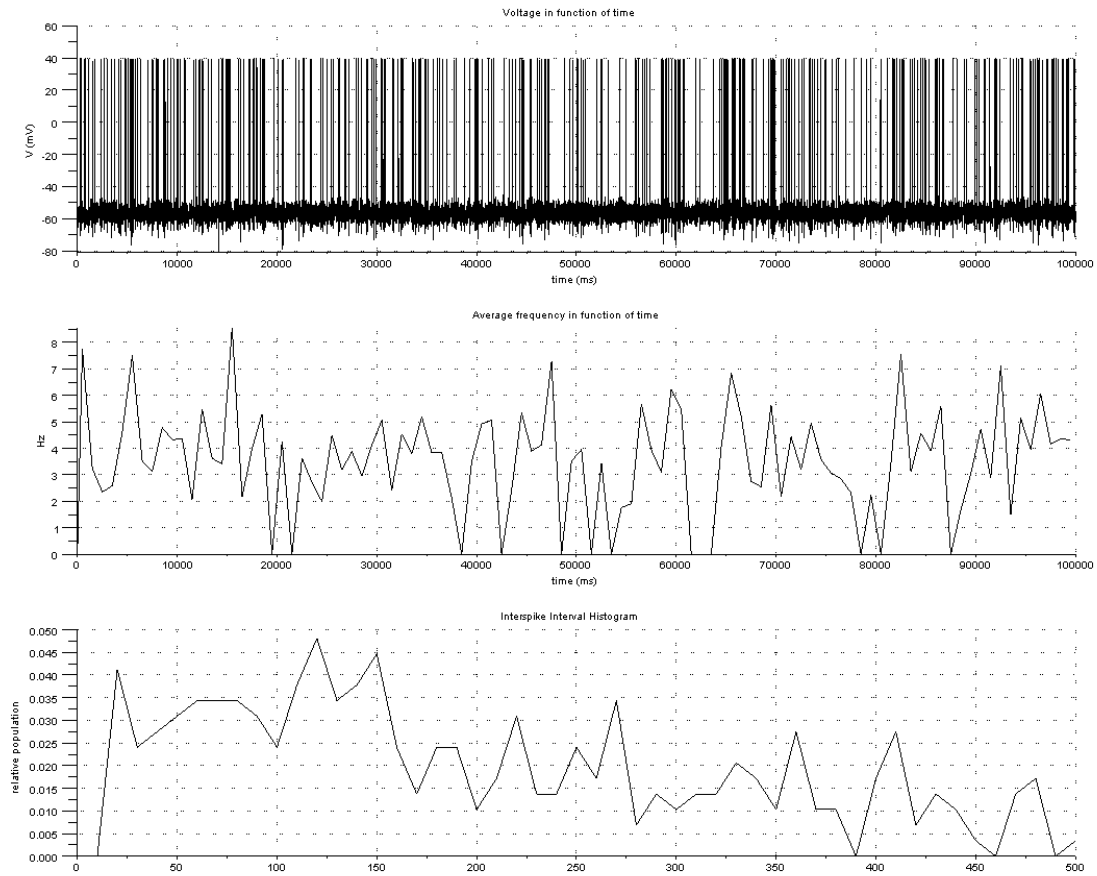
2- Phasic firing simulation created with an EPSP and IPSP frequency of 16 Hz. The top panel illustrates the dynamics of the membrane potential during 100 sec. The middle panel illustrates the mean instantaneous frequency in bin of 1 sec and the bottom panel illustrates the ISIH.



3- Phasic firing simulation created with an EPSP and IPSP frequency of 32 Hz. The top panel illustrates the dynamics of the membrane potential during 100 sec. The middle panel illustrates the mean instantaneous frequency in bin of 1 sec and the bottom panel illustrates the ISIH.



4- Phasic firing simulation created with an EPSP and IPSP frequency of 64 Hz. The top panel illustrates the dynamics of the membrane potential during 100 sec. The middle panel illustrates the mean instantaneous frequency in bin of 1 sec and the bottom panel illustrates the ISIH.



5- Phasic firing simulation created with an EPSP and IPSP frequency of 128 Hz. The top panel illustrates the dynamics of the membrane potential during 100 sec. The middle panel illustrates the mean instantaneous frequency in bin of 1 sec and the bottom panel illustrates the ISIH.