

Année 2014

**COMMENT LES JONCTIONS
NEUROVASCULAIRES SE METTENT-ELLES
EN PLACE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT
CHEZ LA SOURIS ?**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le.....

par

Émilie Jeanne Marguerite SIMONNET

Née le 24 Mars 1989 à Meulan en Yvelines (Yvelines)

JURY

Président : Pr.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Dr Fanny Pilot-Storck

Maître de conférences à l'École nationale vétérinaire d'Afort

Assesseur : Dr Marie Abitbol

Maître de conférences à l'École nationale vétérinaire d'Afort

Invité : Pr Laurent Tiret

Maître de conférences à l'École nationale vétérinaire d'Afort

Invitée : Dr Isabelle Brunet

Chargée de Recherche au Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, Collège de France

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : COTARD Jean-Pierre, MIALOT Jean-Paul, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard.
Professeurs honoraires : Mme et MM. : BENET Jean-Jacques, BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CHERMETTE René, CLERC Bernard, CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques.

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département par intérim : M. GRANDJEAN Dominique, Professeur - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

UNITE DE CARDIOLOGIE - Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * - Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier - Mme SECHI-TREHIOU Emilie, Praticien hospitalier	- M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences - Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel
UNITE DE CLINIQUE EQUINE - M. AUDIGIE Fabrice, Professeur - Mme BERTONI Lélia, Maître de conférences contractuel - Mme BOURZAC Céline, Maître de conférences contractuel - M. DENOIX Jean-Marie, Professeur - Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * - Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier - Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel	DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION - M. PARAGON Bernard, Professeur
UNITE D'IMAGERIE MEDICALE - Mme PEY Pascaline, Maître de conférences contractuel - Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier	DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE - Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences
UNITE DE MEDECINE - M. AGUILAR Pablo, Praticien hospitalier - Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences - M. BLOT Stéphane, Professeur* - M. CAMPOS Miguel, Maître de conférences associé - Mme FREICHE-LEGROS Valérie, Praticien hospitalier - Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences	UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES - M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Mme COCHET-FAIVRE Noëlle, Praticien hospitalier - M. GUILLLOT Jacques, Professeur * - Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences - M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Mme RISCO CASTILLO Verónica, Maître de conférences (rattachée au DSBP)
UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT - Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel - M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences - M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * - Mme MAENHOUDT Cindy, Praticien hospitalier	UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE - M. FAYOLLE Pascal, Professeur - M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences - M. MANASSERO Mathieu, Maître de conférences - M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* - Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) - Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur - M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences
	DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS - Mme STEBLAJ Barbara, Praticien Hospitalier
	DISCIPLINE : NOUVEAUX ANIMAUX DE COMPAGNIE - M. PIGNON Charly, Praticien hospitalier

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Professeur - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

UNITE D'HYGIENE QUALITE ET SECURITE DES ALIMENTS - M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Professeur - M. BOLNOT François, Maître de conférences * - M. CARLIER Vincent, Professeur	UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE - Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences* - M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel - M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - Mme EL BAY Sarah, Praticien hospitalier
UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES - Mme DUFOUR Barbara, Professeur* - Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur - Mme PRAUD Anne, Maître de conférences - Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel	UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE - M. ARNE Pascal, Maître de conférences - M. BOSSE Philippe, Professeur* - M. COURREAU Jean-François, Professeur - Mme DE PAULA-REIS Aline, Maître de conférences contractuel - Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur - Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences - M. PONTER Andrew, Professeur - Mme WOLGUST Valérie, Praticien hospitalier
UNITE DE PATHOLOGIE DES ANIMAUX DE PRODUCTION - M. ADJOU Karim, Maître de conférences * - M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. MILLEMANN Yves, Professeur - Mme ROUANNE Sophie, Praticien hospitalier	

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES - M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* - Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur - M. DEGUEURCE Christophe, Professeur - Mme ROBERT Céline, Maître de conférences	UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE - Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* - M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur - Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel - M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences
DISCIPLINE : ANGLAIS - Mme CONAN Muriel, Professeur certifié	UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE - M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences - Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur*
UNITE DE BIOCHIMIE - M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* - Mme LAGRANGE Isabelle, Praticien hospitalier - M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences	UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE - Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur - M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - M. TISSIER Renaud, Professeur*
DISCIPLINE : BIostatISTIQUES - M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences	UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE - Mme COMBRISON Hélène, Professeur - Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences - M. TIRET Laurent, Professeur *
DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE - M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié	DISCIPLINE : VIROLOGIE - Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *
DISCIPLINE : ETHOLOGIE - Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences	DISCIPLINE : SCIENCES DE GESTION ET DE MANAGEMENT - Mme FOURNEL Christelle, Maître de conférences contractuel
UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE - Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences - M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*	

REMERCIEMENTS

Au Professeur
Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,
Qui me fait l'honneur de présider le jury.
Hommage respectueux.

À Madame Pilot-Storck,
Maître de conférences à l'École nationale vétérinaire d'Alfort,
Qui a accepté de diriger ma thèse de doctorat vétérinaire, qui m'a toujours soutenue dans mon projet de me tourner vers la recherche, et qui restera un mentor pour moi.
Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance.

À Monsieur Tiret,
Professeur à l'École nationale vétérinaire d'Alfort,
Qui a accepté de faire partie de ce jury, et dont le savoir et l'émerveillement face à la science ont participé à ma motivation pour le métier de chercheur.
Qu'il soit assuré de ma gratitude.

À Madame Brunet,
Chargée de Recherche au Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, au Collège de France,
Qui a accepté de m'encadrer pendant mon stage de Master 2 ainsi que pendant ma thèse universitaire, qui a su tirer le meilleur de moi-même au cours de ce projet.
Sincères remerciements.

Aux autres membres de l'équipe dans laquelle j'ai été accueillie au Collège de France :
Monsieur Pardannaud, Madame Pibouin-Fragner et Julia Jagu, qui m'ont formée, encadrée,
et qui ont patiemment supporté toutes mes bêtises.
Remerciements respectueux.

Aux membres des autres équipes du Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie :
Afez, Elise, Pierre, Marion, Gwladys, Assunta, Alessia, Brunella, Virginie, pour leur gentillesse, leur positivisme et leur soutien moral.

À mes amis, qui m'ont soutenue dans ce travail de longue haleine, et qui ont subi relectures,
répétitions et longues heures de quantification.
Je vous remercie de toujours être à mes côtés.

À mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix professionnels, et qui sont
toujours fiers de leur fille, quoi qu'elle fasse.
Tendres remerciements.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	9
INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1 Le système cardiovasculaire	13
1.1 Organisation du système cardiovasculaire.....	13
1.2 Le système artériel.....	13
1.3 Le système capillaire.....	16
1.4 Le système veineux.....	17
2 Le système nerveux.....	21
2.1 Organisation du système nerveux	21
2.2 Organisation du système nerveux végétatif.....	21
2.3 Organisation du système nerveux végétatif orthosympathique	21
2.4 Les substances actives du système nerveux orthosympathique.....	24
3 Les récepteurs adrénergiques.....	25
3.1 Les récepteurs adrénergiques du groupe α_1	27
3.2 Les récepteurs adrénergiques du groupe α_2	28
3.3 Les récepteurs adrénergiques du groupe β	29
4 Développement embryonnaire de la Souris	33
4.1 De la fécondation à la morula	35
4.2 De la morula à la gastrulation	35
4.3 La gastrulation	37
4.4 La neurulation et l'organogenèse.....	38
4.5 Mise en place du système nerveux.....	40
4.6 Formation des somites	42
4.7 Développement des membres	43
4.8 La crête neurale et ses dérivés	43
5 Développement synchronisé des nerfs et des artères périphériques	47

6	Développement des nerfs orthosympathiques innervant les artères	51
6.1	Rôle de la Nétrine-1 dans la mise en place de l'innervation artérielle	51
6.2	Rôle de l'Éphrine-A4 dans la mise en place de l'innervation artérielle	53
7	Les jonctions neurovasculaires (JNV)	55
8	La jonction neuromusculaire.....	57
9	Les modèles utilisés	59
10	Les marquages utilisés	61
DEUXIEME PARTIE.....		63
1	Rappel du contexte scientifique.....	63
2	Résultats préalables.....	65
3	Matériel et Méthodes	69
3.1	Animaux.....	69
3.2	Dissections	69
3.3	Culture cellulaire.....	69
3.4	Coupes au cryostat	70
3.5	Immunomarquages.....	71
3.6	Anticorps utilisés	72
3.7	Imagerie	72
3.8	Quantification et analyses statistiques	72
4	Résultats.....	75
4.1	Rôle de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans la mise en place des JNV	75
4.2	Rôle du couple Éphrine-A4 / EphA4 dans la mise en place et la stabilisation des JNV.....	77
4.3	Mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place et le maintien des JNV par l'Éphrine-A4.....	79
4.4	Répartition des JNV à l'échelle de l'organisme	81
4.5	Rôles de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans le maintien de l'innervation artérielle à l'âge adulte.....	83
5	Discussion.....	85
5.1	Étude de la structure des JNV	85
5.2	Etude de la répartition des JNV à l'échelle de l'organisme.....	86
5.3	Rôle de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans la mise en place des JNV à partir de P10	86
5.4	Rôle du récepteur adrénergique α_1 dans la mise en place des JNV	87

5.5 Interaction entre le couple Éphrine-A4 / EphA4 et la répartition des récepteurs adrénergiques α_1	88
5.6 Interactions entre d'autres molécules d'intérêt et la répartition des récepteurs adrénergiques.....	88
5.7 Conservation à l'âge adulte des phénotypes observés à P2	89
CONCLUSION.....	91
BIBLIOGRAPHIE.....	93

.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'un vaisseau sanguin	13
Figure 2 : Structure histologique d'une artère élastique	14
Figure 3 : Structure histologique d'une artère musculaire	14
Figure 4 : Structure histologique d'une veine	17
Figure 5 : Comparaison de la structure histologique d'une artère et d'une veine	18
Figure 6 : Les valvules anti-reflux des veines	19
Figure 7 : Organisation du système nerveux orthosympathique	22
Figure 8 : Trajet des neurones préganglionnaire et post ganglionnaire orthosympathiques	23
Figure 9 : Répartition des récepteurs adrénérgiques alpha-1 selon les lits artériels	27
Figure 10 : Répartition des récepteurs adrénérgiques α_2	29
Figure 11 : Mécanisme d'action des récepteurs adrénérgiques β_1 et β_2	30
Figure 12 : Étapes de la segmentation chez la Souris	35
Figure 13 : Description du développement embryonnaire de la Souris entre l'implantation et le début de la gastrulation	36
Figure 14 : Gastrulation chez l'embryon de Souris	38
Figure 15 : Neurulation chez l'embryon de Souris	39
Figure 16 : Retourneement de l'embryon de Souris	39
Figure 17 : Divisions de l'encéphale primitif	40
Figure 18 : Parallélisme observé entre les réseaux nerveux et artériel périphériques	47
Figure 19 : Les artères et non les veines sont préférentiellement alignées avec les nerfs	48
Figure 20 : Labyrinthe vasculaire primitif	48
Figure 21 : Mise en place des plexus nerveux sensitif et orthosympathique périphériques	50
Figure 22 : L'Artémimine est une molécule de guidage des axones orthosympathiques le long des artères	51
Figure 23 : La maturation des artères a lieu de manière concomitante avec l'innervation par les nerfs orthosympathiques	52
Figure 24 : L'innervation orthosympathique des artères se met en place progressivement à partir du 2 ^e jour postnatal	53
Figure 25 : Vue en microscopie électronique à balayage d'un axone orthosympathique innervant	

des cellules musculaires lisses (intestin grêle de Rat)	55
Figure 26 : Chaîne de synthèse des catécholamines	61
Figure 27 : Les souris <i>Net^{+/-}</i> présentent des JNV de taille réduite, voire absentes.....	65
Figure 28 : Les souris <i>Net^{+/-}</i> ne maintiennent pas leur température corporelle en cas de refroidissement, en lien avec une absence de vasoconstriction périphérique	66
Figure 29 : Les artères de souris <i>Net^{+/-}</i> sont incapables de vasoconstriction en réponse à une stimulation adrénergique.....	67
Figure 30 : Les artères des souris <i>Net^{+/-}</i> se contractent de manière similaire à celle des souris WT en réponse à une stimulation par du chlorure de potassium	68
Figure 31 : Les JNV restent de taille constante mais sont plus nombreuses chez les individus <i>EphA4^{-/-}</i>	76
Figure 32 : Les JNV sont réduites en nombre et en taille chez les individus <i>Net^{+/-}</i>	77
Figure 33 : Les neurones orthosympathiques <i>EphA4^{-/-}</i> établissent plus de contacts avec les cellules musculaires lisses vasculaires que leurs homologues WT <i>in vitro</i>	78
Figure 34 : Augmentation du nombre de contacts entre neurones orthosympathiques <i>EphA4^{-/-}</i> et cellules musculaires lisses vasculaires	79
Figure 35 : La délétion du récepteur EphA4 dans les neurones orthosympathiques pourrait avoir un effet sur la mise en place des JNV et la répartition des récepteurs adrénergiques α_1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires	81
Figure 36 : La mise en place des JNV semble impliquer les récepteurs adrénergiques α_1 et la molécule d'adhérence neuronale NCAM	83
Figure 37 : La délétion du récepteur de EphA4 induit une hyperinnervation artérielle tandis que la délétion de la Nétrine-1 induit une hyperinnervation artérielle observable à l'âge adulte	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs contrôlant la vasoconstriction et la vasodilatation des artères	16
Tableau 2 : Description des phénotypes obtenus suite à la délétion d'un ou plusieurs sous-types de récepteurs adrénergiques chez la Souris	26
Tableau 3 : Description des étapes du développement embryonnaire de la Souris.....	34
Tableau 4 : Dérivés des vésicules cérébrales primaires.....	41
Tableau 5 : Dérivés des cellules de la crête neurale	44

TABLE DES ABRÉVIATIONS

AMP_c : Adénosine Mono-Phosphate Cyclique
Art : Artémine
E : jour embryonnaire
ET-3 : Endothéline-3
GCS : Ganglion Cervical Supérieur
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GDNF : *Glial Derived Neurotrophic Factor*
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
GPCR : *G Protein Coupled Receptor*
G_i : protéine G inhibitrice
G_s : protéine G stimulatric
Ig : Immunoglobuline
JNV : Jonction(s) NeuroVasculaire(s)
MCI : Masse Cellulaire Interne
MuSK : *Muscle Specific Kinase*
NCAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*
NGF : *Nerve Growth Factor*
NT-3 : Neurotrophine-3
P : jour postnatal
PBS : *Phosphate-Buffered Saline*
PFA : Paraformaldéhyde
SMA : *Smooth Muscle Actin*
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
TH : Tyrosine Hydroxylase
VEGF-A : *Vascular Endothelial Growth Factor-A*
WT : *Wild Type*

INTRODUCTION

Le système nerveux périphérique et le système cardiovasculaire sont deux systèmes qui ont été et qui sont encore largement étudiés, tant en recherche clinique que fondamentale. En effet, leur impact en clinique est important : de nombreuses affections touchent l'un ou l'autre de ces deux systèmes. Et si la physiologie du système cardiovasculaire commence à être comprise, le système nerveux, aussi bien central que périphérique reste encore bien mystérieux et la complexité de son organisation, de son développement et de son fonctionnement est encore difficilement appréhendable.

Il est maintenant admis que ces deux systèmes interagissent : certains nerfs périphériques, les nerfs orthosympathiques, assurent l'innervation des artères (et dans une moindre mesure des veines) (Brunet *et al.*, 2014), et les vaisseaux vascularisent les nerfs de gros calibre (Lundborg, 1979), assurant ainsi leur approvisionnement en oxygène et en nutriments. L'innervation orthosympathique des artères de résistance a un rôle physiologique important : c'est elle qui contrôle majoritairement la vasoconstriction de ces artères périphériques, participant ainsi au contrôle du flux sanguin dans les différents tissus et à la régulation de la pression artérielle systémique. Une innervation orthosympathique incorrecte des artères de résistance pourrait donc avoir un impact sur la régulation de la pression artérielle systémique.

La présente étude a pour objet la mise en place d'interactions fonctionnelles entre le système nerveux orthosympathique et le système artériel, et plus particulièrement les jonctions neurovasculaires, qui sont les points de contacts établis entre les nerfs orthosympathiques et les artères de résistance. Ces jonctions ont été décrites pour la première fois par Burnstock en 1971 et n'ont quasiment plus été étudiées depuis (Burnstock, 2008). A quoi ressemblent-elles réellement ? Quel est précisément leur rôle physiologique ? Comment se mettent-elles en place au cours du développement ? C'est à ces questions aujourd'hui inexplorées que j'ai tenté de répondre au cours de ce stage de Master 2 réalisé sous la direction d'Isabelle, au Collège de France.

Ce travail a été réalisé chez la Souris, à partir de lignées CD1 et C57BL/6J et de différentes lignées mutantes.

La première partie de cette thèse rappelle l'organisation des deux systèmes auxquels nous nous intéressons ici et fait le bilan des connaissances actuelles concernant les jonctions neurovasculaires à partir de la littérature.

La deuxième partie porte sur la partie expérimentale de cette étude, avec tout d'abord le détail du matériel et des méthodes utilisés pour ce projet, suivi des résultats obtenus et de la discussion de ces résultats.

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Le système cardiovasculaire

1.1 Organisation du système cardiovasculaire

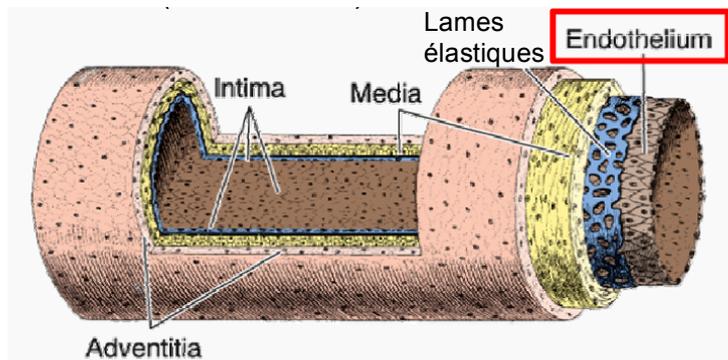
Le système cardiovasculaire est subdivisé en système vasculaire sanguin, dans lequel circule le sang, et en système vasculaire lymphatique, dans lequel circule la lymphe. Ce dernier est exclu de notre étude. Le système vasculaire sanguin comprend le cœur, le système artériel, le système capillaire et le système veineux (Reyes-Gomez, 2014).

1.2 Le système artériel

1.2.1 Structure des vaisseaux artériels

Tous les vaisseaux possèdent la même structure de base avec, de l'extérieur vers la lumière : l'adventice, la limitante élastique externe, la média, la limitante élastique interne et l'intima, tapissée par un endothélium (**Figure 1**) (Reyes-Gomez, 2014).

Figure 1 : Structure d'un vaisseau sanguin



(reproduit d'après Mescher, 2013)

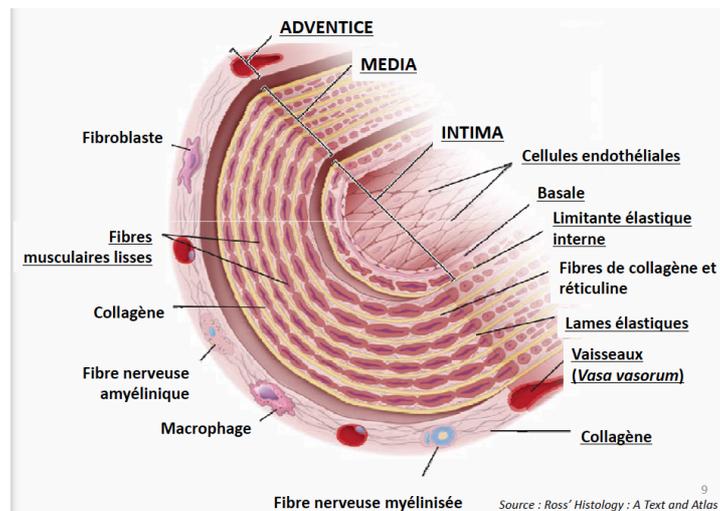
Tout vaisseau sanguin est constitué selon le même plan d'organisation avec, de l'extérieur vers la lumière : une adventice, tissu conjonctif entourant le vaisseau ; une média, en général constituée de cellules musculaires lisses et de lames élastiques ; et d'un endothélium.

La média des artères contient des lames élastiques et des fibres musculaires lisses, en plus ou moins grandes proportions selon la nature de l'artère (**Figures 2 et 3**). Les artères de calibre supérieur à 1 mm environ sont vascularisées par des vaisseaux sanguins de différentes origines (artères coronaires et céphaliques par exemple pour l'aorte). Ils constituent le *vasa vasorum* (**Figures 2 et 3**) (Mulligan-Kehoe et Simons, 2014).

Le système vasculaire sanguin comprend le cœur, les artères, les capillaires et les veines. Les artères à proximité du cœur (aorte, divisions de l'aorte, artères principales comme l'artère brachiale ou l'artère fémorale) sont de gros calibre et sont élastiques. Cette propriété est due à la présence de lames élastiques dans leur média (**Figure 2**).

Plus on s'éloigne du cœur, plus les artères diminuent de calibre et changent de propriétés : la quantité de lames élastiques de la *media* diminue progressivement (**Figure 3**), et les artères deviennent musculaires (Reyes-Gomez, 2014).

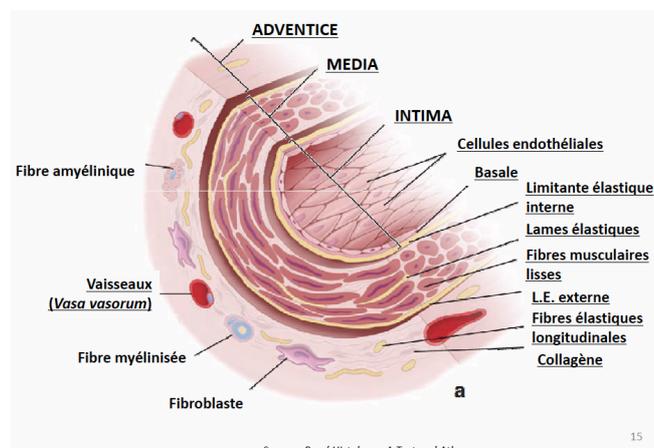
Figure 2 : Structure histologique d'une artère élastique



(reproduit d'après Ross, Wojciech, 2010)

Les artères élastiques possèdent une média de taille importante par rapport aux autres couches et très riche en lames élastiques, ce qui leur confère leurs propriétés. L'endothélium est constitué d'une seule assise de cellules. L'adventice est mince.

Figure 3 : Structure histologique d'une artère musculaire



(reproduit d'après Ross, Wojciech, 2010)

Les artères musculaires possèdent une média moins épaisse que celle des artères élastiques ; la proportion de lames élastiques est également bien moindre. Le rôle de ces artères n'est plus d'amortir les variations de pression sanguine, mais de contrôler le flux sanguin, en se contractant ou se dilatant.

Les artères de plus petit calibre et les artérioles ne présentent pas de *vasa vasorum*, leur faible épaisseur permettant un approvisionnement en oxygène et en nutriments des différentes couches directement à partir du sang circulant dans leur lumière. La *media* est très réduite, avec seulement trois couches de cellules musculaires lisses (Reyes-Gomez, 2014). Au cours de cette étude nous allons nous intéresser spécifiquement à ces artères, appelées artères musculaires (**Figure 3**).

1.2.2 Rôle physiologique des différentes artères

Les artères de gros calibres sont élastiques, ce qui leur permet d'absorber les variations de pression sanguine à la sortie du cœur et de linéariser le flux sanguin. Ainsi, le cœur éjecte du sang à haute pression (environ 120 mm Hg) en fin de systole. Cette pression retombe à environ 80 mmHg pendant la diastole. Une telle variation de pression serait défavorable dans les tissus périphériques, les soumettant à des contraintes importantes et empêchant un approvisionnement en nutriment et en oxygène correct (Tiret, 2013)

Les artères musculaires et les artérioles sont des artères de distribution, dont le rôle est de contrôler la distribution du flux sanguin dans les différents tissus périphériques. Leurs fibres musculaires lisses leur permettent de contrôler leur diamètre. Elles se contractent lorsqu'elles réduisent leur diamètre et se dilatent lorsqu'elles augmentent leur diamètre. La vasoconstriction est la réponse à une stimulation nerveuse orthosympathique et à certains facteurs hormonaux. La vasodilatation est majoritairement sous contrôle humoral. Elle peut être induite dans de très rares cas par une stimulation nerveuse parasympathique nitrergique (Toda et Okamura, 2014). Les neurones parasympathiques nitrergiques sont des neurones parasympathiques non cholinergiques et non peptidiques dont la neurotransmission est médiée par le monoxyde d'azote (NO) (Toda, Okamura, 2014). La vasodilatation induite par stimulation nerveuse parasympathique nitrergique concerne les artères coronaires et les artères cérébrales et même dans ces lits artériels, ce type de contrôle de la vasodilatation reste mineure (SNV Jussieu, 2014). Il est important de noter que l'innervation parasympathique des vaisseaux est très réduite chez les Vertébrés supérieurs, en particulier en ce qui concerne le domaine artériel. Les modalités de contrôle de la vasoconstriction et de la vasodilatation sont répertoriées dans le **Tableau 1** (Tiret, 2013).

Tableau 1 : Facteurs contrôlant la vasoconstriction et la vasodilatation des artères

Contrôle		Vasoconstriction	Vasodilatation
Nerveux	Orthosympathique	+	
	Parasympathique	+	+
		Vascularisation veineuse sub-digestive (veine porte, veine mésentérique et veine cave inférieure)	
			(+) Artères cérébrales, artères coronaires (nerfs nitrergiques)
Hormonal	Adrénaline, Noradrénaline	+	+
		(récepteurs adrénergiques α_1)	(adrénaline via les récepteurs β_2)
	Vasopressine	+	
	Angiotensine	+	
	Histamine		+
	Sérotonine		+
	Acétylcholine		+
Bradykinine		+	

(d'après Tiret, 2013)

La vasoconstriction des artères de petit calibre induit une réduction du débit sanguin en aval, ce qui redirige le flux sanguin vers les artères dilatées. Cela permet une répartition fine du flux sanguin (Tiret, 2013).

1.3 Le système capillaire

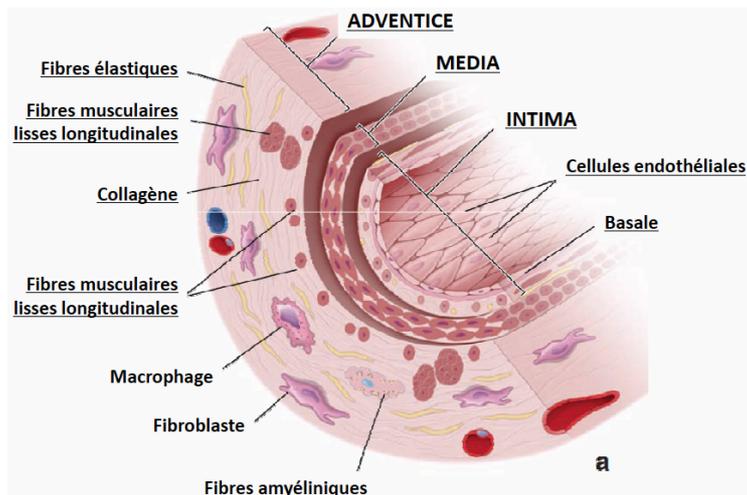
Les vaisseaux capillaires constituent des lieux d'échange entre le territoire sanguin et le milieu interstitiel. Ils ne jouent aucun rôle dans le contrôle du flux sanguin. Nous ne nous intéresserons pas à ce système ici. Nous pouvons néanmoins noter que les artérioles constituent un lien entre les artères et le plexus capillaire. L'intégrité du plexus capillaire dépend donc d'une bonne régulation du flux sanguin, c'est-à-dire d'une vasoconstriction efficace et régulée.

1.4 Le système veineux

1.4.1 Structure des veines

Les veines présentent également une structure en adventice – *media* – intima, comme indiqué sur la **Figure 4**. Par rapport aux artères, l'adventice est beaucoup plus développée et la *media* moins développée (**Figure 5**) (Reyes-Gomez, 2014).

Figure 4 : Structure histologique d'une veine

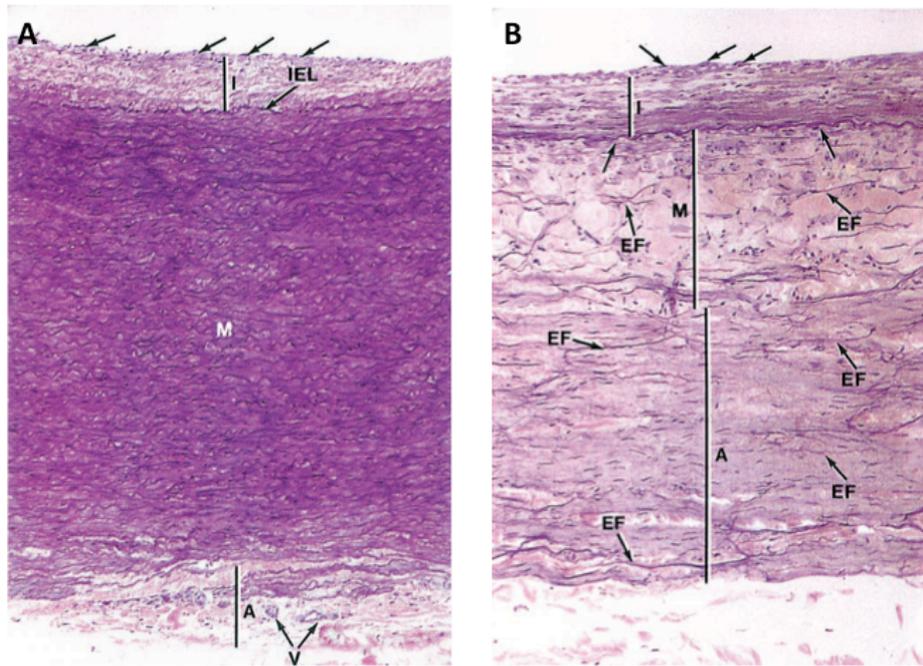


(reproduit d'après Ross, Wojciech, 2010)

Les veines présentent un adventice beaucoup plus développé que les artères, et une média beaucoup plus réduite, limitée à quelques couches de fibres musculaires lisses. Elles ne possèdent pas de lame élastique.

À la sortie du lit capillaire se trouvent les veinules, constituées d'une couche de cellules endothéliales recouverte d'une fine adventice. Plus on s'éloigne des capillaires et plus on s'approche du cœur, plus les veines augmentent de calibre. Cette augmentation de calibre est due à l'apparition et l'épaississement progressif de la *media* et au développement de l'adventice (Reyes-Gomez, 2014).

Figure 5 : Comparaison de la structure histologique d'une artère et d'une veine



(reproduit d'après Mescher, 2013)

La *media* des veines (**B**) est très réduite par rapport à celle des artères (**A**) tandis que l'adventice est beaucoup plus développée. La lame élastique interne a disparu. Ces différences sont à mettre en relation avec les rôles différents qu'assument ces deux types de vaisseaux. A : adventice ; EF : fibres élastiques ; I : *intima* ; IEL : Lamme élastique interne ; M : *media* ; V : *vasa vasorum*.

De même que les artères, les veines de calibre moyen et de gros calibre possèdent un *vasa vasorum* et sont innervées. Il est important de noter que, tandis que l'innervation des artères musculaire est inversement proportionnelle à leur calibre (autrement dit, ce sont les plus petites artères qui sont les plus innervées), seules les veines de gros et moyen calibre sont innervées. Cette différence anatomique est à mettre en relation avec une différence physiologique. L'innervation des veines est très majoritairement orthosympathique (SNV Jussieu, 2014) et bien moins dense proportionnellement que celle des artères (données du laboratoire). Le territoire veineux dit sub-digestif, comprenant la veine porte, la veine mésentérique et la veine cave inférieure, reçoit une innervation parasympathique à rôle vasoconstricteur (Toda et Okamura, 2014; Shigei *et al.*, 2010). Cette innervation veineuse parasympathique serait un vestige évolutif, témoignant de l'existence primitive d'une innervation vasculaire parasympathique, supplantée au cours de l'évolution par une innervation orthosympathique, différentielle selon les espèces et les lits vasculaires (Shigei *et al.*, 2010)

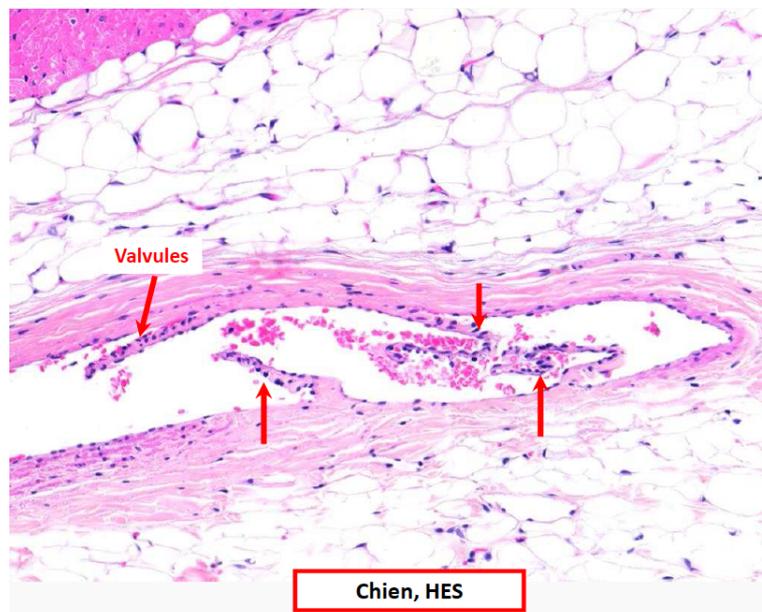
1.4.2 Rôle physiologique du système veineux

Les veines constituent un véritable réservoir sanguin : elles contiennent environ 70% du volume sanguin. Leur rôle essentiel est de ramener le sang pauvre en oxygène, riche en dioxyde de carbone et chargé de déchets au cœur (Reyes-Gomez, 2014 ; Tiret, 2013).

À la différence des artères de gros et moyen calibre qui sont élastiques, les veines de gros et moyen calibre sont compliantes. La compliance correspond au caractère distensible des vaisseaux, leur permettant d'accueillir un grand volume sanguin sans augmentation de pression (Reyes-Gomez, 2014 ; Tiret, 2013).

À la différence des artères, les veines ont une très faible capacité à modifier leur diamètre. Le retour veineux est donc essentiellement assuré de façon mécanique par les muscles squelettiques entourant les veines. Lorsque l'animal ou l'individu se meut, les muscles squelettiques se contractent et exercent ainsi des contraintes sur les veines, ce qui permet au sang de retourner progressivement vers le cœur. Toutes les veines sauf les veinules sont de plus équipées de valves anti-reflux (**Figure 6**), qui laissent passer le sang vers le cœur et qui limitent son reflux vers le réseau capillaire. Les veines possèdent néanmoins une faible capacité de vasoconstriction, permise par leur innervation orthosympathique ou parasympathique selon l'étage, la subdivision anatomique et l'espèce considérée (SNV Jussieu, 2014).

Figure 6 : Les valvules anti-reflux des veines



Vue au microscope optique d'une veine de chien, coloration Hémalum-Éosine-Safran. Les flèches rouges pointent les valvules des valves anti-reflux. (reproduit d'après Reyes-Gomez, 2014)

2 Le système nerveux

2.1 Organisation du système nerveux

Le système nerveux est subdivisé d'une part en système nerveux central (SNC) et en système nerveux périphérique (SNP). Le SNC comprend l'encéphale et la moelle épinière. Le SNP comprend toutes les autres formations nerveuses : les nerfs crâniens, qui émergent de l'encéphale et les nerfs spinaux, qui émergent de la moelle épinière (Pilot-Storck, 2013).

Le système nerveux est d'autre part subdivisé en système nerveux cérébro-spinal (ou somato-moteur), qui assure l'innervation des muscles striés squelettiques et en système nerveux végétatif, qui assure l'innervation des viscères (muscles lisses, glandes, cœur). Le système nerveux cérébro-spinal est contrôlé de façon consciente, tandis que le système nerveux végétatif est contrôlé de façon inconsciente (Pilot-Storck, 2013). Pour cette étude, nous nous concentrerons sur le système nerveux végétatif.

2.2 Organisation du système nerveux végétatif

Le système nerveux végétatif est lui-même divisé en système parasympathique et en système orthosympathique. Le système orthosympathique permet à l'organisme de répondre efficacement aux situations de stress et est souvent associé à des actions excitatrices, tandis que le système parasympathique a plutôt tendance à favoriser le métabolisme et la croissance de l'organisme, en dehors des situations de stress. Les actions ortho- et parasympathiques permettent de moduler le fonctionnement d'organes possédant une activité autonome, comme le cœur ou l'appareil digestif. Les systèmes ortho- et parasympathique agissent souvent de manière antagoniste sur les organes qu'ils innervent. Dans certains cas, on observe une nette prédominance de l'un par rapport à l'autre ; ainsi les artères reçoivent une innervation quasi-exclusivement orthosympathique. Dans d'autres cas, ils ont une action complémentaire : ainsi, le parasympathique est responsable de l'érection et l'orthosympathique de l'éjaculation (Pilot-Storck, 2013). Les artères recevant une innervation quasi-exclusivement orthosympathique, nous ne nous intéresserons qu'à cette subdivision.

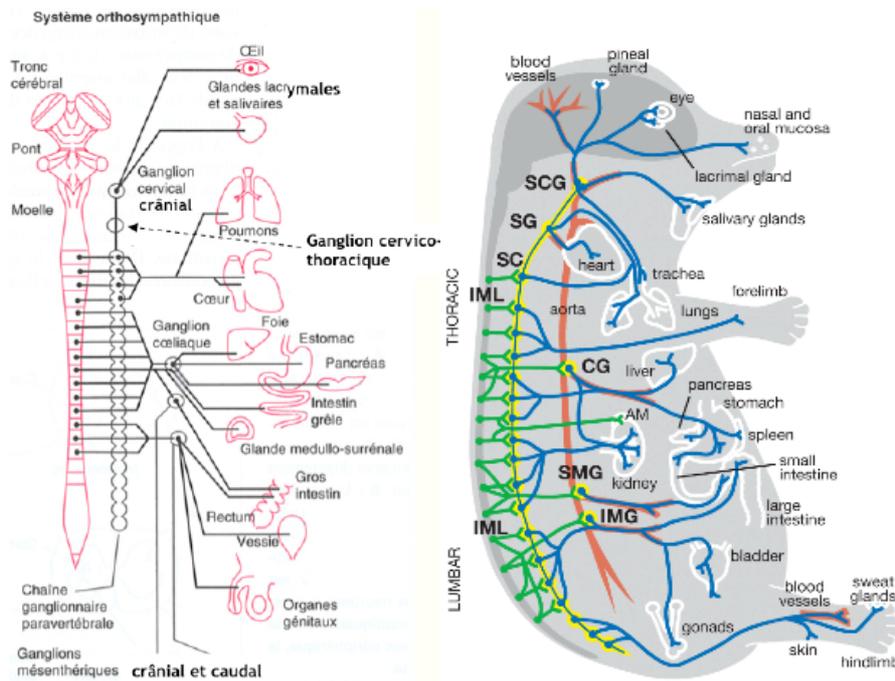
2.3 Organisation du système nerveux végétatif orthosympathique

Les neurones orthosympathiques émergent de la moelle épinière font relais dans un ganglion nerveux. Ces neurones sont dits préganglionnaires. Ils sont myélinisés et leur neurotransmetteur est l'acétylcholine (Pilot-Storck, 2013).

Au niveau du ganglion nerveux, un neurone postganglionnaire prend le relais pour conduire l'influx nerveux jusqu'à l'organe cible. Son neurotransmetteur est la noradrénaline (Pilot-Storck 2013).

La majorité des ganglions nerveux orthosympathiques sont situés le long de la colonne vertébrale, du premier segment thoracique au troisième segment lombaire, et constituent la chaîne ganglionnaire paravertébrale (**Figure 7**). Le corps cellulaire des neurones préganglionnaires est situé dans la corne latérale de la moelle épinière. Ils émergent au niveau de la racine ventrale (Pilot-Storck, 2013).

Figure 7 : Organisation du système nerveux orthosympathique



(reproduit d'après Glebova et Ginty, 2005 ; Richard, Orsal, 2007)

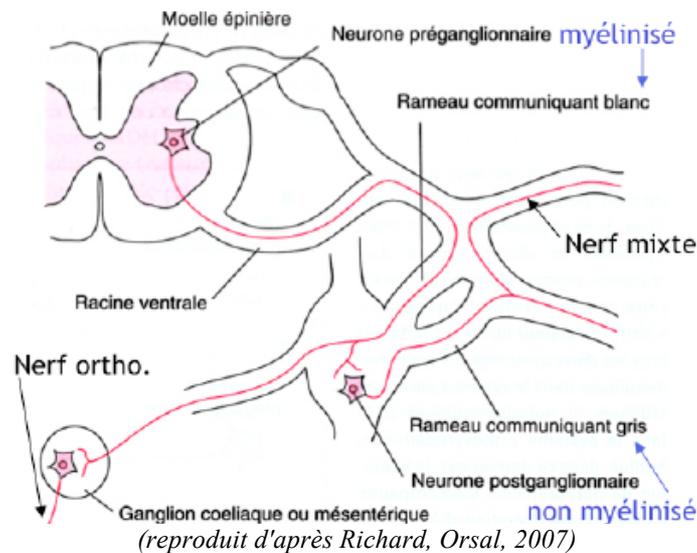
Les neurones orthosympathiques préganglionnaires émergent de la moelle épinière entre le premier segment thoracique et le troisième segment lombaire. Ils sont myélinisés et leur neurotransmetteur est l'acétylcholine. Ils font relais dans un ganglion de la chaîne ganglionnaire paravertébrale, aux exceptions près que constituent les ganglions cervicaux crânial et moyen, le ganglion cervico-thoractique, le ganglion coélique ainsi que les ganglions mésentériques crânial et caudal qui correspondent à la fusion de plusieurs ganglions, et ne sont pas exactement à côté de la colonne vertébrale. Les neurones postganglionnaires ne sont pas myélinisés et leur neurotransmetteur est la noradrénaline. Ils vont au contact des cellules cibles. La glande médullo-surrénale, composée de cellules chromaffines, est l'équivalent d'un ganglion orthosympathique. Elle sécrète une hormone : l'adrénaline. *Pineal gland* : glande pinéale ; *blood vessels* : vaisseaux sanguins ; *eye* : oeil ; *nasal and oral mucosa* : muqueuses orale et nasale ; *lacrymal gland* : glande lacrymale ; *salivary glands* : glandes salivaires ; *trachea* : trachée ; *heart* : cœur ; *forelimb* : membre supérieur ; *lungs* : poumons ; *aorta* : aorte ; *liver* : foie ; *stomach* : estomac ; *spleen* : rate ; *small intestine* : intestin grêle ; *large intestine* : gros intestin ; *kidney* : rein ; *bladder* : vessie ; *skin* : peau ; *sweat glands* : glandes sudoripares ; *hindlimb* : membre inférieur

Le neurone préganglionnaire rejoint le ganglion orthosympathique par un rameau communicant blanc (car le neurone préganglionnaire est myélinisé). Le neurone postganglionnaire rejoint le nerf spinal par un rameau communicant appelé gris car le neurone postganglionnaire n'est pas myélinisé (**Figure 8**). Le nerf spinal qui émerge de la moelle épinière est dit mixte, car il renferme à

la fois des fibres motrices myélinisées du système cérébro-spinal et des fibres orthosympathiques non myélinisées (Pilot-Storck, 2013).

En région crâniale et caudale, les neurones préganglionnaires traversent la chaîne ganglionnaire paravertébrale pour établir un relais dans un ganglion plus volumineux, qui correspond à la fusion de plusieurs ganglions : ganglion cervical crânial, ganglion cervical moyen, ganglion cervico-thoracique, ganglion cœliaque, ganglion mésentérique crânial et ganglion mésentérique caudal. Dans ce cas, le neurone postganglionnaire atteint sa cible via un nerf orthosympathique propre (Pilot-Storck, 2013).

Figure 8 : Trajet des neurones préganglionnaire et post ganglionnaire orthosympathiques



Le neurone préganglionnaire quitte la moelle épinière par un rameau communicant blanc (parce que myélinisé) et va établir un relais dans un ganglion nerveux, soit de la chaîne paravertébrale, soit situé plus à proximité de l'organe cible, comme c'est le cas pour les ganglions cœliaque et mésentérique par exemple. Le neurone postganglionnaire rejoint le nerf spinal par un rameau communicant gris (car non myélinisé). Le nerf spinal est dit mixte, car il contient à la fois des neurones moteurs myélinisés et des neurones orthosympathiques non myélinisés. Pour les ganglions éloignés de la moelle épinière, comme les ganglions cœliaque ou mésentérique, le neurone orthosympathique postganglionnaire va directement innervier sa cible.

Cas particulier de la glande médullo-surrénale

La glande surrénale est une petite glande située dans le rétro-péritoine, crânialement aux reins. Elle est divisée en deux parties : la cortico-surrénale, qui correspond au cortex de la glande, et la médullo-surrénale, qui correspond à sa partie centrale.

Du fait de sa constitution et de son origine embryologique, la médullo-surrénale peut être considérée comme un ganglion orthosympathique modifié. Elle reçoit une afférence orthosympathique par un neurone préganglionnaire issu de la moelle épinière. Elle est constituée de cellules chromaffines qui sont des cellules glandulaires équivalentes de neurones postganglionnaires mais qui sécrètent leur substance active, l'adrénaline, dans le sang et non dans des synapses (Pilot-Storck, 2013).

2.4 Les substances actives du système nerveux orthosympathique

Les neurones postganglionnaires orthosympathiques libèrent de la noradrénaline. Les cellules chromaffines de la médullo-surrénale sécrètent de l'adrénaline (l'adrénaline est une hormone synthétisée à partir de la noradrénaline). L'adrénaline et la noradrénaline se lient à des récepteurs adrénergiques qui médient leur action (Pilot-Storck, 2013).

3 Les récepteurs adrénergiques

Les récepteurs adrénergiques sont des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) (Pierce, Premont, Lefkowitz, 2002). Il en existe neuf sous-types, divisés en trois groupes : α_1 , α_2 et β .

Les récepteurs couplés à des protéines G

Les GPCR sont des récepteurs à sept hélices transmembranaires. La fixation du ligand au récepteur induit une modification de conformation de ce dernier, ce qui le rapproche de la protéine G à laquelle il est couplé. La protéine G est composée de trois sous-unités : une sous-unité alpha ($G\alpha$), une sous-unité bêta ($G\beta$) et une sous-unité gamma ($G\gamma$). La sous-unité $G\alpha$ est liée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) à l'état inactif. Le rapprochement entre le GPCR et la protéine G induit une baisse de l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le GDP qui est alors expulsée. La sous-unité $G\alpha$ présente alors une forte affinité pour la guanosine triphosphates (GTP), qui est en forte concentration dans la cellule. Une molécule de GTP prend donc la place de la molécule de GDP expulsée : la protéine G est sous forme active. La protéine G se dissocie en $G\alpha$ -GTP d'un côté et $G\beta\gamma$ de l'autre, chacune allant influencer des molécules effectrices différentes. Selon les cellules, la protéine G peut être activatrice ou bien inhibitrice. La phase active de la protéine G s'achève par l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui conduit à la réassociation des trois sous-unités de la protéine G. Ce système de transduction du signal par activation de seconds messages permet d'amplifier le signal (Tuteja, 2009).

Chaque groupe est constitué de trois sous-types : α_{1A} , α_{1B} et α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} ; β_1 , β_2 et β_3 . Le rôle physiologique précis de chacun de ces neuf sous-type n'a pas encore été complètement étudié, en raison du manque de ligands spécifiques de chaque sous-type à l'heure actuelle (Philipp et Hein, 2004). Néanmoins, l'approche par inactivation génétique a permis de créer des souris mutées spécifiquement pour un ou plusieurs sous-types (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Description des phénotypes obtenus suite à la délétion d'un ou plusieurs sous-types de récepteurs adrénérgiques chez la Souris

Lignée de Souris	Phénotype obtenu	Référence
$\alpha_{1A}^{-/-\dot{E}\dot{E}^1}$	Diminution de la pression artérielle de repos	(Rokosh, Simpson, 2002)
$\alpha_{1B}^{-/-}$	Pression artérielle normale, diminution de la réponse à la phényléphrine (agoniste α_1)	(Cavalli <i>et al.</i> , 1997)
$\alpha_{1D}^{-/-}$	Diminution de la pression artérielle de repos	(Tanoue, Koba, <i>et al.</i> , 2002; Tanoue, Koshimizu, Tsujimoto, 2002; Tanoue, Nasa, <i>et al.</i> , 2002)
$\alpha_{1AB}^{-/-}$	Croissance cardiaque postnatale réduite	(O'Connell <i>et al.</i> , 2003)
$\alpha_{2A}^{-/-}$	Absence de sensibilité aux agonistes α_2 ; libération augmentée de noradrénaline	(Altman <i>et al.</i> , 1999; Hein, Altman, Kobilka, 1999; MacMillan <i>et al.</i> , 1996)
$\alpha_{2B}^{-/-}$	Absence de réponse hypertensive aux agonistes α_2 intravasculaires ² ; absence d'effet analgésique du monoxyde d'azote (NO).	(Link <i>et al.</i> , 1996; Sawamura <i>et al.</i> , 2000)
$\alpha_{2C}^{-/-}$	Augmentation de la sécrétion d'adrénaline, altération du comportement et augmentation des réactions agressives	(Brede <i>et al.</i> , 2003; Scheinin, Sallinen, Haapalinna, 2001)
$\alpha_{2ABC}^{-/-}$	Létal à l'état embryonnaire par défaut de développement de la vascularisation placentaire	(Philipp, Brede, Hein, 2002; Philipp <i>et al.</i> , 2002)
$\beta_1^{-/-}$	Absence de réponse cardiaque à l'isoprotérénol (agoniste β_1 et β_2), altérations dans le contrôle dynamique de la fréquence cardiaque, défaut de relaxation vasculaire	(Chruscinski <i>et al.</i> , 2001, 2001; Rohrer <i>et al.</i> , 1996)
$\beta_2^{-/-}$	Atténuation de la réponse hypotensive aux agonistes β , diminution de la masse de graisse corporelle	(Chruscinski <i>et al.</i> , 1999)
$\beta_3^{-/-}$	Augmentation de la masse de graisse corporelle	(Revelli <i>et al.</i> , 1997; Susulic <i>et al.</i> , 1995)
$\beta_{12}^{-/-}$	Altération de la contractilité et du taux métabolique ; effet chronotrope négatif	(Rohrer <i>et al.</i> , 1999)
$\beta_{123}^{-/-}$	Altération de la thermogenèse induite par le régime alimentaire (mutant constitutif)	(Bachman <i>et al.</i> , 2002)

(d'après Philipp et Hein, 2004)

¹ L'exposant $-/-$ indique un individu homozygote muté pour le gène en question ; ainsi, une souris $\alpha_{1A}^{-/-}$ ne possède aucun récepteur adrénérgique du sous-type α_1 .

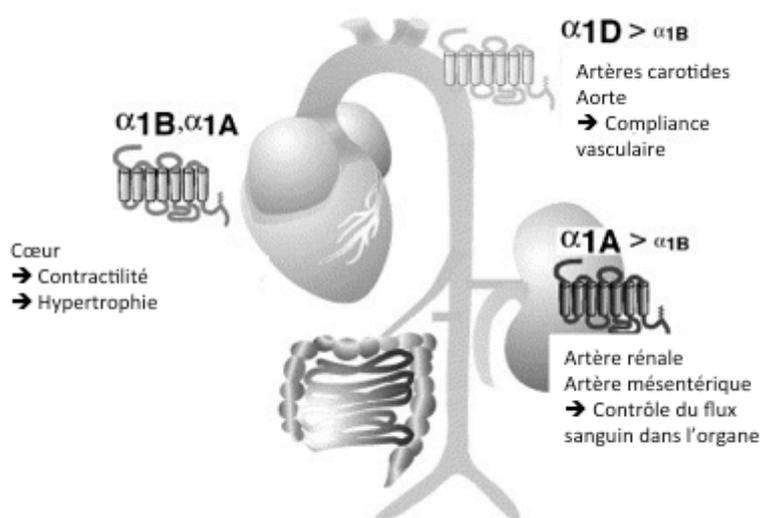
² L'administration intravasculaire d'alpha2-agonistes induit une réponse biphasique : une courte réponse hypertensive, due à une augmentation du tonus vasculaire, suivie d'une hypotension plus durable ; les mutants pour le récepteur adrénérgique α_{2B} ne présentent pas la première phase. (Philipp et Hein 2004)

3.1 Les récepteurs adrénérgiques du groupe α_1

Les trois sous-types participent à la régulation du tonus vasculaire (Philipp et Hein, 2004). Plusieurs études suggèrent que les trois sous-types sont néanmoins répartis de façon différentielle dans certains lits artériels (**Figure 9**). Ainsi, les récepteurs adrénérgiques α_{1A} constituent le sous-type prédominant dans le lit artériel rénal et le lit artériel mésentérique, tandis que ce sont les récepteurs adrénérgiques de sous-type α_{1D} qui prédominent au niveau des artères carotides et de l'aorte (Philipp et Hein, 2004). Au niveau du cœur, on observe la coexistence en proportions approximativement équivalentes, des récepteurs adrénérgiques de sous-types α_{1A} et α_{1B} (Philipp et Hein, 2004).

Les récepteurs du groupe α_1 , et plus particulièrement les récepteurs α_{1B} , seraient de plus impliqués dans le développement de l'hypertension et de l'hypertrophie vasculaire, via leur action sur la structure du cœur et la fonction cardiaque (Simpson *et al.*, 1991). L'implication des récepteurs α_{1A} et α_{1B} dans la fonction cardiaque semble redondante chez la Souris (O'Connell *et al.*, 2003 ; Turnbull *et al.*, 2003). Ces récepteurs pourraient avoir un rôle dans le contrôle de la croissance et de la fonction cardiaques.

Figure 9 : Répartition des récepteurs adrénérgiques alpha-1 selon les lits artériels



(reproduit d'après Philipp et Hein, 2004)

Selon le lit artériel considéré, différents sous-types de récepteurs adrénérgiques α_1 prédominent. Ainsi, au niveau des artères de gros calibre comme l'aorte et les artères carotides, le contrôle de la vasoconstriction est médiée par le récepteur α_{1D} , et dans une moindre mesure par le récepteur α_{1B} . Au niveau du cœur, on observe une quasi-codominance des récepteurs adrénérgiques des sous-types α_{1B} et α_{1A} (avec une légère prédominance du sous-type α_{1B}). Ils sont impliqués dans la croissance postnatale du cœur et dans le contrôle de la contractilité cardiaque. Au niveau de l'artère rénale et des artères mésentériques, ce sont les récepteurs adrénérgiques α_{1A} qui prédominent. En contrôlant la vasoconstriction de ces artères, ils permettent la régulation du flux sanguin parvenant à ces organes.

Au niveau du système nerveux central, les récepteurs α_1 semblent impliqués dans la réactivité aux situations nouvelles et dans l'apprentissage. Ainsi, les souris dépourvues de récepteur α_{1B} présentaient une réactivité améliorée face aux situations nouvelles, mais un défaut d'apprentissage (Drouin *et al.*, 2002). Plusieurs éléments indiquent également que ces récepteurs sont impliqués dans la vulnérabilité aux addictions (Drouin *et al.*, 2002 ; Spreng, Cotecchia, Schenk, 2001 ; Zuscik *et al.*, 2000).

3.2 Les récepteurs adrénergiques du groupe α_2

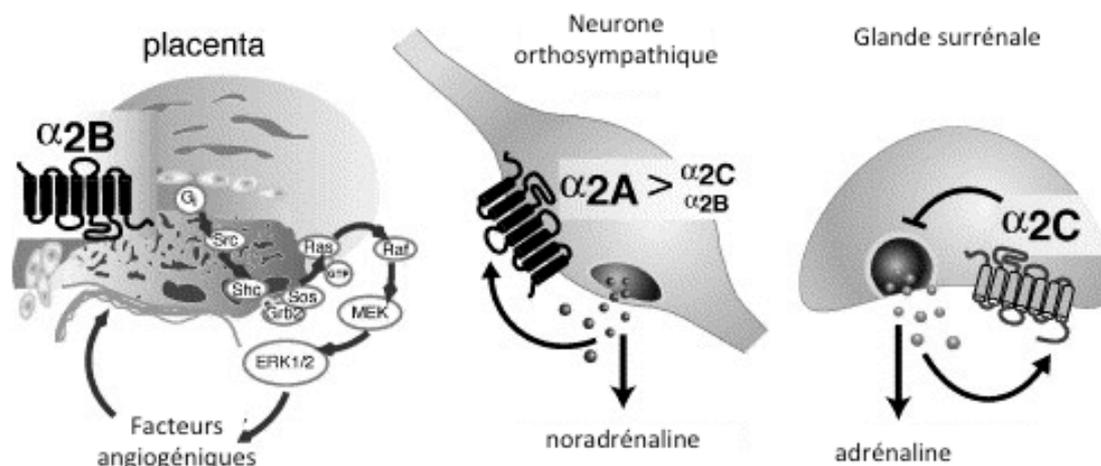
Historiquement, les récepteurs adrénergiques du type α_2 ont été décrits en 1974 comme des récepteurs présynaptiques inhibant la libération de noradrénaline par les neurones végétatifs orthosympathiques (Dubocovich, Langer, 1974 ; Starke *et al.*, 1974).

Plus tard, différents sous-types ont été identifiés parmi le groupe α_2 (Bylund *et al.*, 1994). Des études pharmacologiques suggèrent que l'inhibition présynaptique de la libération de noradrénaline est principalement médiée par le récepteur α_{2A} (Trendelenburg *et al.*, 1997). Cela a été confirmé par délétion génétique chez la Souris (Altman *et al.*, 1999). L'inactivation du gène codant pour le récepteur α_{2A} chez la Souris a révélé qu'il n'était pas le seul à médier cette action : plus précisément, il inhibe la libération de noradrénaline par les neurones orthosympathiques pour des hautes fréquences de potentiels d'action tandis que le récepteur α_{2C} médie cette même action pour des fréquences de potentiels d'action plus faibles (Altman *et al.*, 1999 ; Cleary, Vandeputte, Docherty, 2002 ; Hein, Altman, Kobilka, 1999 ; Trendelenburg *et al.*, 2001, 1999). Les récepteurs α_{2C} contrôlent également la sécrétion d'adrénaline par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale (Brede *et al.*, 2003).

Les récepteurs α_{2B} sont quant à eux essentiels au développement de la vascularisation du placenta (Philipp *et al.*, 2002).

La répartition des différents sous-types est détaillée dans la **Figure 10**.

Figure 10 : Répartition des récepteurs adrénérgiques α_2



(reproduit d'après Philipp et Hein, 2004)

Les récepteurs α_{2B} sont essentiels au développement de la vascularisation placentaire. Les récepteurs α_2 sont également localisés sur les neurones orthosympathiques, en région présynaptique des jonctions neurovasculaires. Dans ce cas, ils exercent un rétrocontrôle négatif sur la libération du neurotransmetteur orthosympathique, la noradrénaline. Tous les sous-types de récepteurs α_2 peuvent être observés en région présynaptique sur les neurones orthosympathique, bien que les récepteurs du sous-type α_{2A} soient largement majoritaires. Les récepteurs adrénérgiques du sous-type α_{2C} jouent un rôle similaire pour les cellules chromaffines de la médullo-surrénale.

Les récepteurs α_2 sont également présents dans les fibres musculaires lisses des veines, ce qui permet une légère vasoconstriction de ces dernières (Guimarães, Moura, 2001), facilitant ainsi le retour veineux. Dans ce contexte, la liaison de l'adrénaline ou de la noradrénaline au récepteur adrénérgique active une G_i qui inhibe l'activité de l'adényl cyclase (SNV Jussieu, 2014).

3.3 Les récepteurs adrénérgiques du groupe β

La fonction de ces récepteurs a été surtout étudiée dans le système cardiovasculaire et dans la régulation métabolique de la mise en place du tissu adipeux. Les sous-groupes β_1 et β_2 sont assez proches l'un de l'autre et diffèrent plus fortement du groupe β_3 . Les récepteurs du groupe β médient les effets chronotrope³ positif, inotrope⁴ positif et lusitrope⁵ positif des catécholamines.

3.3.1 Les récepteurs adrénérgiques β impliqués dans le système cardiovasculaire

Dans le système cardiovasculaire, les trois sous-groupes de récepteurs adrénérgiques β sont présents dans les vaisseaux sanguins et le cœur (Chruscinski *et al.*, 2001).

Les récepteurs β_1 cardiaques médient l'effet chronotrope et inotrope positif des catécholamines (Rohrer *et al.*, 1996). Sur cellules cardiaques isolées, la stimulation des récepteurs β_2 par des

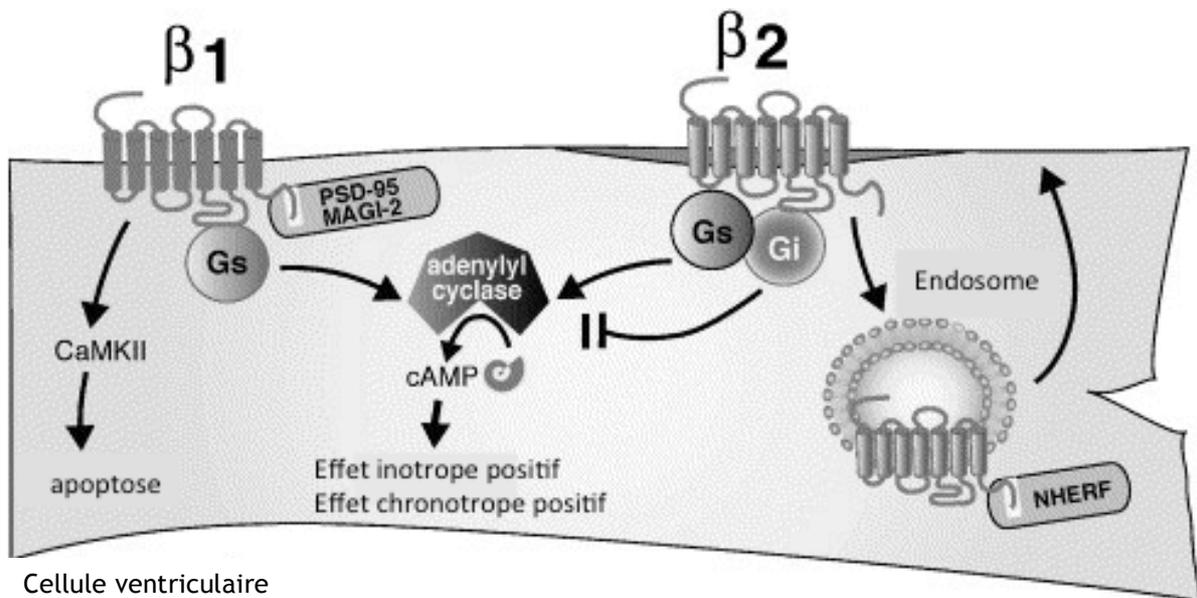
³ Un effet chronotrope positif correspond à une augmentation de la fréquence des cellules cardiaques.

⁴ Un effet inotrope positif correspond une augmentation de la capacité des cellules myocardiques à se contracter en réponse à un potentiel d'action.

⁵ Un effet lusitrope positif correspond à une amélioration de la relaxation des cellules cardiaques.

catécholamines a un court effet inotrope positif suivi par un effet chronotrope négatif prolongé (Devic *et al.*, 2001). Plus précisément, ces deux sous-groupes de récepteurs adrénergiques seraient présents sur les mêmes cardiomyocytes mais auraient des rôles différents du fait qu'ils n'activent pas la même protéine G. Ainsi, les récepteurs β_1 activent une protéine G stimulatrice (G_s) ; les récepteurs β_2 activent une protéine G inhibitrice (G_i) en plus de la G_s (Devic *et al.*, 2001). Les récepteurs β_2 activent d'abord la G_s , ce qui est à l'origine de l'effet inotrope positif transitoire. Ensuite, les récepteurs β_2 activent une G_i , ce qui est à l'origine de l'effet bathmotrope négatif (Figure 11).

Figure 11 : Mécanisme d'action des récepteurs adrénergiques β_1 et β_2



(reproduit d'après Philipp et Hein, 2004)

PSD-95, MAGI-2 et NHERF sont des protéines d'échaffaudage contenant un domaine PDZ qui interagissent avec la partie C-terminale du récepteur adrénergique. La fixation de l'adrénaline ou de la noradrénaline au récepteur β_1 induit l'activation d'une G_s , qui va stimuler une adényl cyclase, ce qui a pour conséquence l'augmentation du taux d'AMP_C (adénosine monophosphate cyclique) intracellulaire, ce qui a un effet chronotrope et inotrope positif sur le cardiomyocyte. La fixation de l'adrénaline au récepteur β_2 induit la stimulation de la même G_s que précédemment dans un premier temps, ce qui est à l'origine d'un effet inotrope positif transitoire. Puis le récepteur adrénergique β_2 active une protéine G_i , ce qui a pour effet de bloquer la signalisation précédente, ce qui se traduit par un effet chronotrope négatif prolongé.

3.3.2 Récepteurs adrénergiques β et régulation métabolique

Les expériences de délétion spécifique des récepteurs adrénergiques des différents sous-groupes β_1 , β_2 et β_3 ont révélé l'implication du récepteur β_2 dans la constitution de la graisse corporelle (Chruscinski *et al.*, 1999) et du récepteur β_3 dans la lipolyse (Revelli *et al.*, 1997 ; Susulic *et al.*, 1995). De plus, les souris mutées pour l'ensemble des récepteurs adrénergiques de type β présentent une prise alimentaire normale mais un niveau métabolique réduit et un taux de leptine supérieure à la normale, ce qui suggère également une implication du récepteur β_1 dans la régulation métabolique des réserves de graisse (Bachman *et al.*, 2002).

La leptine

La leptine est une hormone pléiotrope essentielle constituée de 167 acides aminés, sécrétée par le tissu adipeux blanc, qui a des effets importants sur le SNC. Le niveau de leptine circulante indique principalement à l'encéphale le niveau d'énergie stockée sous forme de graisse, le niveau de leptine circulante (ou leptinémie) étant proportionnel à la masse de graisse corporelle. Le niveau de leptine circulante varie secondairement aux changements d'ingestion d'énergie (Chan *et al.*, 2003). La leptinémie chute plus sévèrement en réponse à un jeûne qu'à une diminution significative de la masse de graisse corporelle, ce qui suggère plus largement que la leptine régule l'homéostasie énergétique plutôt que la perte de masse graisseuse (Boden *et al.*, 1996).

4 Développement embryonnaire de la Souris

Il nous paraît essentiel à ce stade de rappeler quelques éléments d'embryologie, qui seront nécessaires à la compréhension de la partie suivante.

Pour commencer, le **Tableau 3** présente un récapitulatif des grandes étapes du développement embryonnaire de la Souris. Ces différentes étapes seront détaillées par la suite.

Tableau 3 : Description des étapes du développement embryonnaire de la Souris

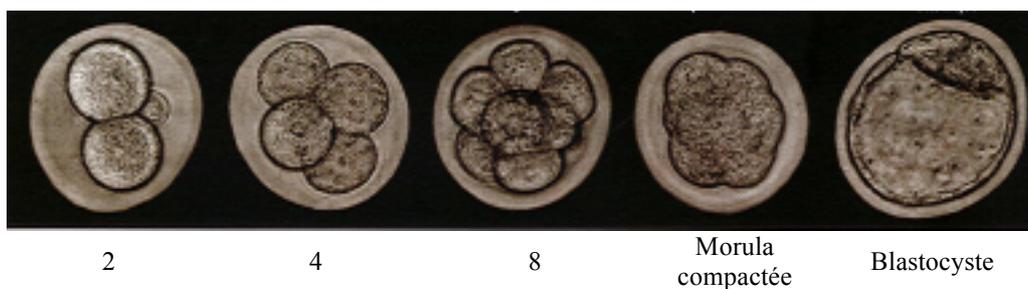
Jours de développement	Étapes du développement
0-1	1 cellule
1	2-4 cellules
2	8-64 cellules. Compaction. Morula
3	Formation du blastocyste
4	Éclosion du blastocyste
4,5	Attachement du blastocyste. Apparition de l'endoderme.
5	Implantation. Apparition du cône ectoplacentaire. Formation de l'ovocylindre.
6	Différenciation de l'ovocylindre. Apparition de la cavité proamniotique.
6,5	Apparition de la ligne primitive.
7	Replis amniotiques. Formation des cavités amniotique et extracelomique. Apparition du noeud et du bourgeon allantoïdien.
7,5	Neurulation. Individualisation des cellules des crêtes neurales. Céphalisation. Allongement de l'allantoïde.
8	7 premières paires de somites. 1 ^{er} arc branchial. Ébauche cardiaque. Contact allantoïde/chorion. Début du retournement.
8,5	Retournement de l'embryon. 2 ^e arc branchial. Formation de la vésicule otique. Apparition du septum transversum.
9	Formation et fermeture du neuropore antérieur. 3 ^e arc branchial. Ébauche hépatique. Fin du retournement.
9,5	Bourgeons des membres antérieurs. Formation du neuropore postérieur. Début de la vésiculation céphalique. Bourgeonnement des poumons.
10	Fermeture du neuropore postérieur. Bourgeons des membres postérieurs et de la queue. Formations des cupules optiques.
10,5 – 12	Différenciation des yeux. Allongement de la queue. Élongation des membres.
12,5 – 15	Apparition des doigts. Apparition des os des membres et des follicules pileux.
15,5 – 18	Modelage des extrémités des pattes. Fermeture des yeux. Formation des oreilles externes.
18-21	Naissance.

(Foucrier, Franquinet, Vervoort, 2003)

4.1 De la fécondation à la morula

Chez la Souris, la fécondation a lieu dans la partie crâniale des trompes utérines. Les premiers clivages sont relativement lents en comparaison avec d'autres vertébrés, le premier ayant lieu 24 h après la fécondation, c'est-à-dire au jour embryonnaire 1 (E1). Il partage la cellule-œuf en deux parties, appelées blastomères. Les clivages suivants se poursuivent à environ 12h d'intervalle (Wolpert *et al.*, 2007). La segmentation correspond à cette phase où les mitoses se succèdent, augmentant ainsi le nombre de cellules de l'embryon. Elle est dite subégale chez la Souris, car l'un des deux blastomères primitifs est un peu plus volumineux que l'autre (**Figure 12**). Entre les stades 8 à 64 cellules, l'embryon est appelé morula, car il ressemble à une petite mûre. Au stade morula, qui est atteint à E2,5, les blastomères sont tous approximativement de taille équivalente. Au stade 8 cellules, les blastomères augmentent leur surface de contact entre eux : c'est la compaction (Wolpert *et al.*, 2007).

Figure 12 : Étapes de la segmentation chez la Souris



(reproduit d'après Wolpert *et al.*, 2007)

Vues d'un embryon de Souris au cours de la segmentation, du stade 2 cellules au stade blastocyste. Jusqu'à ce stade, l'embryon est appelé morula. À partir du stade 8 cellules, l'espace entre les cellules se réduit, et des jonctions serrées apparaissent. C'est la compaction. La fusion des espaces intercellulaires a pour conséquence la constitution d'une cavité interne, appelée blastocœle. L'embryon devient alors un blastocyste.

4.2 De la morula à la gastrulation

L'embryon migre progressivement vers la cavité utérine.

À E3,5, une fente se forme dans la masse cellulaire, qui sera à l'origine du blastocœle. Le blastocœle est une cavité remplie de liquide qui se forme à l'intérieur de l'embryon. Il résulte de la segmentation (les mitoses successives créent un espace) et de la production de liquide par les cellules. L'embryon devient alors un blastocyste (SNV Jussieu, 2014).

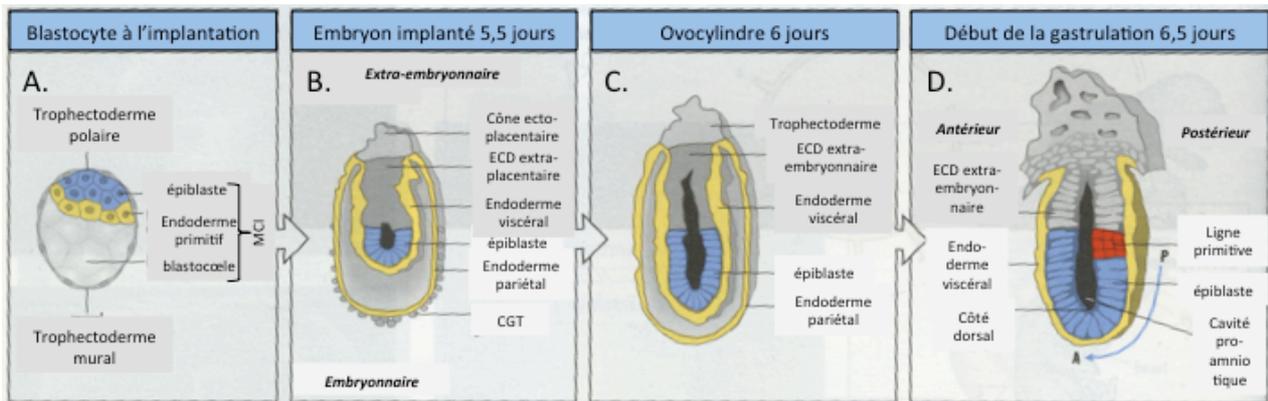
La zone pellucide de l'ovocyte est progressivement dissoute au cours de la progression de l'embryon vers la cavité utérine. Vers E4,5 l'embryon éclot, c'est-à-dire qu'il s'extériorise de ce qu'il restait de zone pellucide. Il adhère presque aussitôt à l'épithélium utérin. À ce stade, l'embryon est constitué de deux types de cellules :

- des cellules totipotentes qui constituent le bouton embryonnaire ou la masse cellulaire interne (MCI) ; elles sont environ une trentaine à ce stade (SNV Jussieu, 2014)
- le reste des cellules de la morula forme une couche monocellulaire d'une centaine de cellules qui enveloppe tout l'embryon, appelé trophoctoderme (SNV Jussieu, 2014 ; Wolpert *et al.*, 2007). Ce feuillet est d'abord constitué de cellules diploïdes normales. Une partie du trophoblaste participera à la formation d'une partie du placenta embryonnaire.

La distinction de ces deux types cellulaires suite à la segmentation est une caractéristique du développement embryonnaire des Mammifères (Wolpert *et al.*, 2007).

Entre E3,5 et E4,5, la MCI se divise en deux régions. Le feuillet de surface en contact avec le blastocœle devient l'endoderme primitif, qui participera à la constitution des annexes embryonnaires (vitellus, amnios et allantoïde). Le reste de la MCI devient l'ectoderme primitif ou épiblaste. Il sera à l'origine des tissus embryonnaires et d'une partie des annexes. Enfin, on distingue un trophoctoderme polaire et un trophoctoderme mural formés à partir du trophoblaste (**Figure 13**).

Figure 13 : Description du développement embryonnaire de la Souris entre l'implantation et le début de la gastrulation



(reproduit d'après Wolpert *et al.*, 2007)

A. Avant l'implantation, entre E3,5 et E4,5, la masse cellulaire interne se divise en deux régions : l'épiblaste (ectoderme primitif) et l'endoderme primitif. Ces deux régions constituent le trophoctoderme polaire. Les cellules recouvrant le blastocœle constituent le trophoctoderme mural. **B.** Après l'implantation, les cellules du trophoctoderme en contact avec l'épiblaste forment les tissus extraembryonnaires et le cône ectoplacental ainsi que l'ectoderme extraembryonnaire, qui sera à l'origine du placenta. Les cellules du trophoctoderme mural deviennent les cellules géantes du trophoctoderme. **C.** L'épiblaste s'allonge et développe une cavité interne en forme de tasse ou de U, appelée la cavité proamniotique. L'embryon prend une forme cylindre et est alors appelé « ovocylindre ». **D.** Le début de la gastrulation est marqué par l'apparition de la ligne primitive dans la partie postérieure de l'épiblaste.
CGT : cellules géantes du trophoblaste. ECD : ectoderme.

La nidation a lieu à E4,5. Elle correspond à l'implantation de l'embryon dans la paroi de l'utérus. Pour cela, l'embryon érode l'épithélium de l'utérus, ce qui lui permet d'entrer en contact direct avec la couche suivante, l'endomètre.

À E5,5, les cellules du trophoctoderme mural subissent des endomitoses, ce qui donne naissance aux cellules géantes du trophoblaste qui envahissent l'utérus pendant l'implantation. Le trophoctoderme polaire en contact avec l'épiblaste forme les tissus extraembryonnaires, le cône ectoplacentaire et l'ectoderme extraembryonnaire, qui participera à la formation du placenta (**Figure 13**). Le cône ectoplacentaire est une structure caractéristique de l'embryon de Souris, qui résulte de la fusion de certaines cellules du trophoctoderme polaire en un syncytium, également appelé syncytiotrophoblaste.

Certaines cellules de l'endoderme primitif migrent pour couvrir complètement la surface interne du trophoctoderme mural. Elles deviennent l'endoderme pariétal. Les cellules de l'endoderme primitif restantes forment l'endoderme viscéral.

L'épiblaste s'allonge et développe une cavité interne appelée la cavité proamniotique. Il n'est alors plus qu'une seule couche épithéliale en forme de tasse constituée d'un millier de cellules. C'est à partir de cette couche que se développera le futur embryon (**Figure 13**).

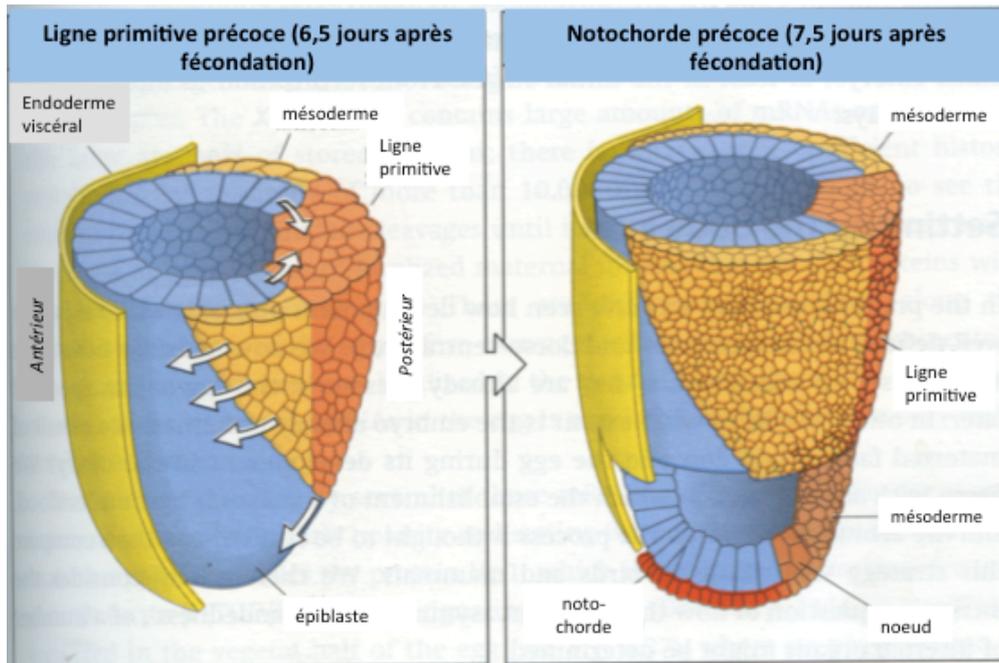
À E6, la structure cylindrique contenant à la fois l'épiblaste et les tissus extraembryonnaires dérivant du trophoctoderme polaire est appelé ovocylindre, comme illustré sur la **Figure 13** (Wolpert *et al.*, 2007).

4.3 La gastrulation

Les premiers signes marquant le début de la gastrulation sont visibles à E6,5 avec l'apparition de la ligne primitive dans la région postérieure de l'embryon (**Figure 13**). Cette ligne est initiée par un épaissement localisé de l'épiblaste ; c'est le futur pôle postérieur de l'embryon. En 12 à 24 heures, cette ligne a atteint la base de la tasse que forme l'épiblaste. Une condensation de cellules, le nœud, devient discernable à l'extrémité antérieure de la ligne primitive. Les cellules épiblastiques convergent vers la ligne primitive. Ces cellules en prolifération migrent via la ligne primitive pour se répandre latéralement et antérieurement entre l'ectoderme et l'endoderme viscéral, pour former un feuillet mésodermique (**Figure 14**) (Wolpert *et al.*, 2007).

À E7, certaines cellules dérivées de l'épiblaste traversent le mésoderme et entrent dans l'endoderme viscéral. Elles remplacent progressivement ce dernier pour former l'endoderme embryonnaire définitif à l'extérieur du cylindre et qui constituera la partie ventrale de l'embryon (Wolpert *et al.*, 2007).

Figure 14 : Gastrulation chez l'embryon de Souris



(reproduit d'après Wolpert et al., 2007)

Chez la Souris, la gastrulation commence avec l'apparition de la ligne primitive dans la partie postérieure de l'embryon. Cette ligne résulte de la convergence de cellules épiblastiques, ce qui crée un épaissement local. Les cellules épiblastiques constituant la ligne primitive sont internalisées. Certaines cellules migrent via la ligne primitive, pour se disperser latéralement et antérieurement, formant ainsi un nouveau feuillet : le mésoderme.

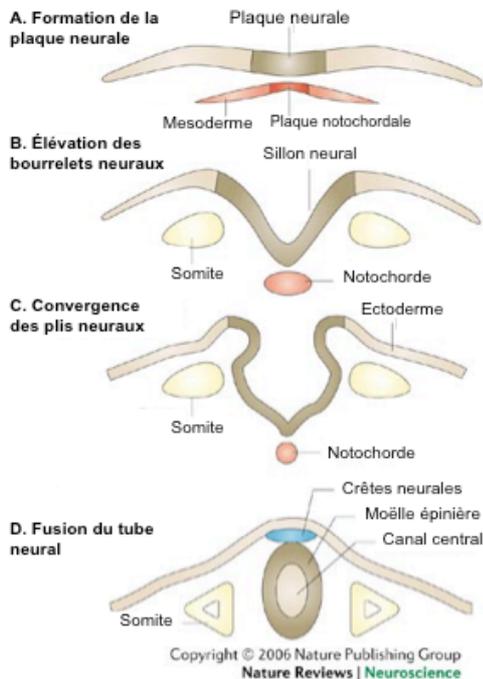
Les cellules migrant antérieurement par rapport au noeud forment la notochorde, tandis que les cellules mésodermiques de la région environnante migrent antérieurement pour former les somites. La prolifération cellulaire se poursuit tout au long de la gastrulation et la région de l'embryon située antérieurement par rapport au noeud croît rapidement en taille. Le noeud constitue finalement un centre de cellules souches qui donnera naissance à la queue (Wolpert *et al.*, 2007).

4.4 La neurulation et l'organogenèse

La formation des somites et l'organogenèse commencent dans la partie antérieure de l'embryon et se propage postérieurement. Vers E8.5, la plaque neurale commence à se former au pôle antérieur de la partie dorsale de l'embryon et la tête apparaît. La plaque neurale peut contenir jusqu'à 50% de l'ectoderme (Gilbert, 1996). Les bords de la plaque neurale s'épaississent et s'élèvent pour former les plis neuraux, tandis qu'une gouttière neurale en forme de U apparaît dans le centre de la plaque (Gilbert, 1996). Les plis neuraux migrent vers la ligne médiane de l'embryon, fusionnant finalement pour former le tube neural, sous l'ectoderme qui le recouvre. Les cellules de la partie la plus dorsale du tube neural deviennent les cellules de la crête neurale (Gilbert, 1996). Les cellules de la crête neurale crânienne, qui formeront des structures de la face et du cou, migrent pendant que les plis neuraux se surélèvent, donc avant la fermeture du tube neural. Dans la région de la moelle épinière,

les cellules de la crête neurale migrent après la fermeture du tube neural. Les différentes étapes de la neurulation chez la Souris sont illustrées sur la **Figure 15**.

Figure 15 : Neurulation chez l'embryon de Souris



A. À E8,5 certaines cellules de l'épiderme dorsal deviennent cylindriques et forment la plaque neurale (neural plate en anglais). On pense que cette transformation se fait par induction mésodermique.

B. Progressivement, la plaque neurale se creuse et s'incurve pour former le sillon neural. Cette incurvation est due à la modification progressive de la morphologie des cellules de la plaque neurale. La notochorde est constituée et les somites apparaissent.

C. L'ectoderme exerce une pression vers la ligne médiane, ce qui accroît les contraintes exercées sur les cellules neurales. Les plis neuraux, qui correspondent aux bords supérieurs du sillon neural, commencent à se rapprocher.

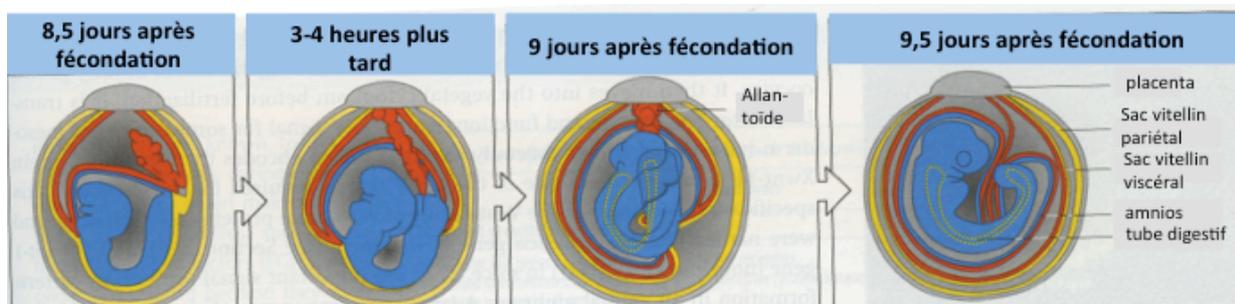
D. À terme, ce phénomène a pour conséquence la fusion des plis neuraux et la fermeture du tube neural. La notochorde induira plus tard la ventralisation de la partie du tube neural située juste au-dessus d'elle. La fermeture du tube neural définit une nouvelle cavité, le canal central, qui est rempli de liquide. Les cellules localisées à l'endroit précis de la jonction des plis neuraux constituent la crête neurale, qui sera à l'origine de lignées cellulaires très diverses : mélanocytes, os de la face, cellules nerveuses...

(reproduit d'après Blom et al., 2006)

L'endoderme s'internalise et forme le tube digestif. Les surfaces ventrales se replient pour internaliser complètement ce qui deviendra le tube digestif. Le cœur et le foie se placent dans leur position définitive et la tête devient reconnaissable (Gilbert, 1996).

La neurulation est initiée alors que la gastrulation se poursuit ; ainsi, la neurulation est achevée en région crâniale, tandis que la région caudale achève la gastrulation. La gastrulation et la neurulation sont achevées vers E9. Un processus de retournement complexe survient également à ce stade, au cours duquel l'embryon se retrouve replié sur sa partie ventrale alors qu'il était auparavant replié sur sa partie dorsale (**Figure 16**) (Gilbert, 1996).

Figure 16 : Retournement de l'embryon de Souris



Jusqu'à E9, l'embryon est incurvé sur sa partie dorsale. Un processus de retournement complexe survient entre E8,5 et E9,5 à l'issue duquel l'embryon se retrouve replié sur sa partie ventrale. (reproduit d'après Wolpert et al., 2007)

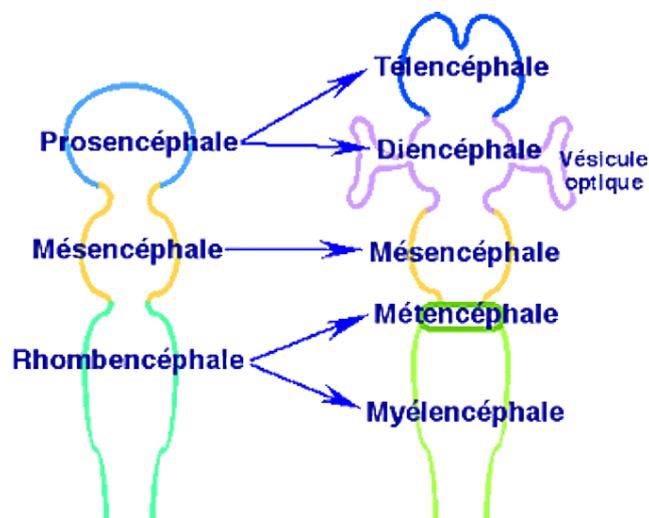
4.5 Mise en place du système nerveux

En région crâniale, la paroi du tube neural est large, épaisse et présente une série de renflements et de constriction qui définissent les compartiments de l'encéphale primitif. En arrière de la région céphalique, le tube neural reste un simple tube dont le diamètre décroît progressivement jusqu'à la queue. Les deux extrémités ouvertes du tube neural sont appelées le neuropore antérieur et le neuropore postérieur. Chez les Mammifères, le tube neural commence à se fermer simultanément à différents endroits de l'axe antéro-postérieur (Gilbert, 1996).

Une fois le tube neural entièrement fermé, les parois et la lumière se renflent et se resserrent pour former les vésicules cérébrales et la moelle épinière (Gilbert, 1996).

Avant que le tube neural ne soit complètement fermé, à partir de E9,5, sa partie crâniale se subdivise en trois vésicules primaires : l'encéphale antérieur ou prosencéphale, l'encéphale moyen ou mésencéphale et l'encéphale postérieur ou rhombencéphale (**Figure 17**). À la fin de la neurulation, le prosencéphale se divise en télencéphale antérieurement et diencéphale postérieurement, et le rhombencéphale se divise en métencéphale antérieurement et en myélencéphale postérieurement. Ces cinq vésicules secondaires sont à l'origine des différentes structures de l'encéphale, dont le détail est listé dans le **Tableau 4**.

Figure 17 : Divisions de l'encéphale primitif



(reproduit d'après SNV Jussieu, 2014)

L'encéphale primitif est d'abord divisé en trois vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale, du plus crânial au plus caudal. Ultérieurement, le prosencéphale se subdivise en télencéphale et en diencéphale, et le rhombencéphale en métencéphale et en myélencéphale.

Tableau 4 : Dérivés des vésicules cérébrales primaires

Vésicule cérébrale	Structures dérivées	Fonction
Télencéphale	Lobes olfactifs	Odorat
	Hippocampe Noyaux gris de la base	Mémoire, émotions, apprentissage
	Hémisphères cérébraux	Intégration des afférences, contrôle de la motricité, réflexion...
Diencephale	Rétine	Vision
	Epiphyse	Contrôle du cycle nyctéméral et de certains cycles infradiens (œstrus, hibernation...) via la sécrétion de mélatonine
	Thalamus	Centre de relais pour toutes les afférences sensorielles sauf l'olfaction
	Hypothalamus Neurohypophyse	Régulation de la thermogenèse, de la prise alimentaire et de boisson, de l'activité sexuelle...
Mésencéphale	Tectum, tegmentum, corps cétebraux	Intégration visuelle et auditive
Métencéphale	Cervelet	Coordination des mouvements, équilibre
	Pont	Rôles importants dans la motricité, la sensibilité du visage et les fonctions végétatives
Myélelncéphale	Bulbe	Centres de régulation pour de nombreuses fonctions végétatives (digestion, respiration, circulation...)

(d'après Gilbert, 1996)

Le rhombocéphale se divise en segments appelés rhombomères, qui constituent des territoires séparés et qui ont chacun une destinée différente au cours du développement (Gilbert, 1996).

Nous ne nous attarderons pas plus sur l'organisation et le développement de l'encéphale, notre étude étant centrée sur le SNP.

4.6 Formation des somites

Au moment où la ligne primitive régresse et où les plis neuraux commencent à se rapprocher au niveau de la ligne médiane de l'embryon, le mésoderme paraxial se divise en plusieurs masses de cellules appelées somites (Gilbert, 1996). Les somites sont des structures transitoires à l'origine du squelette axial et des muscles du tronc. Ils déterminent les voies de migration des cellules de la crête neurale et des axones des nerfs spinaux. Plus précisément, ils donnent naissance aux vertèbres et aux côtes, au derme de la peau dorsale, aux muscles striés squelettiques du dos et des membres ainsi qu'à la musculature pariétale (Gilbert, 1996).

La formation des somites est initiée dans la partie antérieure de l'embryon et se propage postérieurement. Le nombre total de somites est spécifique de l'espèce (Gilbert, 1996).

Un somite est constitué d'une masse sphérique de cellules épithéliales cylindriques entourant une petite cavité remplie de cellules lâchement connectées. Ces cellules épithéliales sont peu à peu reliées par des jonctions serrées (Gilbert, 1996).

Les cellules des somites nouvellement formés sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'engendrer toutes les lignées cellulaires issues des somites. La détermination des différentes lignées cellulaires se fait au cours de la maturation du somite. Peu à peu, le somite se divise en sclérotome, myotome et dermatome : les cellules se différencient et migrent dans cet ordre. Le sclérotome correspond à la région ventrale médiale du somite. Il est constitué de cellules mésenchymateuses qui sont à l'origine des vertèbres. Les cellules de la partie latérale du somite se dispersent ensuite ; elles sont à l'origine des cellules musculaires des muscles squelettiques de la paroi abdominale et des membres. Les cellules somitiques les plus proches du tube neural migrent ensuite ventralement pour former un épithélium compact de deux assises cellulaires appelé le dermomyotome. L'assise dorsale de cette structure constitue le dermatome, à l'origine du derme de la peau dorsale et l'assise ventrale constitue le myotome, à l'origine des cellules musculaires des muscles axiaux (Gilbert, 1996).

La notochorde dégénère. La seule trace de cette formation réside dans les disques intervertébraux, dans laquelle elle constitue le noyau pulpeux.

4.7 *Développement des membres*

Les bourgeons des membres antérieurs apparaissent à E9,5. Le bourgeon précoce est constitué de deux composants majeurs : un noyau de cellules mésenchymateuses lâchement connectées dérivant du mésoderme latéral et une couche externe de cellules épithéliales d'origine ectodermique. Le squelette et le tissu conjonctif du membre se développent à partir du noyau mésenchymateux tandis que les cellules musculaires striées squelettiques proviennent des somites (Wolpert *et al.*, 2007).

L'extrémité du bourgeon de membre est appelée la crête ectodermique apicale (Wolpert *et al.*, 2007). Le membre croît selon un axe proximo-distal. Immédiatement sous la crête ectodermique apicale se situe une région appelée la zone de progression, qui est composée de cellules mésenchymateuses indifférenciées en prolifération rapide. Au fur et à mesure que le bourgeon de membre croît, les cellules de la zone de progression commencent à se différencier et les structures cartilagineuses émergent du mésenchyme. La partie proximale du membre est la première à se différencier et la vague de différenciation se propage distalement. Le cartilage, les tendons et les muscles se mettent simultanément en place. Plus tard, le cartilage sera remplacé par de l'os. Il ne subsistera que quelques foyers de croissance cartilagineuse, permettant aux os de croître jusqu'à l'âge adulte. Les nerfs ne pénètrent dans le muscle qu'une fois que le cartilage a été remplacé par de l'os. Les membres postérieurs se mettent en place de la même manière, à partir de E10 (Wolpert *et al.*, 2007).

4.8 *La crête neurale et ses dérivés*

Les cellules de la crête neurale sont issues de la partie la plus dorsale du tube neural et sont à l'origine d'un très grand nombre de lignées cellulaires : neurones et cellules gliales des systèmes nerveux sensoriels, orthosympathique et parasymphathique, cellules chromaffines de la médullo-surrénale, mélanocytes, mais aussi cellules osseuses, cartilagineuses et dermiques de la face. Le destin des cellules de la crête neurale est majoritairement lié à leur position selon l'axe antéro-postérieur (Gilbert, 1996 ; Wolpert *et al.*, 2007). La destinée des cellules de la crête neurale selon leur position le long de l'axe antéro-postérieur est indiqué dans le **Tableau 5**. Certaines cellules isolées de la crête neurale ont montré une capacité à donner naissance à des cellules très diverses, comme des neurones, des cellules gliales et des cellules musculaires lisses. Une seule cellule de la crête neurale peut à elle seule engendrer ces trois lignées extrêmement différentes ! Cependant, leur multipotence décroît au fur et à mesure qu'elles migrent (Wolpert *et al.*, 2007).

Tableau 5 : Dérivés des cellules de la crête neurale

Région de la crête neurale	Structure dérivée	Tissus finaux
Crête neurale céphalique	Mésenchyme crâniofacial	Cartilage, os, cellules gliales et tissus conjonctifs de la face. Neurones des nerfs crâniens.
	Colonisation des arcs pharyngiens	Cellules thymiques, odontoblastes de l'ébauche dentaire, cartilage de l'oreille interne et de la mâchoire.
Crête neurale du tronc	Cellules de la crête neurale ayant migré dorso-latéralement dans l'ectoderme vers la ligne médio-ventrale du tronc	Mélanocytes
	Cellules de la crête neurale ayant migré latéro-ventralement.	Neurones des nerfs segmentaires spinaux Neurones orthosympathiques Cellules chromaffines de la médullo-surrénale Agrégat de nerfs entourant l'aorte
Crête neurale vagale et de la région lombo-sacrée		Ganglions parasymphatiques entériques
Crête neurale cardiaque		Tissus musculaires et conjonctifs de la paroi des grandes artères Contribution à la formation du septum entre aorte et artère pulmonaire

(d'après Gilbert, 1996)

4.8.1 Dérivés de la crête neurale du tronc

Les cellules de la crête neurale du tronc se divisent en deux groupes de cellules : celles qui migrent dorso-latéralement dans l'ectoderme et qui sont à l'origine des mélanocytes, et celles qui migrent latéro-ventralement (**Tableau 5**). Ces dernières forment des neurones sensitifs spinaux, neurones orthosympathiques, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale et des cellules de Schwann (Gilbert, 1996).

4.8.2 Dérivés de la crête neurale cardiaque

Les cellules de la crête neurale cardiaque participent à la formation de l'endothélium des artères de l'arc aortique, au septum séparant la circulation générale de la circulation pulmonaire, situé entre l'aorte et l'artère pulmonaire. Ces cellules présentent la particularité d'être déterminées assez précocément et l'ablation de la crête neurale cardiaque induit des anomalies cardiaques graves (Gilbert, 1996).

5 Développement synchronisé des nerfs et des artères périphériques

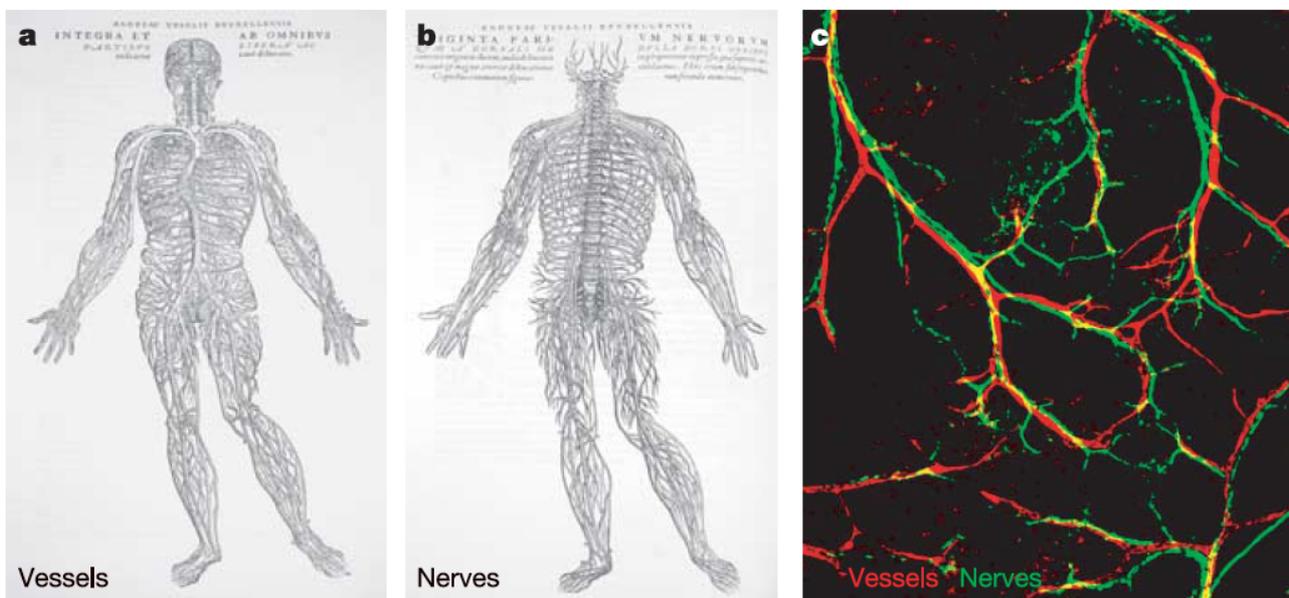
Pour cette partie, je ne m'intéresserai qu'aux nerfs et aux artères sur lesquels porte la partie expérimentale, à savoir les artères de résistance des tissus périphériques et les nerfs orthosympathiques qui les innervent.

Il y a cinq siècles, l'anatomiste et médecin humaniste bruxellois Vésale avait mis en évidence le fait que les nerfs et les artères suivaient des réseaux parallèles, comme le montrent les deux planches qu'il a réalisées (**Figure 18**). Ce parallélisme entre les réseaux nerveux et artériel périphériques a été plus récemment confirmé. L'exemple d'une immunofluorescence réalisée par une équipe japonaise est reproduite en **Figure 18** (Mukouyama *et al.*, 2002).

De cette constatation est née l'hypothèse que ce parallélisme quasi parfait entre nerfs et artères n'était pas dû au hasard, mais serait au contraire le résultat de mécanismes de guidage partagés (Carmeliet, Tessier-Lavigne, 2005 ; James et Mukouyama, 2011 ; Mukouyama *et al.*, 2002).

L'ablation du SNP des membres par irradiation aux rayons ultra-violets chez l'embryon de Poulet n'induit aucune perturbation sur la trajectoire des gros vaisseaux (Martin, Lewis, 1989). Bien que parallèles aux nerfs de gros calibres, les gros vaisseaux semblent donc se mettre en place indépendamment.

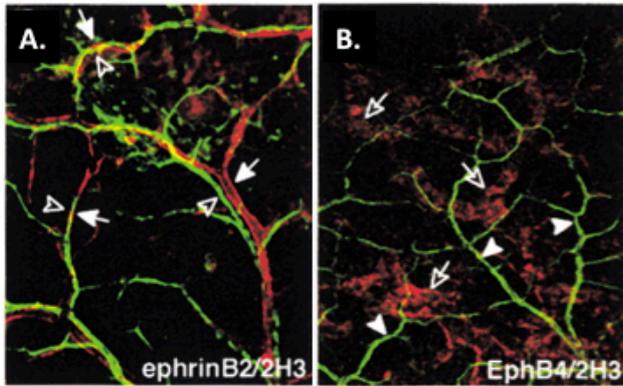
Figure 18 : Parallélisme observé entre les réseaux nerveux et artériel périphériques



a et b : il y a cinq siècles, l'anatomiste Vésale avait mis en évidence le parallélisme entre les nerfs et les artères périphériques. Ces deux images sont la reproduction des places réalisés par Vésale lui-même, avec le réseau vasculaire à gauche et le réseau nerveux à droite. Vésale a réalisé ces planches d'après ses dissections de cadavres humains (*reproduit d'après Carmeliet, Tessier-Lavigne, 2005*). **c** : ce parallélisme a été confirmé plus récemment par une équipe japonaise. Sur cette immunofluorescence d'un embryon de Souris au stade E15,5, les artères sont marquées en rouge et les nerfs en vert (*reproduit d'après Mukouyama et al., 2002*)

En ce qui concerne les artères périphériques, de calibre plus réduit, Mukouyama et son équipe ont montré chez l'embryon de Souris que les artères sont préférentiellement alignées avec les nerfs, en suivant leur motif de branchement, à la différence des veines (**Figure 19**) (Mukouyama *et al.*, 2002).

Figure 19 : Les artères et non les veines sont préférentiellement alignées avec les nerfs

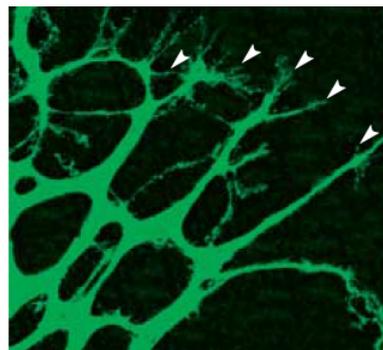


A. Sur cette immunofluorescence les nerfs sont marqués en vert (grâce à un marquage anti-2H3) et les artères en rouge, grâce à un marquage anti-éphrine-B2, qui est un marqueur caractéristique des artères. **B.** Sur cette immunofluorescence, les nerfs sont marqués en vert (grâce à un marquage anti-2H3) et les veines en rouge, grâce à un marquage anti-ÉphB4, qui est un marqueur caractéristique des veines. La comparaison montre que les artères ont tendance à suivre le trajet des nerfs, tandis que le réseau veineux semble s'établir de manière totalement indépendante.

(reproduit d'après Mukouyama *et al.*, 2002)

La mise en place du réseau vasculaire se fait par deux processus consécutifs : la vasculogenèse, suivie de l'angiogenèse (Eichmann, Pardanaud, 2009). La vasculogenèse désigne la mise en place d'un labyrinthe vasculaire primitif constitué de vaisseaux de taille sensiblement similaire (**Figure 20**). Ce labyrinthe se forme à partir de l'assemblage de cellules endothéliales localement prolifératives (Carmeliet, 2003). Ces cellules endothéliales se sont différenciées à partir de précurseurs endothéliaux, appelés angioblastes, issus du mésoderme (Eichmann et Pardanaud, 2009). La lumière vasculaire se forme par fusion des vacuoles des cellules endothéliales (Kamei *et al.*, 2006).

Figure 20 : Labyrinthe vasculaire primitif



(reproduit d'après Carmeliet, 2003)

Labyrinthe vasculaire primitif constitué de vaisseaux de taille similaire dans la rétine d'une souris à P0. Les cellules vasculaires sont marquées en vert. Les têtes de flèche pointent les cellules endothéliales (CE) qui mènent le front de croissance des vaisseaux. Ces cellules situées à l'extrémité du vaisseau en croissance et possédant de nombreux filopodes sont appelées « tip cells ».

Durant l'angiogenèse, les vaisseaux bourgeonnent à partir des branches collatérales pour coloniser les territoires encore avasculaires de l'embryon. Ce bourgeonnement se fait par délamination et migration des cellules endothéliales (Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005).

Plus tard, les vaisseaux subissent un remodelage au cours duquel une grande partie des petits vaisseaux initiaux coalescent ou se développent ou encore se rétractent. Ceci a pour conséquence l'émergence d'un réseau vasculaire mature, constitué de vaisseaux plus larges se ramifiant en branches plus petites (Carmeliet, 2003).

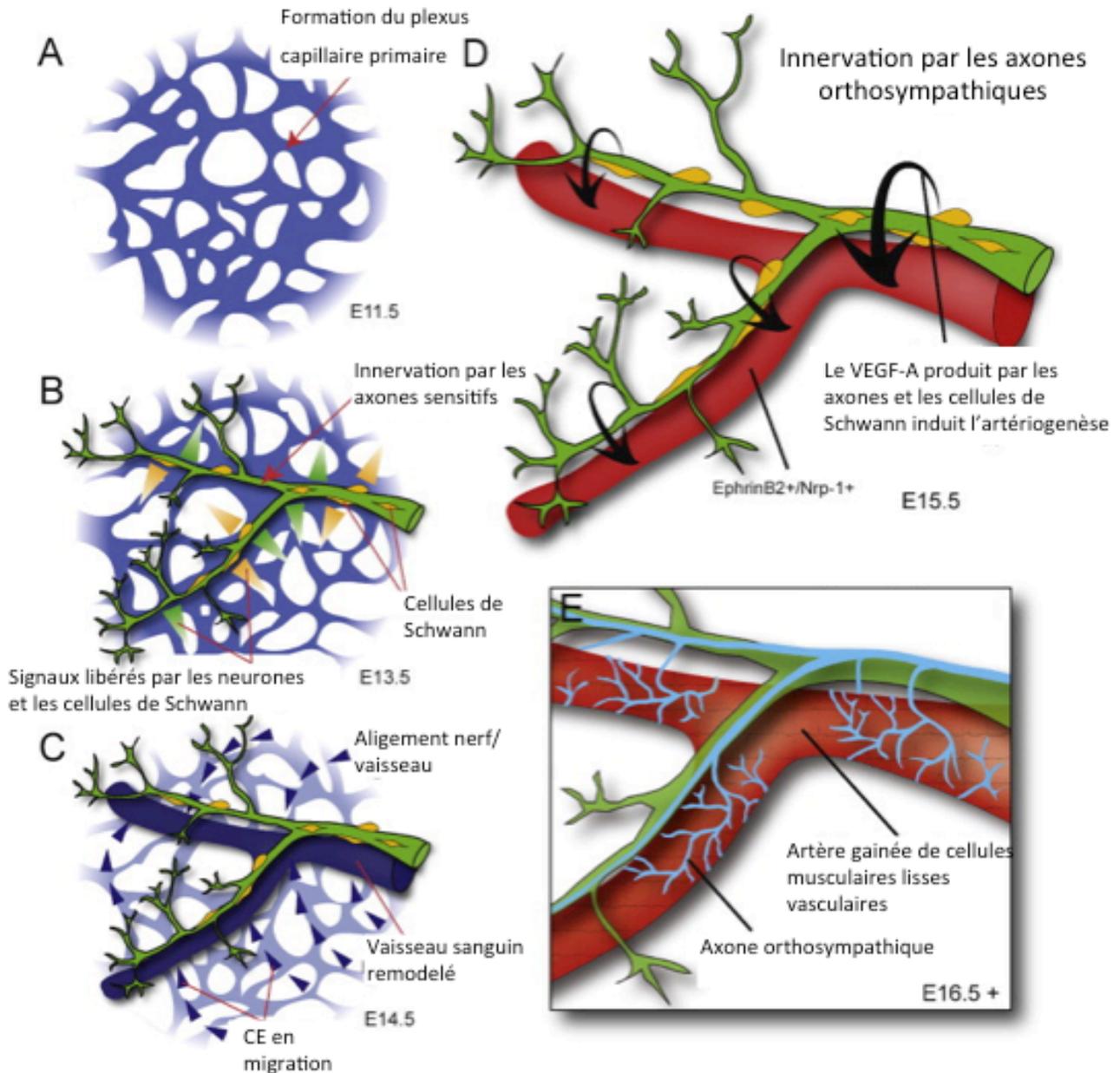
Chez la Souris, les neurones sensitifs et les motoneurones, associés à des cellules de Schwann, envahissent le membre embryonnaire vers E13,5, après la vasculogenèse (James et Mukoyama, 2011). Ces neurones sont appelés neurones pionniers.

Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont des cellules gliales périphériques issues de la crête neurale. Elles sont indispensables à la survie des neuroblastes (cellules précurseurs des neurones) et des neurones sensitifs et des motoneurones, ainsi qu'à la neuritogenèse (mise en place de neurites, c'est-à-dire de dendrites ou d'un axone par un neurone). En effet, elles sécrètent des facteurs neurotrophiques. Elles sont également responsables de la myélinisation des neurones myélinisés périphériques (neurones sensitifs et motoneurones) ; les cellules de Schwann s'enroulent autour d'un axone environ 200 fois pour constituer la gaine de myéline (Bartolami, 2014).

Les neurones pionniers et les cellules de Schwann qui leur sont associées envoient des signaux qui induisent le remodelage partiel du plexus vasculaire primaire. Les neurones pionniers et les cellules de Schwann sécrètent ensuite du Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A), qui induit l'artériogenèse des vaisseaux s'étant alignés avec eux. Plus tard, les nerfs orthosympathiques envahissent à leur tour le membre, en suivant le réseau préétabli par les neurones pionniers et les artères (James et Mukoyama, 2011). Cette chronologie est détaillée dans la **Figure 21**. À l'inverse des vaisseaux de gros calibre, les artères de petit calibre se mettent donc en place en suivant le réseau nerveux.

Figure 21 : Mise en place des plexus nerveux sensitif et orthosympathique périphériques



(d'après James et Mukoyama, 2011)

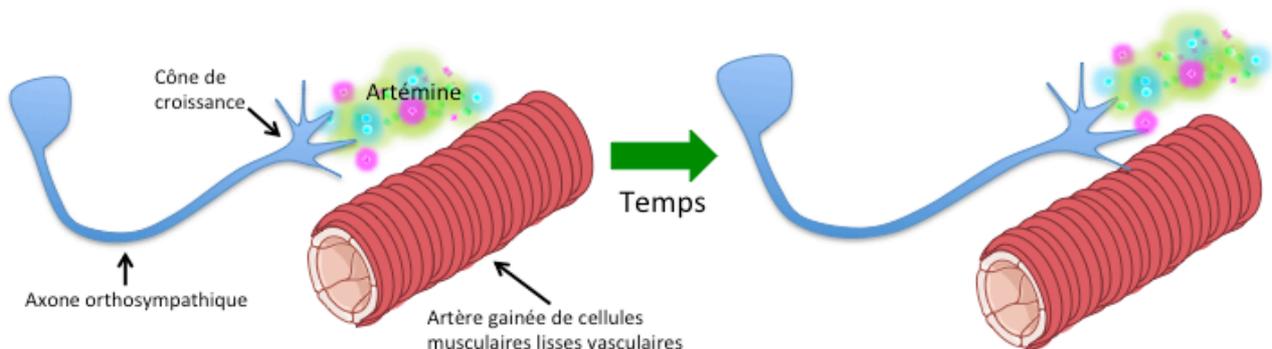
A) Les cellules endothéliales différenciées à partir des angioblastes constituent un réseau capillaire primaire vers E11,5, avant que les nerfs périphériques n'aient envahi le membre. **B)** Les axones sensitifs, associés à des cellules de Schwann, innervent le membre vers E13,5 et envoient des signaux pour remodeler le plexus vasculaire primaire. **C)** En réponse aux signaux émis par les nerfs et les cellules de Schwann, les cellules endothéliales migrent et commencent à s'aligner avec les nerfs périphériques. CE : cellules endothéliales **D)** Les nerfs et les cellules de Schwann sécrètent du VEGF-A, ce qui induit l'artériogénèse des vaisseaux alignés avec les nerfs périphériques. Les vaisseaux commencent alors à exprimer des marqueurs artériels (Éphrine-B2, Neuropiline-1). **E)** Une fois que l'artériogénèse induite par les nerfs sensitifs est achevée, les neurones orthosympathiques innervent le membre à leur tour, utilisant les nerfs sensitifs et les artères comme canevas pour atteindre leurs cibles.

6 Développement des nerfs orthosympathiques innervant les artères

Les neurones orthosympathiques étendent leur axone pour atteindre leurs cibles, qui sont les cellules musculaires lisses des viscères et de la paroi des artères, mais aussi des cellules cardiaques et des cellules glandulaires notamment (Glebova et Ginty, 2004). Dans le cœur, les axones orthosympathiques proviennent du ganglion stellaire, progressent le long des veines coronaires situées à la surface de l'épicaarde et innervent finalement la couche sub-épicaarde du ventricule (Nam *et al.*, 2013). Le Nerve Growth Factor (NGF) est nécessaire à la croissance, à la survie et l'innervation de la cible finale des neurones orthosympathiques (Eichmann et Brunet, 2014).

Dans la plupart des autres tissus, les axones orthosympathiques suivent la vascularisation artérielle pour atteindre et innervent leurs cibles. Le processus est dirigé par différents facteurs sécrétés par les cellules musculaires lisses artérielles : le Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), la Neurotrophine-3 (NT-3) et l'Endothéline-3 (ET-3), qui favorisent l'extension des axones le long des artères (Eichmann et Brunet, 2014). L'Artémine (Art) est exprimée par les cellules musculaires lisses des artères du tronc de l'embryon et, selon un phénomène encore inconnu, son expression progresse distalement dans les artères au fur et à mesure que les axones orthosympathiques s'étendent le long de ces artères (**Figure 22**) (Eichmann et Brunet, 2014).

Figure 22 : L'Artémine est une molécule de guidage des axones orthosympathiques le long des artères



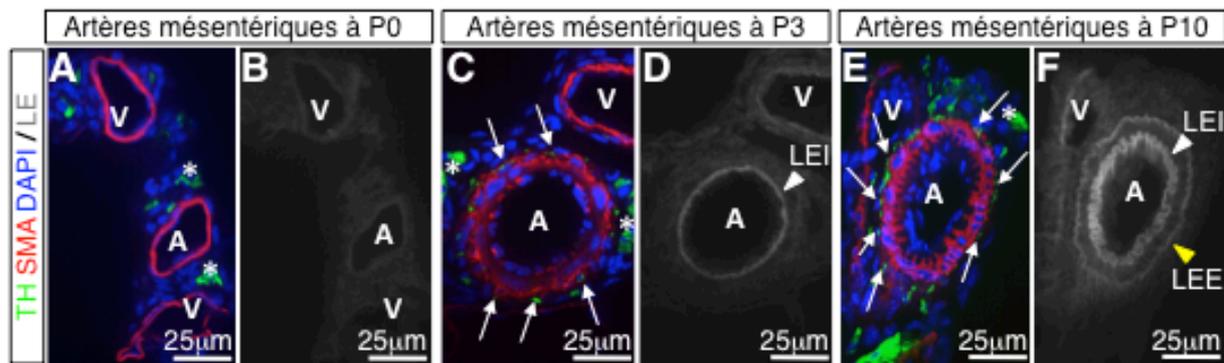
L'expression d'Art par les cellules lisses artérielles progresse de façon proximo-distale le long de celles-ci au fur et à mesure que les axones orthosympathiques s'étendent. (*illustration personnelle*)

6.1 Rôle de la Nétrine-1 dans la mise en place de l'innervation artérielle

Nous avons vu précédemment que les cellules musculaires lisses vasculaires constituent elles-mêmes des cibles pour les nerfs orthosympathiques. Comment l'innervation artérielle se met-elle en place harmonieusement, sans que des nerfs orthosympathiques s'arrêtent prématurément pour innover une artère au lieu de poursuivre leur route le long de celle-ci ? Grâce au fait que ces deux processus sont découplés dans le temps. Les axones orthosympathiques s'étendent complètement le

long des artères et ils ont colonisé l'ensemble des tissus périphériques à la naissance (P0). Ce n'est qu'au jour postnatal 2 (P2) que les premières fibres orthosympathiques commencent à quitter le faisceau nerveux pour aller au contact de l'artère (Brunet *et al.*, 2014). C'est également à ce moment que les artères acquièrent leur limitante élastique interne et une seconde couche de cellules musculaires lisses (**Figure 23**) (Eichmann et Brunet, 2014).

Figure 23 : La maturation des artères a lieu de manière concomitante avec l'innervation par les nerfs orthosympathiques



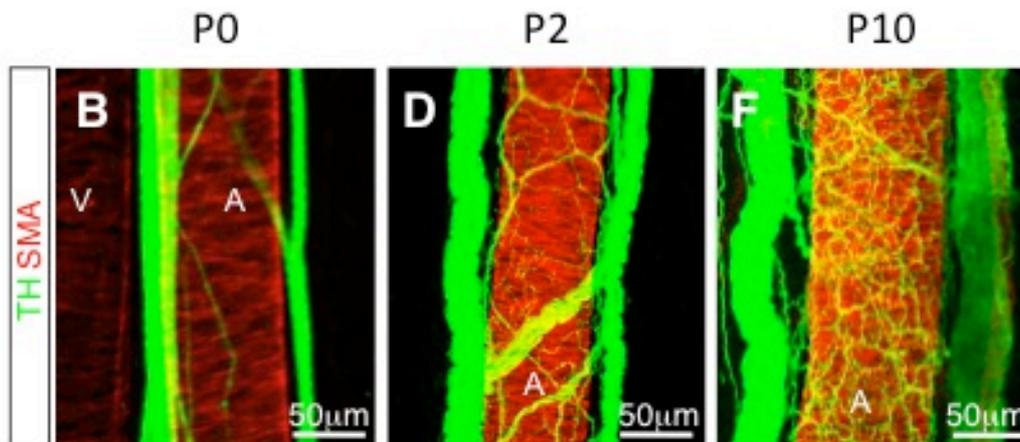
(reproduit d'après Brunet *et al.*, 2014)

Coupes d'artères mésentériques réalisées aux cryostat, marquées à l'aide d'anticorps anti-TH et anti-SMA et au DAPI (A, C, E) ou avec un marquage anti-élastine (B, D, E). Le marquage anti-élastine montre la maturation artérielle, avec une lame élastique interne (LEI, flèches blanches) présente à P3 (D) et P10 (F) mais pas à P0 (B) et une lame élastique externe (LEE, têtes de flèches jaunes) apparaissant à P10 (F). Le marquage anti-SMA montre une couche de cellules musculaires lisses vasculaires à P0 (A), deux couches à P3 et à P10 (C et E). Les fibres orthosympathiques marquées par le marquage anti-TH commencent à contacter les artères à P3 (C, flèches) et leur densité augmente jusqu'à P10 (E, flèches).

L'innervation artérielle se densifie progressivement entre P2 et P10, stade auquel elle atteint une densité similaire à celle observée chez l'adulte. Le 10^e jour postnatal correspond également au stade où les artères acquièrent leur limitante élastique externe (Eichmann et Brunet, 2014). La chronologie de l'innervation des artères de résistance par les nerfs orthosympathiques est illustrée en **Figure 24**.

Ainsi, la maturation de l'artère est contemporaine du début de son innervation et s'achève lorsque l'innervation orthosympathique a atteint sa densité finale.

Figure 24 : L'innervation orthosympathique des artères se met en place progressivement à partir du 2^e jour postnatal



(reproduit d'après Brunet et al., 2014)

Immunofluorescences réalisées sur artères mésentériques de Souris. Les artères sont marquées en rouge grâce à un marquage anti-SMA (actine des cellules musculaires lisses) et les nerfs en vert grâce à un marquage anti-TH (enzyme de la synthèse des catécholamines). À P0, des faisceaux nerveux orthosympathiques sont visibles le long des artères de résistance, mais aucun axone n'a quitté le faisceau. À P2, les premiers axones orthosympathiques quittent le faisceau pour aller au contact de l'artère. À P10, le niveau d'innervation artériel est similaire à celui observé chez un adulte.

Le début de l'innervation orthosympathique des artères est initié par la libération de Nétrine-1 par les artères à P2. La Nétrine-1 est une molécule diffusible, qui interagit avec le récepteur DCC (Deleted in Colorectal Cancer), exprimé par les neurones orthosympathiques (Brunet *et al.*, 2014). Il est important de noter que la Nétrine-1 est exprimée uniquement par les artères de résistance et qu'elle n'est pas exprimée par les artères de gros et moyen calibre (Brunet *et al.*, 2014). Ce phénomène est sans doute à mettre en relation avec le faible taux d'innervation orthosympathique de ces artères.

6.2 Rôle de l'Éphrine-A4 dans la mise en place de l'innervation artérielle

L'Éphrine-A4 est une molécule de guidage responsable, selon les tissus, de la répulsion ou de l'attraction des axones (Klein et Kania, 2014). Les Éphrines sont des molécules membranaires ou transmembranaires qui interagissent avec les récepteurs Eph. Les récepteurs Eph sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (Klein et Kania, 2014).

Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des récepteurs transmembranaires à des facteurs de croissance possédant une activité enzymatique. La fixation de leur ligand entraîne leur dimérisation, ce qui induit une autophosphorylation croisée sur les résidus tyrosine de chaque monomère du côté intracellulaire, en consommant une molécule d'ATP par monomère phosphorylé. Cette phosphorylation a pour rôle d'activer le récepteur en libérant des sites à haute affinité pour des protéines de signalisation (Baltimore *et al.*, 2000).

Après la dimérisation, une protéine kinase se fixe au récepteur tyrosine kinase. Cette protéine kinase, une fois activée, active à son tour une cascade de kinases et déclenche les effets cellulaires propres au ligand (Baltimore *et al.*, 2000).

Il existe deux familles d'Éphrines : les Éphrines transmembranaire *sensu stricto*, ce sont les Éphrines-B ; et les Éphrines liées à la membrane par un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI), ce sont les Éphrines-A (Klein et Kania, 2014). Il existe également deux classes de récepteurs Eph, les récepteurs EphA, auxquels se lient préférentiellement les Éphrines-A, et les récepteur EphB, auxquels se lient préférentiellement les Éphrines-B. Cependant, des réactions croisées sont possibles (Klein et Kania, 2014). La signalisation liées au Éphrines peut se faire de la cellule portant le ligand à la cellule portant le récepteur (signalisation *forward*) ou dans le sens contraire, de la cellule portant le récepteur à la cellules portant le ligand (signalisation *reverse*).

L'Éphrine-A4 est exprimée par les artères à P2 et le récepteur EphA4 par les neurones orthosympathiques (Brunet *et al.*, article en préparation). La liaison de l'Éphrine-A4 au récepteur EphA4 induit la régression du cône de croissance (Brunet *et al.*, article en préparation). L'équilibre entre l'effet attractif de la Nétrine-1 et l'effet répulsif de l'Éphrine-A4 permettrait ainsi d'obtenir un niveau d'innervation artérielle correcte : la Nétrine-1 attirant les fibres orthosympathiques vers leur cible et l'Éphrine-A4 permettant d'éviter une innervation massive et inappropriée, aux conséquences préjudiciables.

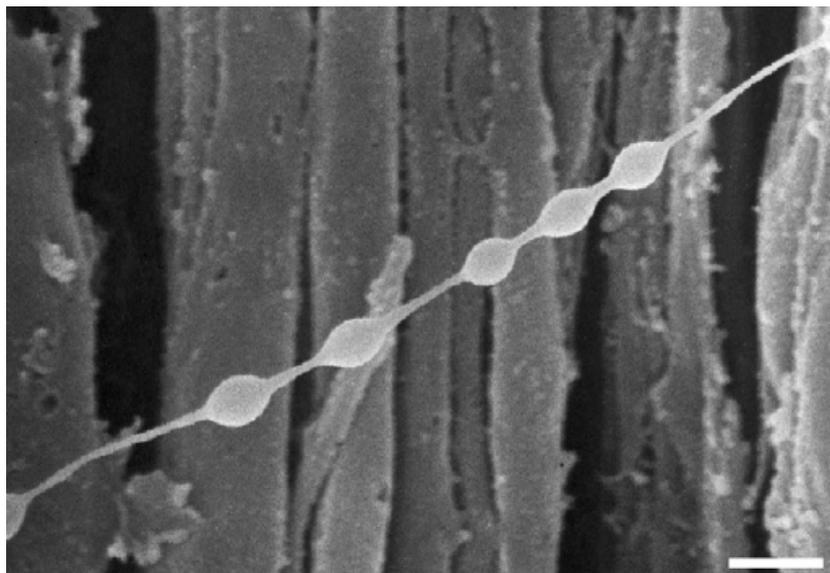
7 Les jonctions neurovasculaires (JNV)

Les nerfs orthosympathiques interagissent de façon fonctionnelle avec les cellules musculaires lisses vasculaires au niveau de synapses particulières : les jonctions neurovasculaires (JNV).

Ces synapses sont appelées « jonctions » car elles ne sont pas établies entre deux neurones, mais entre un neurone et une cellule musculaire lisse vasculaire, ce qui entraîne des différences physiologiques par rapport à une synapse classique.

Ces jonctions sont encore très mal connues. La seule description que nous en possédons a été donnée par Geoffrey Burnstock, en 2008 (Burnstock, 2008). D'après G. Burnstock, ces synapses sont des synapses « en passant », c'est-à-dire sans spécialisation postsynaptique, et le neurone orthosympathique, au lieu de former un bouton synaptique ou tout autre type de terminaison synaptique spécialisée dans la libération de neurotransmetteur, développerait plutôt des sortes de petits renflements le long de son axone, appelée varicosités (**Figure 25**) (Burnstock, 2008).

Figure 25 : Vue en microscopie électronique à balayage d'un axone orthosympathique innervant des cellules musculaires lisses (intestin grêle de Rat)



(reproduit d'après Burnstock, 2008)

L'intestin a été prétraité pour éliminer tous les composants conjonctifs. Les petits renflements blancs sont des varicosités, qui correspondent aux points de communication fonctionnelle entre le nerf orthosympathique et les cellules musculaires lisses. Le nerf libère son neurotransmetteur via ces varicosités, qui sont des synapses dites « en passant » parce que ne possédant pas de spécialisation postsynaptique. Barre d'échelle = 3 μ m.

Selon G. Burnstock, les JNV seraient transitoires, les varicosités étant continuellement en mouvement, ce qui implique l'élimination et la formation de JNV en permanence. Elles seraient espacées régulièrement, à un intervalle de 2 à 10 μ m. Ces jonctions présentent également un espace synaptique plus important que les synapses classiques (environ 2 nm) et les jonctions

neuromusculaires (40 à 50 nm), bien que celui-ci soit assez variable selon l'organe concerné. En ce qui concerne les artères, cet espace synaptique varie entre 50 nm pour les plus petites artères et 500 nm pour les plus larges (Burnstock, 2008). Cette largeur de l'espace synaptique implique que la transmission synaptique se fait à plus grande distance que pour une synapse classique. L'hypothèse actuellement admise est que la noradrénaline est libérée de manière assez diffuse par les nerfs orthosympathiques, ce qui permet le recrutement d'un grand nombre de cellules musculaires lisses et ainsi une vasoconstriction efficace (Burnstock, 2008). Hypothèse qui est renforcée par l'absence de densité postsynaptique de cette synapse.

Les cellules musculaires lisses vasculaires constituent des syncytium fonctionnels : en effet, elles communiquent entre elles par des jonctions gap, permettant le passage de petites molécules et de l'influx électrique d'une cellule à l'autre.

8 La jonction neuromusculaire

Nous nous attardons quelque peu sur cet autre type de jonction, étant donné que nous nous sommes basés sur sa structure et son fonctionnement pour formuler certaines des hypothèses testées dans la partie expérimentale.

La jonction neuromusculaire est la synapse établie entre un motoneurone et une cellule musculaire striée squelettique.

Pendant le développement, on peut observer une sorte de « prélocalisation » des jonctions neuromusculaires, avec des récepteurs à l'acétylcholine regroupés dans la bande centrale du muscle (Lin *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2001). On pense que ce processus sert à indiquer au motoneurone quelle est sa cible finale dans le muscle (Jing *et al.*, 2009 ; Kim, Burden, 2008). La protéine kinase spécifique du muscle (MuSK) serait impliquée dans la mise en place précoce des jonctions neuromusculaires (Kim, Burden, 2008). Lorsqu'ils innervent les cellules musculaires striées squelettiques, les motoneurones sécrètent de l'acétylcholine et de l'agriline. Ces deux molécules induisent une modification de la répartition des récepteurs à l'acétylcholine (Sanes, Lichtman, 2001). L'agriline interagit alors avec un complexe qui active MuSK (Kim *et al.*, 2008). L'activation de MuSK conduit, via une cascade de signalisation, à l'agrégation de protéines synaptiques au niveau de la membrane postsynaptique (Strochlic *et al.*, 2005).

Les récepteurs à l'acétylcholine s'agrègent grâce à ce processus, ce qui leur permet de transduire correctement le signal et donc d'être fonctionnels.

9 Les modèles utilisés

Comme nous l'avons vu, les JNV sont des jonctions peu étudiées, surtout en comparaison avec les JNM. Notre laboratoire est le premier à s'intéresser à ces jonctions chez la Souris, dans le cadre de l'innervation artérielle. En effet, ces jonctions ont été un peu plus étudiées dans le cadre des interactions entre nerfs orthosympathiques et cellules musculaires lisses des viscères (Burnstock, 2008).

Pour formuler nos hypothèses, nous nous sommes donc basés sur les mécanismes observés pour un autre type de jonction, comme cela a été détaillé au paragraphe précédent, mais également chez un autre modèle animal : *Cænorhabditis elegans* (abrégé en *C. elegans*) (Stavoe et Colon-Ramos, 2012 ; Colon-Ramos *et al.*, 2007 ; Stavoe *et al.*, 2012).

C. elegans est un nématode. Son cycle de vie est de 3 jours, avec une production de 300 individus par génération, ce qui permet de produire un grand nombre d'animaux très rapidement (Plasterk, 1999). Cela augmente la probabilité d'obtenir des mutants rares et augmente la puissance statistique des études réalisées. Sa petite taille (1 mm de longueur pour les adultes) permet de le manipuler relativement aisément et facilite son élevage et son conditionnement. Son hermaphrodisme permet d'initier une lignée avec un seul animal (Brenner, 1974 ; Plasterk, 1999). Par ailleurs, son génome a été entièrement séquencé.

C. elegans est constitué très exactement de 959 cellules ; il en possède un peu plus de mille à un certain stade, mais un nombre précis de cellule dégénère par apoptose au cours du développement. Le connectome⁶ de ses 302 neurones est également précisément connu (Plasterk, 1999).

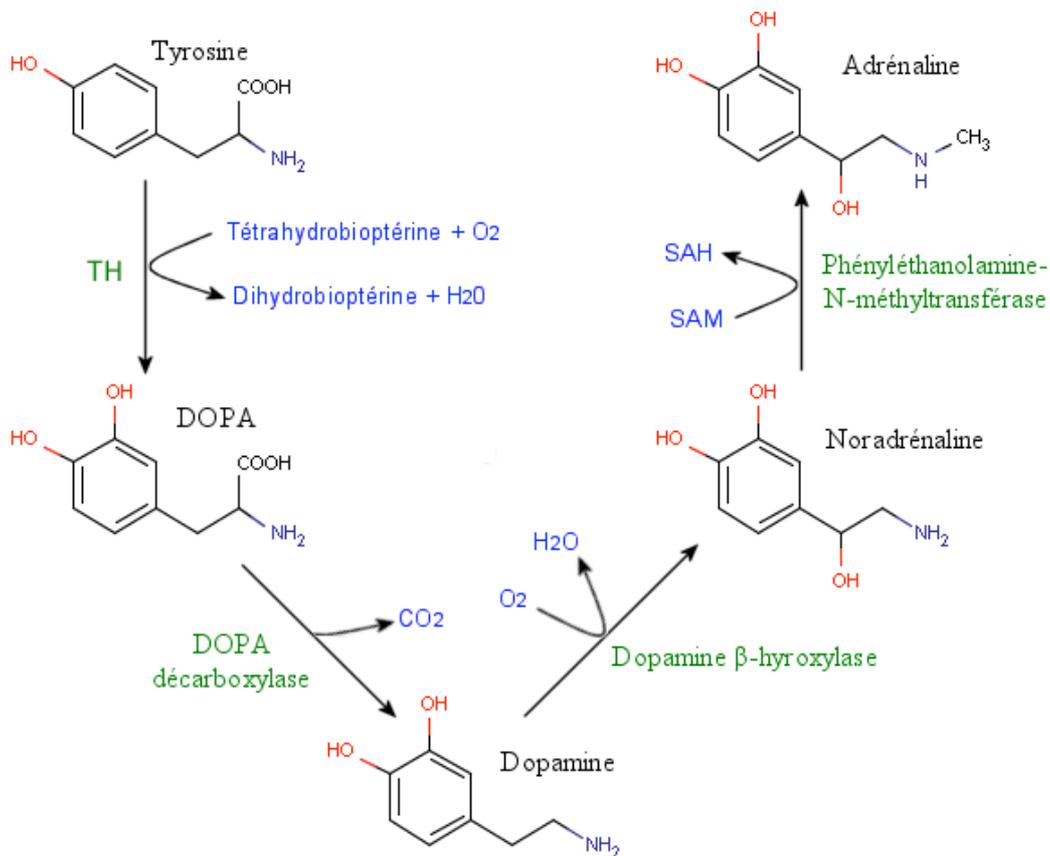
Les interneurones AIY sont des interneurones localisés dans le ganglion ventral de la tête. Ils reçoivent des afférences de neurones sensoriels olfactifs et gustatifs. On pense qu'ils jouent un rôle intégratif. Ils sont également impliqués dans le thermotactisme (capacité de l'animal à se déplacer dans des zones de confort thermique) et la locomotion (Altun *et al.*, 2011). Ces neurones projettent entre autres sur d'autres interneurones, les interneurones RIA. Les interneurones AIY établissent des synapses « en passant » avec les interneurones RIA. La connectivité entre ces deux groupes d'interneurones a été très étudiée et c'est sur leur étude que nous avons fondé certaines hypothèses dans notre système.

⁶ Le connectome décrit l'ensemble des connexions établies entre eux par un réseau de neurones.

10 Les marquages utilisés

Il nous paraît indispensable de détailler ici les différents immuno-marquages utilisés dans l'étude. Les nerfs orthosympathiques sont marqués grâce à un anticorps spécifiquement dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH). La TH catalyse la transformation de la L-tyrosine en L-DOPA (**Figure 26**) et initie ainsi la synthèse des catécholamines. Elle est donc caractéristique des structures synthétisant des catécholamines, en l'occurrence les neurones orthosympathiques dans notre système.

Figure 26 : Chaîne de synthèse des catécholamines



La tyrosine hydroxylase est une enzyme clé de la synthèse des catécholamines ; elle catalyse la transformation de la tyrosine en L-DOPA.

Les cellules musculaires lisses vasculaires ont été marquées grâce à un anticorps spécifiquement dirigé contre une protéine de leur cytosquelette : l'actine des cellules musculaire lisses (Smooth Muscle Actin en anglais, abrégé en SMA).

La synaptophysine est une molécule présynaptique impliquée dans la fusion des vésicules contenant le neurotransmetteur avec la membrane plasmique du neurone, permettant ainsi la libération du neurotransmetteur dans l'espace synaptique. Son expression a été surtout décrite dans les synapses du système nerveux central (Valtorta *et al.*, 2004). J'ai validé son expression au niveau des jonctions neurovasculaires. Nous avons donc utilisé un anticorps spécifiquement dirigé contre la synaptophysine pour marquer spécifiquement les JNV.

La Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) appartient à la superfamille des immunoglobulines. (Nybroe, Bock, 1990). À l'heure actuelle, trois isoformes de NCAM ont été décrites : NCAM120, NCAM140 et NCAM180. Elles diffèrent par la longueur de leur domaine intracellulaire : NCAM120 n'a pas de domaine intracellulaire et le domaine intracellulaire de NCAM140 est plus court que celui de NCAM180. Leur domaine extracellulaire est constitué de cinq domaines immunoglobulines (Ig) et de deux domaines fibronectine de type 3. Les domaines Ig sont impliqués dans les interactions homophiliques, c'est-à-dire entre deux molécules identiques situées sur la même cellule (on parle alors d'interaction *cis*) ou sur deux cellules différentes (on parle alors d'interaction *trans*) (Kasper *et al.*, 2000 ; Soroka *et al.*, 2003 ; Walmod *et al.*, 2004). NCAM peut subir une modification appelée polysialylation. L'acide polysialique est une longue chaîne glucidique chargée négativement attachée par des enzymes, les polysialyltransférases, sur les sites d'interaction homophile des NCAM. La polysialylation réduit les interactions homophiliques aussi bien en *cis* qu'en *trans*, ce qui a pour effet de réduire l'adhérence cellulaire (Rutishauser et Landmesser 1996). La NCAM aurait un rôle dans la synaptogenèse (Dallérac *et al.*, 2013a).

DEUXIEME PARTIE

1 Rappel du contexte scientifique

Le but de cette étude était de préciser la structure des JNV, qui ont été très peu étudiées après G. Burnstock en 2008, ainsi que de comprendre comment elles se mettent en place au cours du développement.

Notre laboratoire a montré que la Nétrine-1, via son récepteur DCC, médie une action attractive sur les fibres orthosympathiques (Brunet *et al.*, 2014) et que l'Éphrine-A4 médie au contraire une action répulsive sur les fibres orthosympathiques via son récepteur EphA4 (Brunet *et al.*, article en préparation). Par ailleurs, Colón-Ramos et son équipe ont démontré chez *Cænorhabditis elegans* que la Nétrine-1 était impliquée dans la mise en place de spécialisations présynaptiques de synapses « en passant », et que dans ce cas, elle interagissait avec le récepteur DCC (Stavoe, Colón-Ramos, 2012). Les JNV se mettant en place à partir de P10 chez la Souris, nous nous sommes alors demandés dans quelle mesure ces deux couples de molécules intervenaient également dans la mise en place des JNV chez la Souris à partir de ce stade.

Par analogie avec la jonction neuromusculaire, nous nous sommes demandés si le récepteur adrénergique α_1 jouait un rôle similaire à celui du récepteur à l'actéylcholine : peut-on observer des agrégats de récepteurs adrénergiques préalablement à l'établissement des JNV ? La présence d'agrégats de récepteurs adrénergiques sur une cellule musculaire lisse vasculaire augmente-elle les chances de celle-ci d'établir une jonction avec un neurone orthosympathique ?

Nous avons également souhaité confirmer et préciser les éléments avancés par Burnstock.

Enfin, nous nous sommes demandés si les défauts d'innervation observés durant le développement en conséquence de l'inactivation génétique de nos molécules d'intérêt, la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4, perduraient à l'âge adulte. En effet, si tel est le cas, cela montrerait que les phénomènes que nous étudions ne sont pas limités au développement, ce qui impliquerait des conséquences physiologiques plus larges. Cela montrerait également que nos molécules d'intérêt sont impliquées dans le maintien de l'innervation à l'âge adulte.

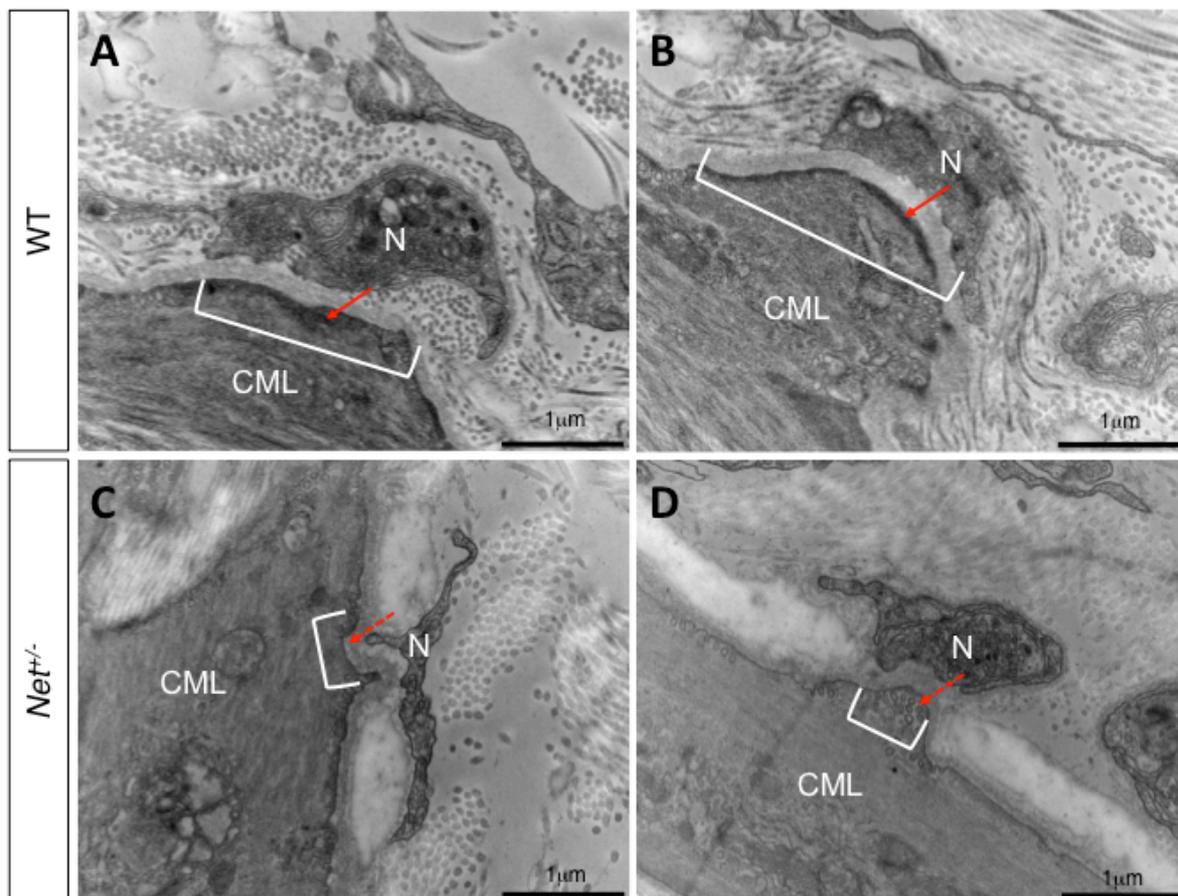
2 Résultats préalables

2.1.1 Etude structurelle des JNV chez des animaux WT et des animaux $Net^{+/-}$

Notre laboratoire a réalisé des vues en microscopie électronique à transmission des JNV chez des souris $Net^{+/-}$ et chez des souris WT. Les souris $Net^{+/-}$ ne possédaient qu'un seul exemplaire du gène codant la Nétrine-1. L'inactivation génétique totale de la Nétrine-1 de manière constitutive est létale à la naissance, les animaux homozygotes mutés se révélant incapables de téter, de se mouvoir et de respirer (Serafini *et al.*, 1996).

Ces vues montrent que les JNV semblent de taille réduite, voire absentes, chez les souris $Net^{+/-}$ et suggèrent la présence de densités postsynaptiques dans les cellules musculaires lisses (**Figure 27**), contrairement à ce qui avait été affirmé par Burnstock en 2008.

Figure 27 : Les souris $Net^{+/-}$ présentent des JNV de taille réduite, voire absentes



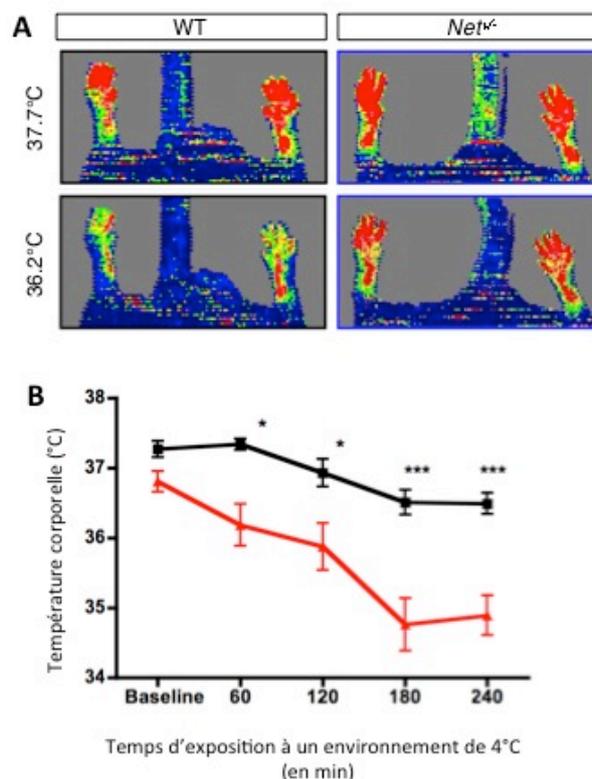
(reproduit d'après Brunet *et al.*, 2014)

A et B montrent deux JNV établies entre un nerf orthosympathique et une cellule musculaire lisse artérielle sur des artères mésentériques de souris WT. N = nerf orthosympathique ; CML = cellule musculaire lisse. Les accolades blanches permettent d'apprécier la taille de la surface de contact entre le nerf et la cellule musculaire lisse vasculaire. Ces deux images suggèrent clairement la présence d'une densité postsynaptique dans les cellules musculaires lisses, pointé sur chaque image par une flèche rouge. C et D montrent deux JNV établies entre un nerf orthosympathique et une cellule musculaire lisse sur des artères mésentériques de souris $Net^{+/-}$. Par rapport aux images du haut, les JNV présentées ici semblent de taille très réduite (accolade blanche) et dépourvues de densité postsynaptique (flèche rouge en pointillés).

2.1.1 Etude fonctionnelle de l'innervation artérielle chez des animaux WT et des animaux $Net^{+/-}$

Notre laboratoire a ensuite voulu tester si les défauts anatomiques observées chez les Souris $Net^{+/-}$ (hypo-innervation artérielle et altération des JNV) était associé à des conséquences fonctionnelles. Pour cela, notre laboratoire a évalué la vasoconstriction et la thermorégulation chez des souris $Net^{+/-}$ et chez des souris WT. La thermorégulation des membres passant en autres par le contrôle de la vasoconstriction des artères périphériques (González-Alonso, 2012), un défaut de thermorégulation peut révéler un défaut de vasoconstriction. Lorsque des souris WT subissent une baisse de température corporelle (ce phénomène est obtenu en anesthésiant la souris sans la réchauffer), une vasoconstriction se produit dans la peau des membres afin de concentrer le flux sanguin dans le corps, en vue de maintenir les organes vitaux à une température proche de 37 °C aussi longtemps que possible. Ce phénomène n'était pas observé chez les souris $Net^{+/-}$, ce qui suggère un défaut fonctionnel de vasoconstriction (**Figure 28**).

Figure 28 : Les souris $Net^{+/-}$ ne maintiennent pas leur température corporelle en cas de refroidissement, en lien avec une absence de vasoconstriction périphérique

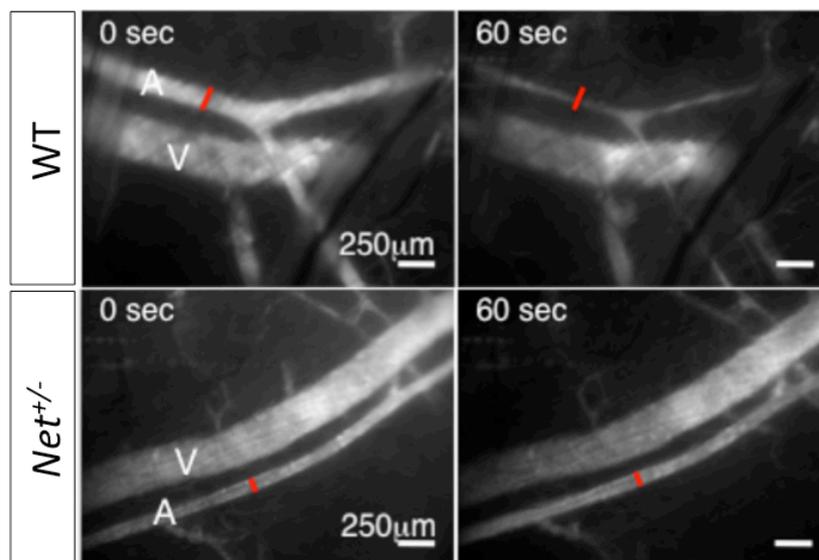


(reproduit d'après Brunet et al., 2014)

Des souris WT et $Net^{+/-}$ ont été anesthésiées et laissées à 4 °C sans processus de réchauffement à **A**. Vue doppler des membres inférieurs des souris testées : plus la couleur se rapproche du rouge, plus le flux sanguin est important. Les souris WT réduisent le flux sanguin dans leurs membres par vasoconstriction (**A**), ce qui leur permet de conserver une température corporelle proche de la normale (**B**). Au contraire, les souris $Net^{+/-}$ se sont révélées incapables de réaliser une vasoconstriction efficace dans les membres inférieurs (**A**), ce qui se traduisait par une baisse significative de la température corporelle par rapport aux animaux WT (**B**) ($p < 0,05$ à $T=60$ min et à $T = 120$ min ; $p < 0,005$ pour $T > 180$ min).

Pour éclaircir l'origine de ce défaut de vasoconstriction, des expériences de stimulation par la noradrénaline et le chlorure de potassium ont été réalisées. La noradrénaline étant le neurotransmetteur des nerfs orthosympathiques contrôlant la vasoconstriction des artères périphériques, l'application de noradrénaline sous une fenêtre dorsale devait induire une vasoconstriction artérielle. C'est effectivement ce que l'on a observé chez les souris WT, mais les souris $Net^{+/-}$ se sont révélées incapables de vasoconstriction artérielle (**Figure 29**). Cette expérience a confirmé le résultat de l'expérience précédente et suggérait que l'incapacité des souris $Net^{+/-}$ à provoquer une vasoconstriction de leurs artères était due à un défaut postsynaptique. Ceci ouvrait deux hypothèses : soit les cellules musculaires lisses des souris $Net^{+/-}$ étaient incapables de se contracter ; soit le défaut se situait au niveau de la transduction du signal.

Figure 29 : Les artères de souris $Net^{+/-}$ sont incapables de vasoconstriction en réponse à une stimulation adrénergique



(reproduit d'après Brunet et al., 2014)

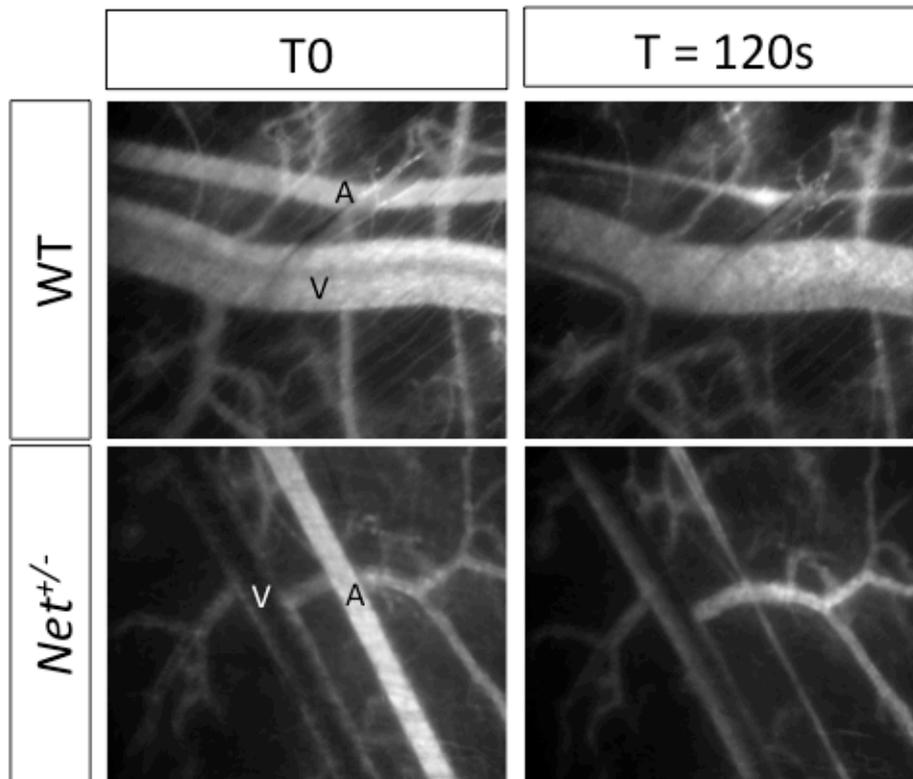
Les images du haut présentent une artère et une veine cutanées avant et après application locale de noradrénaline chez une souris WT. Les images du bas présentent une artère et une veine cutanées avant et après application locale de noradrénaline chez une souris $Net^{+/-}$. Soixante secondes après l'application de noradrénaline, on observait une réduction nette du calibre de l'artère chez la souris WT, ce qui est témoin d'une vasoconstriction (image en haut à droite). Au contraire, le calibre de l'artère cutanée de la souris $Net^{+/-}$ reste sensiblement le même avant et après stimulation, ce qui est témoin d'une absence de vasoconstriction. A. artère. V. veine.

Nous avons donc voulu tester ces deux hypothèses. Pour cela, nous avons réalisé la même expérience en remplaçant la noradrénaline par du chlorure de potassium. Le chlorure de potassium est un agent dépolarisant, entraînant la contraction des cellules musculaires lisses. Si les artères des souris $Net^{+/-}$ étaient incapables de se contracter en réponse à une stimulation au chlorure de potassium, cela indiquait que le défaut de vasoconstriction était dû à l'incapacité des cellules musculaires lisses à se contracter. En revanche, si les artères des souris $Net^{+/-}$ étaient capables de se

contracter en réponse à une stimulation au chlorure de potassium, cela signifiait que le défaut de vasoconstriction était dû plutôt à un défaut de transduction du signal.

Les souris $Net^{+/-}$ contractaient leurs artères cutanées de manière similaire à celles des WT après application de chlorure de potassium (**Figure 30**) ; le défaut de vasoconstriction observé chez ces souris était donc dû à une mauvaise transduction du signal émis par le neurone orthosympathique.

Figure 30 : Les artères des souris $Net^{+/-}$ se contractent de manière similaire à celle des souris WT en réponse à une stimulation par du chlorure de potassium



(reproduit d'après Brunet et al., 2014)

Cette figure représente une artère et une veines cutanées sous une fenêtre dorsale chez une souris WT (images du haut) et une souris $Net^{+/-}$ (images du bas), avant (images de gauche) et après (images de droite) application de chlorure de potassium. Les deux souris étaient capables de contracter normalement leur artère cutanée.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Animaux

Pour cette étude, nous avons utilisé des souris CD1 et des souris C57BL/6J sauvages Wild Type (WT), des souris hétérozygotes mutées pour le gène codant la Nétrine-1 ($Net^{+/-}$) et des souris mutées pour le gène codant le récepteur EphA4 ($EphA4^{-/-}$ et $EphA4^{+/-}$). Les souris $Net^{+/-}$, $EphA4^{-/-}$ et $EphA4^{+/-}$ ont été décrites précédemment (Kullander *et al.*, 2001 ; Serafini *et al.*, 1996). À partir de souris $Net^{+/-}$ et $EphA4^{+/-}$, notre laboratoire a généré des souris doubles hétérozygotes ($Net^{+/-}$; $EphA4^{+/-}$).

3.2 Dissections

Pour les inclusions et les immunomarquages sur tissu entier, les animaux ont été euthanasiés à P10, P15, P20, P25 et P30 par guillotine (P10 et P15) ou par dislocation cervicale (à partir de P20). Les oreilles et le tube digestif du cardia au caecum ont été prélevés et placés dans du PBS++ (Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin, complémenté en cations magnésium et calcium) sur glace. Le mésentère a été séparé du tube digestif en dissection moussée.

Pour les cultures primaires de neurones, les souris ont été euthanasiées à P1 par injection intrapéritonéale létale d'anesthésiant (100 μ L d'une solution à 0,67 mg/mL de xylazine et 3,33 mg/mL de kétamine). Le ganglion cervical supérieur (GCS) a ensuite été séparé de l'artère carotide par dissection moussée sous loupe binoculaire et placé dans du PBS++ sur glace. Pour les cultures primaires de cellules musculaires lisses, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale à P24, le mésentère a été prélevé de la même façon que pour les inclusions puis les artères mésentériques ont été disséquées à la pince.

3.3 Culture cellulaire

Toutes les cultures de cellules ont été réalisées dans des chambres de culture deux puits avec lames en verre (Lab-tek©, DUTSCHER).

3.3.1 Coating

Toutes les lames de culture ont été traitées avec 1 mL de polylysine (SIGMA) à la concentration de 10 μ g/mL à 37 °C sur la nuit puis 800 μ L de laminine (SIGMA) à la concentration de 10 μ g/mL pendant 3 à 4 h à 37 °C avant mise en culture. Les puits ont été lavés rapidement au PBS++ trois fois de suite puis laissés à sécher sous hotte pendant environ 30 min entre les dépôts de polylysine et de laminine.

3.3.2 Culture de neurones seuls

Les GCS ont été incubés dans de la trypsine à 2,5 g/L de trypsine bovine et 0,85 g/L de chlorure de sodium (LIFE TECHNOLOGIES, 1,5 mL pour 3 GCS) pendant 1 h à 37 °C. Cinq mL de milieu de culture ont été ajoutés avant centrifugation pendant 5 min à 2,5 g. Un litre de milieu de culture est constitué de 500 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM ; L-Glutamine, Phenol red, 4,5 g/L D-glucose, Pyruvate ; LIFE TECHNOLOGIES), de 500 mL de F12-Glutamax (*F12 Nutrient Mixture*, de 10 mL de sérum de veau fœtal (SVF) ; le milieu de culture est supplémenté en *Nerve Growth Factor* (NGF) à la hauteur de 20 ng/mL et est à 0,2 M de streptomycine et de pénicilline). Le surnageant a ensuite été éliminé puis les neurones mis en suspension doucement dans 2 mL de milieu de culture avant d'être dilués dans le volume final nécessaire (1 mL par puits de culture). Les neurones ont été réhomogénéisés délicatement avant d'êtreensemencés dans les puits.

3.3.3 Co-culture de neurones orthosympathiques et de cellules musculaires lisses

Les artères mésentériques ont été minutieusement disséquées puis incubées dans une solution d'élastase (1,25 U/mL, SERIABO TECHNOLOGIES) et de collagénase (17,5 U/mL, SIGMA) 2 h à 37 °C en homogénéisant régulièrement. La mise en culture était similaire à celle des neurones, à la différence près que le milieu de culture ne contenait pas de NGF. Les cellules musculaires lisses étaient laissées en culture au moins une semaine, en changeant de milieu tous les deux jours. Des GCS étaient ensuite préparés selon le même protocole que précédemment ; 750 µL de milieu de culture pour cellules musculaires lisses étaient retirés de chaque puits et le volume équivalent de suspension de neurones était ajouté.

3.4 Coupes au cryostat

Après dissection, les tissus ont été fixés 4 h à température ambiante dans du paraformaldéhyde (PFA) dilué à 4% dans du PBS (Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin, non complétement en cations magnésium et calcium), puis lavés pendant 30 min à 2 h dans du PBS (3 lavages de 5 min puis plusieurs lavages longs) avant d'être laissés sur la nuit à 4 °C dans du saccharose dilué à 30% dans du PBS. Le lendemain, les tissus ont été inclus dans de l'OCT Compound (SAKURA) et refroidis rapidement sur carboglace avant d'être placés à -80 °C. Les mésentères ont été coupés au cryostat entre -12 °C et -20 °C en coupes de 14 µm d'épaisseur. Les coupes ont été laissées à sécher à température ambiante pendant au moins 1h30 puis été conservées à -20 °C (si traitement sous trois semaines maximum) ou à -80 °C (si traitement sous plus de trois semaines).

3.5 Immunomarquages

3.5.1 Sur coupes

Les coupes ont été laissées à sécher au moins 1h30 à température ambiante lorsqu'elles n'ont pas été utilisées immédiatement après cryosection. Les coupes ont été placées dans un bain d'acétone 100% pendant 10 min à température ambiante puis laissées à sécher 30 min à température ambiante. Elles ont été placées dans du PBS-Triton 0,5% pendant 5 min puis lavées 3 fois 5 min avec du PBS avant d'être laissées 1 h à température ambiante dans une solution à 0,01% d'acide maléique et 0,01% de Blocking Reagent, PERKIN ELMER SAS). L'anticorps primaire a été dilué dans une solution de PBS, 0,1% Tween, 1% d'albumine bovine sérique et 1% de sérum de chèvre) et laissé sur la nuit à 4 °C. Les coupes ont ensuite été lavées au PBS (4 fois 5 min puis 2 à 3 lavages plus longs). L'anticorps secondaire, dilué dans la même solution, a été laissé 1h30 à température ambiante. Les coupes ont été lavées 4 x 5 min dans du PBS avant d'être montées dans du Fluorescent Mounting Medium (DAKO).

3.5.2 Sur tissu entier

Après dissection, les tissus ont été fixés 30 min dans du PFA 4% puis lavés 3 fois 10 min dans du PBS. Les tissus ont été laissés 4 h à température ambiante dans une solution 1 de Tris pH 7,4 0,1 M ; NaCl 0,15 M ; Blocking Reagent (PERKIN ELMER SAS); Triton 0,2%. L'anticorps primaire, dilué dans une solution 2 de Tris pH 7,4 0,1 M ; NaCl 0,15 M ; Tween 0,2 %), a été laissé sur la nuit à 4 °C. Les tissus ont été lavés au moins 4 h dans la solution 2, en changeant régulièrement le bain. L'anticorps secondaire, dilué dans la solution 1, a été laissé 4 h à température ambiante. Les tissus ont été lavés sur la nuit dans la solution 2 puis montés entre lame et lamelle dans du Fluorescent Mounting Medium.

3.5.3 Sur cellules

Immédiatement après avoir été observées au vidéomicroscope, les cellules en culture ont été fixées avec du PFA 2%-Saccharose 15% en PBS pendant 15 min à température ambiante puis lavées 3 fois rapidement avec du PBS. Elles ont reçu un bain de PBS-Triton 0,1% pendant 5 min à température ambiante puis ont été lavées 3 fois rapidement au PBS. Les cellules ont été bloquées avec du SVF dilué à 1% dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps primaire, dilué dans du PBS-SVF 1%, a été laissé 1h à température ambiante. Les cellules ont été lavées 3 fois rapidement dans du PBS. L'anticorps secondaire, dilué dans du PBS-SVF 1%, a été laissé 30 min à

température ambiante. Les cellules ont été lavées plusieurs fois rapidement dans du PBS puis conservées à 4 °C avant d'être observées en microscopie confocale.

3.6 Anticorps utilisés

3.6.1 Sur coupe

Anticorps primaires : anti-synaptophysine (R&D) au 1:1000, anti-TH (MILLIPORE) au 1:200. Anticorps secondaires : anti-mouse IgG1 488 (INVITROGEN) au 1:200, anti-rabbit 635 (INVITROGEN) au 1:200, anti-SMA 561 (SIGMA) dilué au 1:200.

L'anticorps anti-SMA est un anticorps couplé à un fluorochrome rouge, c'est pourquoi il est classé avec les anticorps secondaires.

3.6.2 Sur tissu entier

Anticorps primaires : anti-NCAM (MILLIPORE) dilué au 1 :100, anti-récepteur adrénergique α_1 (ABCAM) dilué au 1:200. Anticorps secondaires : les mêmes que sur coupes.

3.6.3 Sur cellules

Anticorps primaires : anti-synaptophysine au 1:1000, anti-TH au 1:200, anti-récepteur adrénergique α_1 au 1:200. Anticorps secondaire : les mêmes que sur coupes et sur tissu entier.

3.7 Imagerie

Les images des immunomarquages sur coupes et sur tissu entier ont été réalisées en microscopie confocale (Leica SP5-MP, x63 NA 1,4). Les cellules en culture ont été observées *in vivo* en vidéomicroscopie (Vidéomicroscope Leica, x63 NA 1,25, contraste de phase) : 1 image toutes les 5 min pendant 1h. Après fixation, les cellules ont été observées en fluorescence et en lumière transmise en microscopie confocale (Spinning-disk Roper, X60 NA 1,4).

3.8 Quantification et analyses statistiques

Toutes les quantifications ont été réalisées en aveugle. Le niveau d'innervation des artères auriculaires cutanées immunomarquées a été quantifié à partir des images réalisées en microscopie confocale sur le logiciel Fiji. Un t-test a été réalisé pour comparer tous les génotypes deux à deux sur le logiciel Prism.

Vingt artères réparties uniformément par génotype (*EphA4*^{-/-} et WT de la même portée, *Net*^{+/-} et WT de la même portée) ont été observées à partir des coupes d'artères mésentériques. Le diamètre et le périmètre des artères a été mesuré pour s'assurer de la comparabilité des quantification. Les JNV

ont été définies comme les points de colocalisation péri-artérielle du marquage anti-synaptophysine (marqueur présynaptique) et du marquage anti-TH (TH = Tyrosine Hydroxylase, qui est une enzyme clé de la synthèse des catécholamines, et permet donc de marquer spécifiquement les neurones orthosympathiques). Ces points de co-localisation ont été repéré par analyse d'image sur le logiciel ImageJ. Leur nombre par artère et leur surface ont été quantifiés. Des t-test ont été réalisés sur le logiciel Prism.

Les films réalisés à partir des co-cultures de neurones orthosympathiques et de cellules musculaires lisses ont été analysés de manière semi-quantitative : les films ont été visionnés soigneusement plusieurs fois et les différents paramètres ont été quantifiés manuellement. Pour chaque paramètre, un t test a été réalisé sur Prism.

4 Résultats

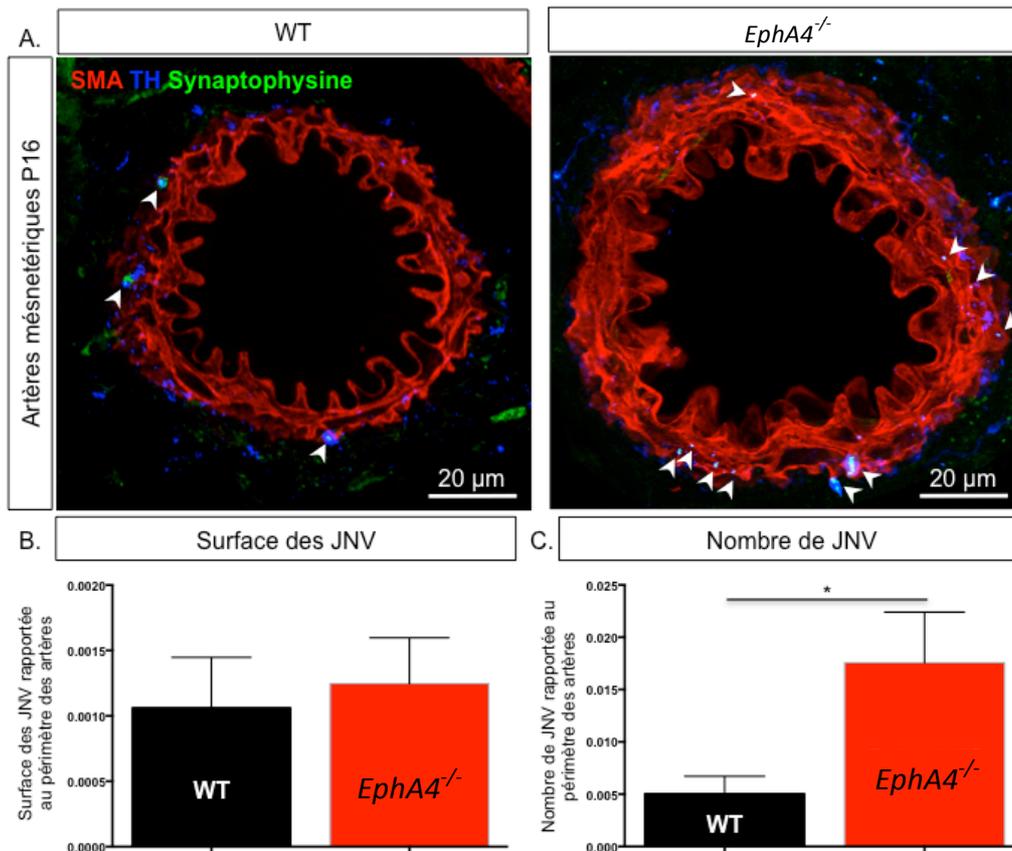
4.1 Rôle de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans la mise en place des JNV

Les données préliminaires obtenues par notre laboratoire ainsi que différentes données de la littérature suggéraient que la Nétrine-1 pourrait être impliquée dans la mise en place des JNV. Je me suis donc demandée si la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4 étaient impliquées dans la mise en place des JNV chez la Souris à partir de P10.

Pour cela, j'ai utilisé d'une part des souris *EphA4*^{-/-} et des souris WT de la même portée. Les souris *EphA4*^{-/-} étaient homozygotes mutées pour le gène codant le récepteur EphA4. J'ai euthanasié ces souris à P16, afin de me situer après de la formation des JNV, sans que les souris soient trop âgées. En effet, en euthanasiant des souris à P10 exactement, nous aurions risqué d'être contemporains de la mise en place des JNV, et d'obtenir des résultats moins significatifs. L'inactivation totale du récepteur EphA4 chez ces souris induisant la perte de répulsion liée au couple Éphrine-A4/EphA4, mon hypothèse était que les souris *EphA4*^{-/-} pourraient présenter un plus grand nombre de JNV que les souris WT de la même portée.

À diamètre d'artère équivalent, les artères des souris *EphA4*^{-/-} présentaient de fait significativement plus de JNV que les artères des souris contrôle (**Figure 31**). Ce résultat était en faveur de l'hypothèse selon laquelle le couple Éphrine-A4 / EphA4 aurait un rôle inhibiteur de la formation des JNV à partir de P10 et pourrait donc être un régulateur de la formation des JNV.

Figure 31 : Les JNV restent de taille constante mais sont plus nombreuses chez les individus *EphA4*^{-/-}



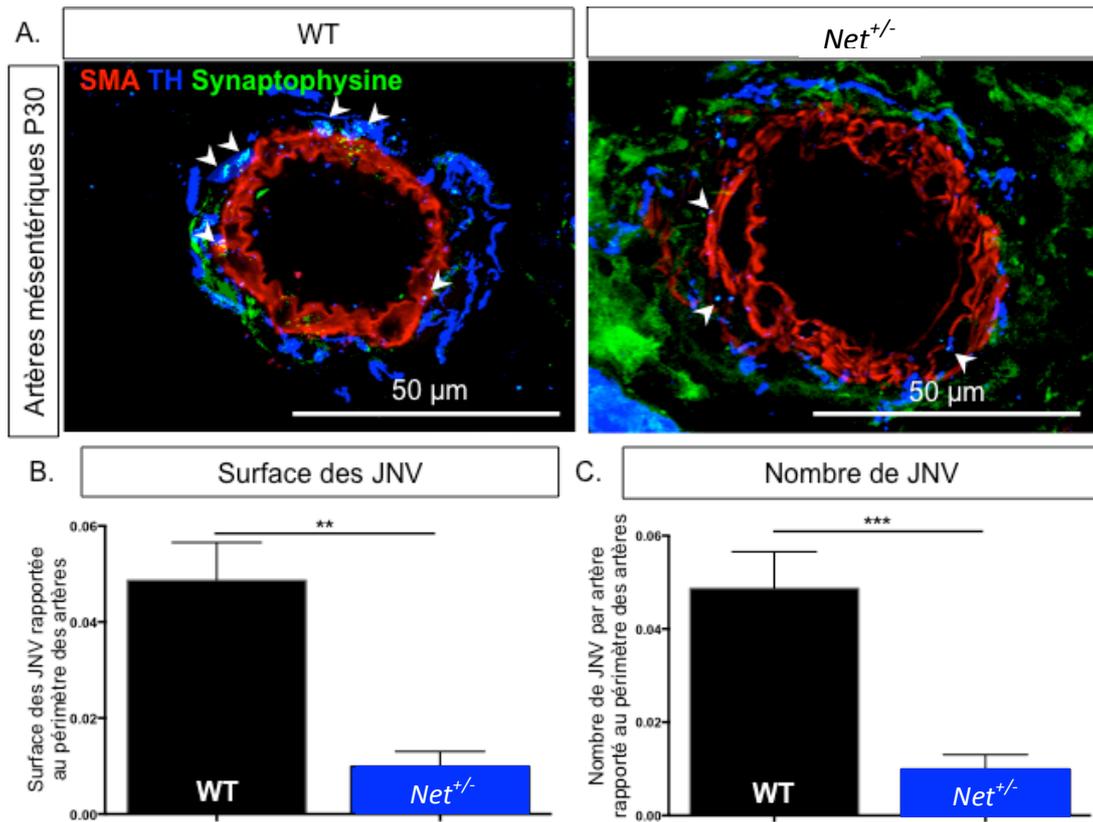
A) Coupes d'artères mésentériques d'individus WT et *EphA4*^{-/-} à P16 sur lesquelles a été réalisé un immunomarquage anti-TH (en bleu), anti-synaptophysine (en vert) et anti-SMA (en rouge). Les têtes de flèches pointent les JNV, qui correspondent aux points de colocalisation entre le marquage anti-TH et le marquage anti-synaptophysine. **B)** Les JNV sont significativement plus nombreuses chez les souris *EphA4*^{-/-} (n = 2 individus par génotype, 20 artères par individu ; t test, p < 0,05). En revanche, la surface des JNV (considérée comme la surface des points de colocalisation entre le marquage anti-TH et le marquage anti-synaptophysine) n'est pas différente entre les souris *EphA4*^{-/-} et les souris WT.

J'ai d'autre part utilisé des souris *Net*^{+/-} et des souris WT de la même portée. N'ayant pu obtenir d'animaux plus jeunes, j'ai euthanasié ces souris à P30.

D'après les résultats préliminaires présentés précédemment, je m'attendais à ce que les JNV des souris *Net*^{+/-} soient de taille réduite par rapport à celles des souris WT, et que les artères des souris *Net*^{+/-} présentent moins de JNV que les artères des souris WT.

À diamètre d'artère équivalent, les artères des souris *Net*^{+/-} présentaient effectivement des JNV réduites en nombre et en taille par comparaison avec les artères des animaux contrôle (**Figure 32**). Ces résultats confirmaient les résultats préliminaires présentés précédemment et sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 favoriserait la mise en place des JNV à partir de P10.

Figure 32 : Les JNV sont réduites en nombre et en taille chez les individus $Net^{+/-}$



A Coupes d'artères mésentériques d'individus adultes (P30) WT et $Net^{+/-}$ sur lesquelles a été réalisé un immunomarquage anti-TH (en bleu), anti-synaptophysine (en vert) et anti-SMA (en rouge). Les têtes de flèches pointent les JNV. **B** et **C** Les JNV sont significativement plus petites chez les souris $Net^{+/-}$ ($n = 4$ individus par génotype, 20 artères par individu ; t test, $p < 0,01$) et sont présentes en nombre significativement plus réduit (t tests, $p < 0,005$)

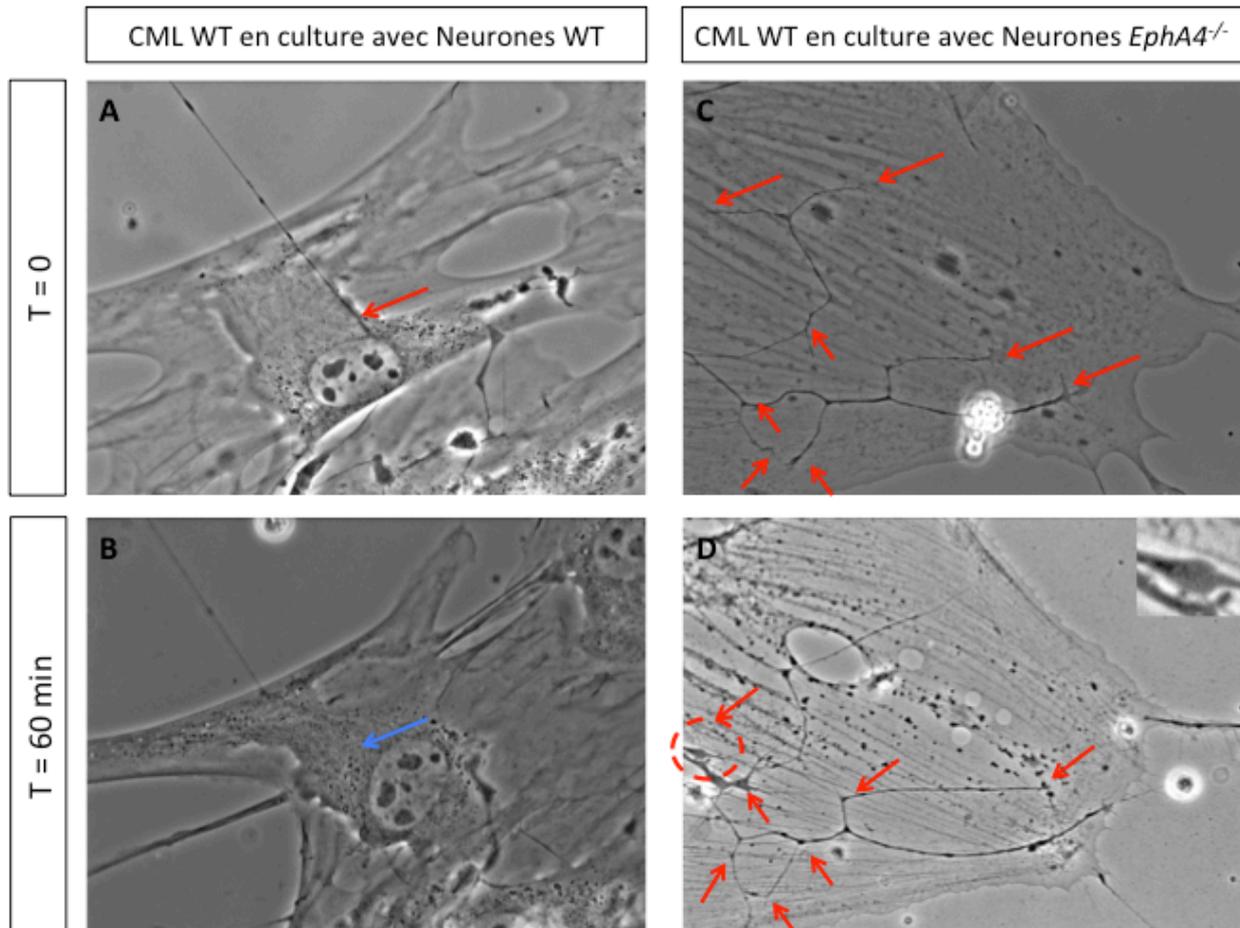
4.2 Rôle du couple *Éphrine-A4 / EphA4* dans la mise en place et la stabilisation des JNV

Nous avons mis au point un système de co-culture entre neurones orthosympathiques et cellules musculaires lisses vasculaires pour étudier directement l'interaction de ces cellules et l'aspect moléculaire de la formation des JNV.

Le visionnage des films réalisés à partir de ces co-cultures a révélé plusieurs informations. 1) Les cellules musculaires lisses vasculaires avaient tendance à se rétracter lorsque les neurones entrent en contact avec elles. Ce phénomène ne durait que quelques dizaines de secondes. 2) Les axones établissaient des contacts avec les cellules musculaires lisses vasculaires au cours du film. Ces contacts pouvaient être maintenus, parfois en dépit de la rétraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (le neurone « s'accrochait » à la cellule musculaire lisse vasculaire), ou bien éliminés, soit du fait de la rétraction de la cellule musculaire lisse vasculaire, soit du fait de la rétraction du cône de croissance du neurone. 3) De petites excroissances sur la partie des axones en contact avec des cellules musculaires lisses vasculaires ont été observées sur plusieurs cônes de croissance (**Figure 33**).

Il semblerait que ces excroissances constituent de réels points de contacts entre neurones et cellules musculaires lisses vasculaires. Nous avons formulé l'hypothèse que ces points de contact pourraient être les « varicosités » qu'évoquait Burnstock (Burnstock 2008).

Figure 33 : Les neurones orthosympathiques *EphA4*^{-/-} établissent plus de contacts avec les cellules musculaires lisses vasculaires que leurs homologues WT *in vitro*

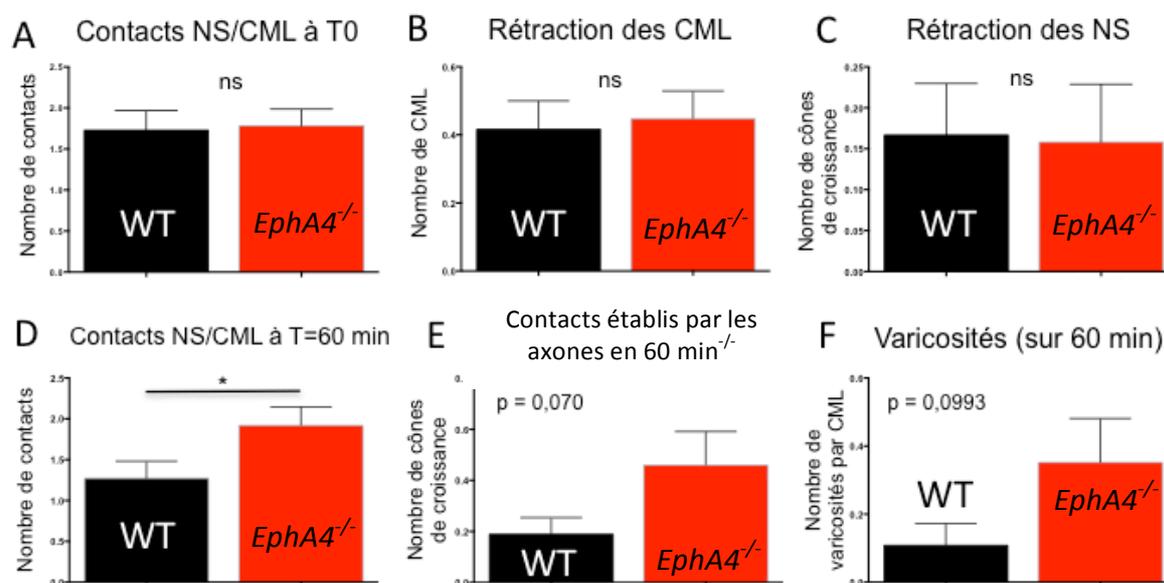


Les neurones orthosympathiques WT avaient tendance à ne pas maintenir les contacts (**B**) qu'ils avaient établis avec les cellules musculaires lisses *in vitro* (**A**). La flèche rouge (**A**) indique un contact établi entre la cellule musculaire lisse vasculaire et le neurone orthosympathique WT à T0. La flèche bleue (**B**) repère l'endroit où avait été établi précédemment. Par ailleurs, la comparaison des images **A** et **B** montre que la cellule musculaire lisse vasculaire s'est contractée au contact du neurone orthosympathique au cours des 60 min. Les neurones orthosympathiques *EphA4*^{-/-} ont eu tendance à établir plus de contacts que leurs homologues WT dès T0 (**C**) et à les maintenir au cours de l'expérience (**D**), à la différence de leurs homologues WT. Les flèches rouges (**C** et **D**) indiquent les contacts établis entre le neurone orthosympathique et la cellule musculaire lisse vasculaire. Le cercle rouge (**D**) correspond à la région zoomée dans l'encart en haut à droite de l'image **D**. Cette structure correspond à ce que nous avons défini comme des varicosités.

Le nombre de contacts établis entre les neurones et les cellules musculaires lisses vasculaires était similaire en début d'expérience quel que soit le génotype des neurones (**Figure 34A**). Le nombre de neurones ou de cellules musculaires lisses vasculaires s'étant rétracté suite à l'établissement d'au moins un contact au cours des 60 min de visionnage n'était pas non plus différent selon le génotype des neurones (**Figure 34B, C**). En revanche, au bout de 60 min, il y avait significativement plus de

contacts établis entre les neurones *EphA4*^{-/-} et les cellules musculaires lisses vasculaires qu'entre les neurones WT et les cellules musculaires lisses vasculaires (**Figure 34D**). Cette augmentation était compatible avec une perte de la répulsion due à l'interaction Éphrine-A4 / EphA4. Le nombre de neurones *EphA4*^{-/-} en contact avec des cellules musculaires lisses au cours des 60 min d'acquisition semblait également plus élevé que celui de neurones WT (**Figure 34E**). Enfin, les « varicosités » semblaient plus fréquentes entre neurones *EphA4*^{-/-} et cellules musculaires lisses vasculaires qu'entre neurones WT et des cellules musculaires lisses vasculaires (**Figure 34F**).

Figure 34 : Augmentation du nombre de contacts entre neurones orthosympathiques *EphA4*^{-/-} et cellules musculaires lisses vasculaires



Quantifications réalisées sur la base de films de co-cultures de cellules musculaires lisses vasculaires et de neurones orthosympathiques (WT vs *EphA4*^{-/-}, n = 40 neurones par génotype). Le nombre de contacts neurones/cellules musculaires lisses vasculaires établis au début de l'expérience, à T0 (A), le nombre de cellules musculaires lisses vasculaires s'étant rétractées après avoir été contactées par le neurone au cours des 60 min (B) et le nombre de cônes de croissance s'étant rétractés après avoir contacté une cellule musculaire lisse vasculaire au cours des 60 min de l'expérience (C) n'était pas significativement différent en fonction du génotype du neurone. D) Après 60 min, les neurones *EphA4*^{-/-} avaient plus de contacts que les neurones orthosympathiques WT avec les cellules musculaires lisses vasculaires (t test, p < 0,05). Les axones *EphA4*^{-/-} montraient une tendance à établir activement plus contacts avec les cellules musculaires lisses vasculaires (t test, p = 0,070) (E) et plus de varicosités (t test, p = 0,093) (F) à 60 min. NS = Neurone Sympathique ; CML = Cellule Musculaire Lisse.

Ces résultats suggèrent donc que le couple Éphrine-A4 / EphA4 participerait à la régulation de la mise en place à la stabilisation des JNV.

4.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place et le maintien des JNV par l'Éphrine-A4

Les résultats précédents évoquant un rôle inhibiteur de l'Éphrine-A4 dans la mise en place et la stabilisation des JNV, nous avons voulu déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à partir d'immunomarquages réalisés sur ces cellules. Par similitude avec les jonctions

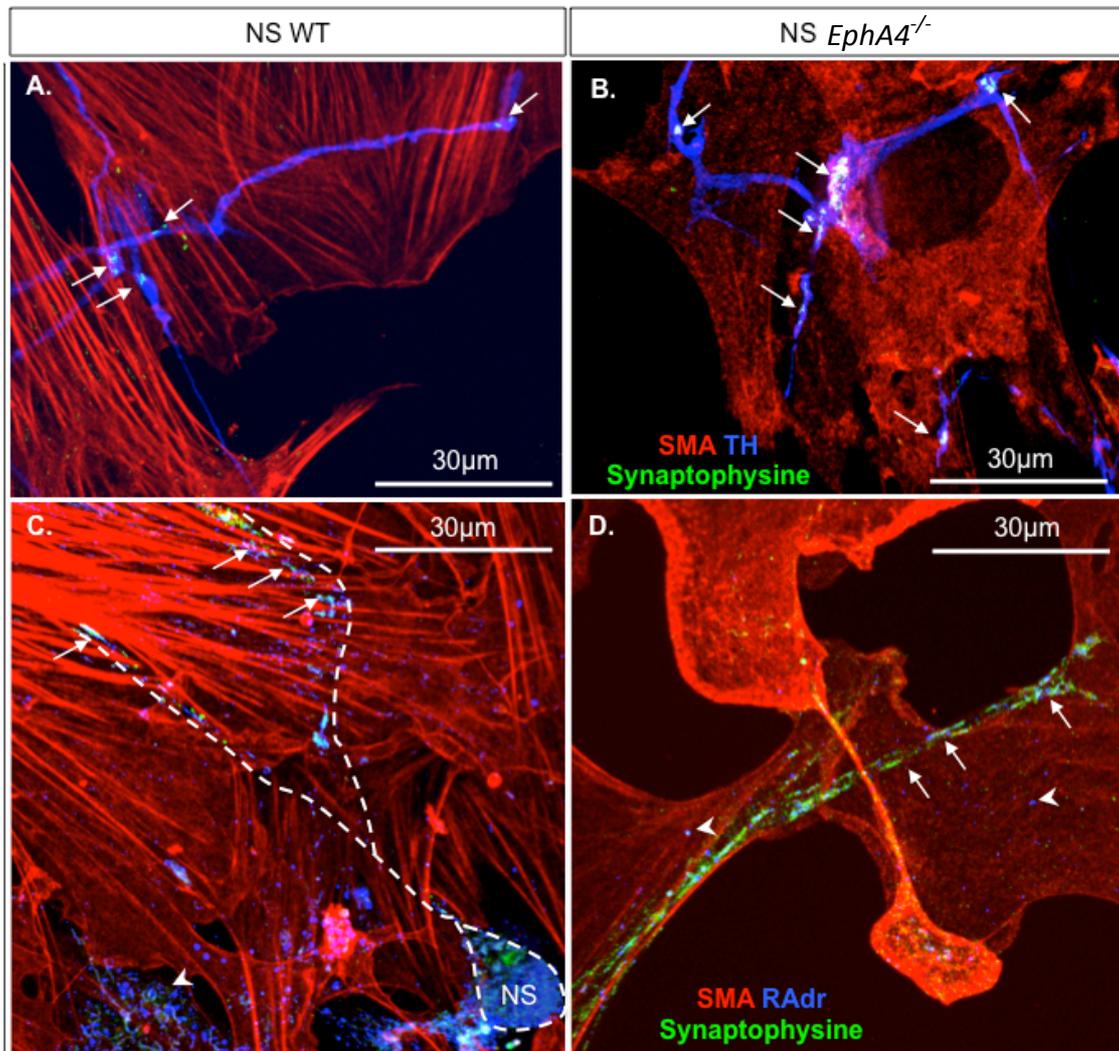
neuromusculaires, nous avons pensé que la répartition des récepteurs adrénérgiques α_1 pouvait jouer un rôle dans la mise en place des JNV. De plus, les expériences de stimulation à la noradrénaline et au chlorure de potassium suggérant que le défaut de vasoconstriction observée chez les souris *Net^{+/-}* était dû à une mauvaise transduction du signal renforçait l'hypothèse selon laquelle la répartition postsynaptique des récepteurs adrénérgiques α_1 était un élément important dans la mise en place des JNV.

Nous avons testé si la délétion du récepteur EphA4 dans les neurones orthosympathiques pouvait induire une modification de la répartition des récepteurs adrénérgiques α_1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires par rapport à celles mises en culture avec des neurones orthosympathiques WT.

J'ai voulu évaluer la mise en place effective de JNV fonctionnelles en réalisant un immunomarquage spécifiquement dirigé contre une molécule présynaptique : la synaptophysine (**Figure 35 A,B**). Les petites excroissances visualisées sur les images réalisées en vidéomicroscopie contenaient de la synaptophysine d'après l'immunomarquage réalisé sur cellule, et correspondaient donc bien à des JNV (**Figure 35 A,B**). Le marquage anti-synaptophysine paraissait plus intense sur les co-cultures entre neurones orthosympathiques *EphA4^{-/-}* et cellules musculaires lisses vasculaires (**Figure 35B**). Ceci corrèle les observations *in vivo* (**Figure 30 A, B**).

Nos résultats préliminaires indiquaient une légère différence de répartition des récepteurs adrénérgiques α_1 sur la cellule musculaire lisse vasculaire en fonction du génotype du neurone orthosympathique (**Figure 35 C, D**). Sur les cellules musculaires lisses vasculaires mises en culture avec des neurones orthosympathiques WT, le marquage anti-récepteur adrénérgique α_1 se traduisait par des points très circonscrits, très largement répartis à la surface de la cellule, au-dessus du noyau, et peu de marquage était observable en périphérie de la cellule (**Figure 35 C**). Sur les cellules musculaires lisses vasculaires mises en culture avec des neurones orthosympathiques *EphA4^{-/-}*, il apparaissait que des récepteurs adrénérgiques α_1 se délocalisaient en regard de l'axone ayant contacté la cellule musculaire lisse vasculaire. Cela pourrait plaider en faveur de l'hypothèse selon laquelle la signalisation Éphrine-A4/EphA4 régulerait la répartition subcellulaire des récepteurs adrénérgiques α_1 (**Figure 35 D**).

Figure 35 : La délétion du récepteur EphA4 dans les neurones orthosympathiques pourrait avoir un effet sur la mise en place des JNV et la répartition des récepteurs adrénérgiques α_1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires



Co-culture de cellules musculaires lisses vasculaires WT prélevées sur des souris P24 et mises en culture pendant 14 jours et de neurones orthosympathiques prélevés sur des souris P1, WT et *EphA4*^{-/-} respectivement. **A** et **B** marquage anti-SMA, anti-TH et anti-synaptophysine. Les flèches indiquent les JNV. Le neurone *EphA4*^{-/-} a établi plus de contacts que le neurone WT avec la cellule musculaire lisse vasculaire. **C** et **D** marquage anti-SMA, anti-récepteur adrénérgique α_1 et anti-synaptophysine. Les têtes de flèches montrent des récepteurs adrénérgiques α_1 . Sur l'image de gauche, la silhouette du neurone est tracée en pointillés. Les flèches pointent le marquage anti-récepteur adrénérgique et anti-synaptophysine le long de l'axone. Les récepteurs adrénérgiques α_1 semblent se délocaliser plus facilement le long de l'axone *EphA4*^{-/-} alors qu'ils semblent rester près de leur localisation initiale dans la configuration avec le neurone orthosympathique WT.

Si ces résultats préliminaires sont confirmés par la suite, cela indiquerait une implication directe de l'Éphrine-A4 dans la mise en place et la stabilisation des JNV.

4.4 Répartition des JNV à l'échelle de l'organisme

Un autre axe de ce projet, outre la compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la mise en place des JNV, était d'étudier leur répartition à l'échelle de l'organisme et d'en déduire des

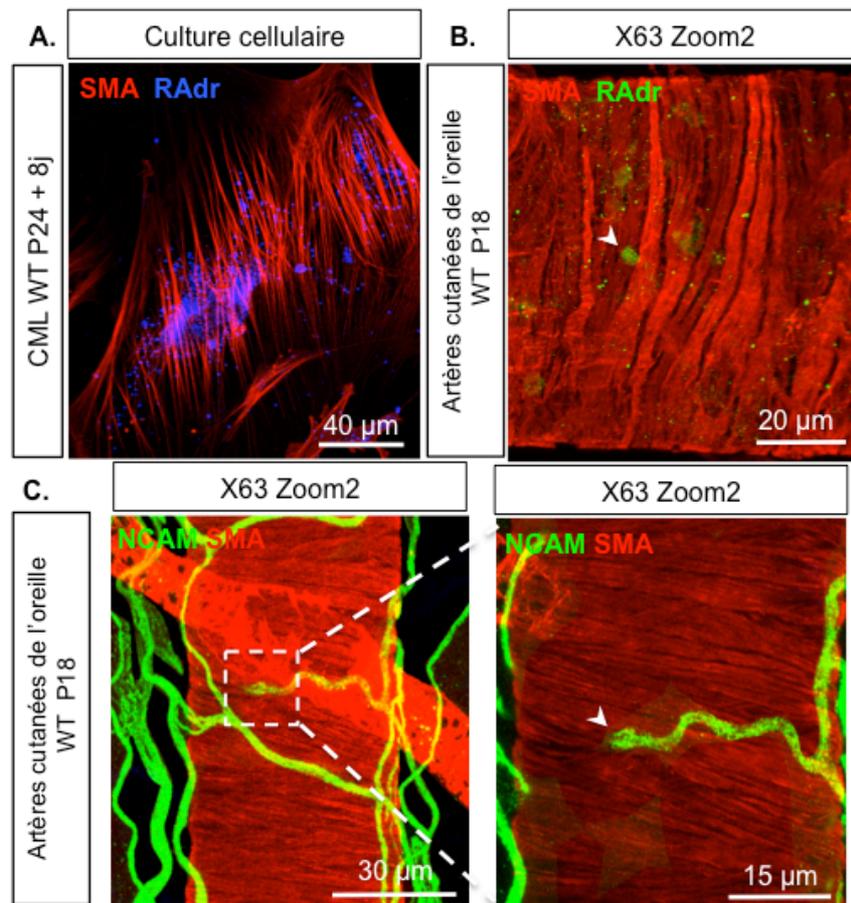
hypothèses mécanistiques : les JNV se mettent-elles en place de manière prédéterminée ou bien stochastiquement ? Dans les deux cas, quelles caractéristiques présentent les cellules musculaires lisses vasculaires impliquées ?

Selon Burnstock, l'intervalle entre varicosités est assez constant, entre 2 et 10 μm (Burnstock 2008) et il semblerait qu'il en soit de même pour les synapses en passant de *C. elegans*. Pour répondre à ces questions, l'optimisation d'immunomarquages sur tissu entier et la reconstruction en trois dimensions permettant de visualiser les artères, les neurones et les synapses ont été initiées.

L'utilisation de l'anticorps anti-récepteur adrénergique α_1 sur tissu entier (mésentères et oreilles) a donné des résultats aléatoires. Cependant, les « spots » de marquages anti-récepteur adrénergique α_1 visibles sur des artères WT (**Figure 36B**) semblent cohérents avec la large répartition en surface de la cellule musculaire lisse, en regard du noyau, observée sur les marquages réalisés *in vitro* (**Figure 36A**). Par ailleurs, des marquages réalisés avec un antagoniste adrénergique fluorescent dans notre laboratoire sur des aortes de caille ont présenté un aspect similaire (données non montrées).

L'anticorps anti-NCAM que nous avons utilisé reconnaît les différentes formes de NCAM non polysialylées, ce qui explique le marquage pan-neuronal que nous avons obtenu (**Figure 36C**). Sur certaines artères, des points de contacts neurone-artère semblent être visualisés (**Figure 36C**). Ce marquage démontre que NCAM est bien exprimé dans le système nerveux végétatif périphérique, ce qui n'est actuellement pas répertorié dans la littérature.

Figure 36 : La mise en place des JNV semble impliquer les récepteurs adrénrgiques α_1 et la molécule d'adhérence neuronale NCAM



A. Marquage anti-récepteur adrénrgique α_1 (RAdr, vert) et anti-SMA (rouge) sur une cellule musculaire lisse vasculaire WT prélevée à P24 et mise en culture pendant 14j avec des neurones orthosympathiques WT (microscopie confocale). Les récepteurs adrénrgiques α_1 se regroupent majoritairement dans une zone de la cellule (cette zone est en regard du noyau d'après la comparaison avec la vue en contraste de phase, non montrée ici). **B.** Marquage anti-récepteur adrénrgique α_1 (RAdr, en vert) et anti-SMA (en rouge) sur une artère cutanée de l'oreille (WT P18). Le marquage anti-récepteur adrénrgique α_1 présente un aspect compatible avec celui décrit en culture cellulaire (**A**). **C.** Marquage anti-SMA (en rouge) et anti-NCAM (en vert) sur une artère cutanée de l'oreille (WT P18), le panneau de droite correspond à la zone encadrée en pointillés sur le panneau de gauche. NCAM est exprimée dans tout l'axone. A fort grossissement, les points de contacts entre le nerf et l'artère sont visibles.

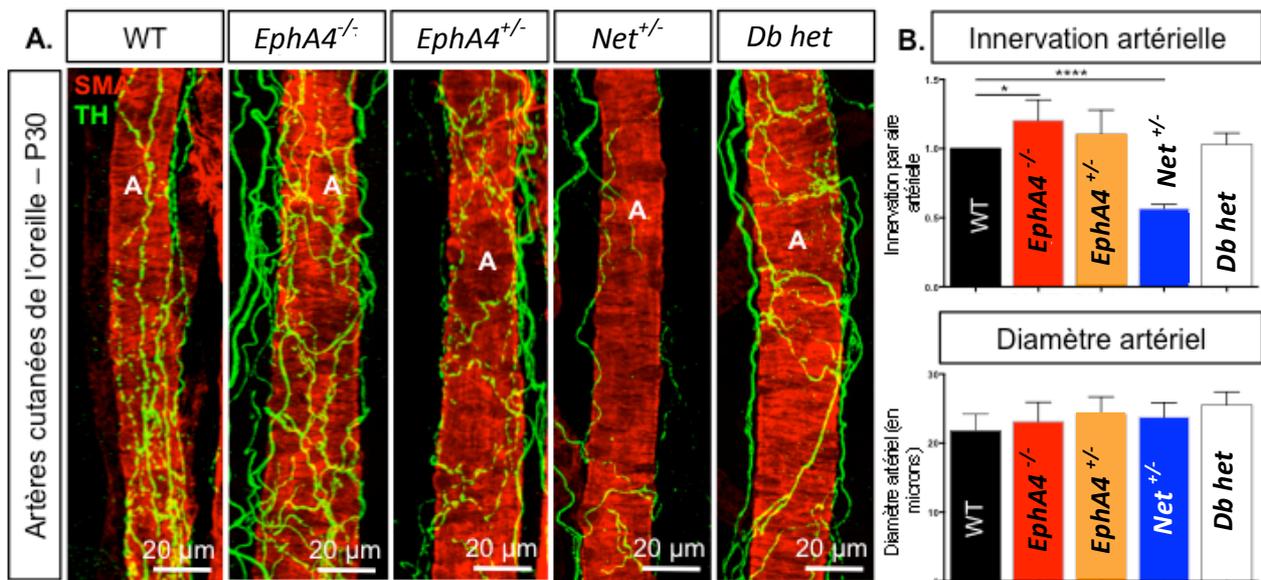
4.5 Rôles de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans le maintien de l'innervation artérielle à l'âge adulte

J'ai ensuite étudié le rôle de la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4 dans le maintien de l'innervation artérielle. En effet, notre laboratoire ayant démontré le rôle de ces molécules dans l'initiation de l'innervation artérielle à P2, j'ai voulu déterminer si les phénotypes observés au cours du développement se maintenaient à l'âge adulte.

Pour tester si l'hyperinnervation artérielle induite par l'inactivation du récepteur à l'Éphrine-A4, EphA4, et l'hypo-innervation induite par l'inactivation partielle de la Nétrine-1 à P2 étaient maintenues à l'âge adulte, j'ai réalisé des immunomarquages anti-tyrosine hydroxylase et anti-

SMA sur des artères auriculaires cutanées de souris adultes. Sur des artères de calibre similaire pour les différents génotypes (**Figure 37C**), les différences de niveau d'innervation observées à P2 étaient conservées à l'âge adulte (**Figure 37A, B**) : les artères des individus *EphA4*^{-/-} étaient significativement plus innervées que celles des individus WT ; les artères des individus *Net*^{+/-} étaient significativement moins innervées que celles des individus WT. Ayant réalisé cette expérience sur des souris issues d'un accouplement *Net*^{+/-};*EphA4*^{+/-} x *EphA4*^{+/-}, j'ai également été en mesure d'étudier le phénotype des individus *Net*^{+/-};*EphA4*^{+/-} et des individus *EphA4*^{+/-} à l'âge adulte. Comme observé à P2 et à P3, les individus *EphA4*^{+/-} présentaient un niveau d'innervation artériel non significativement différent de celui des individus *EphA4*^{-/-} et non pas intermédiaire, comme on aurait pu s'y attendre. Les individus *Net*^{+/-};*EphA4*^{+/-} semblaient également présenter un niveau d'innervation artérielle comparable à celui des individus mutés pour le gène codant le récepteur EphA4.

Figure 37 : La délétion du récepteur de EphA4 induit une hyperinnervation artérielle tandis que la délétion de la Nétrine-1 induit une hyperinnervation artérielle observable à l'âge adulte



A. Marquage anti-tyrosine hydroxylase (TH, en vert) et anti-smooth muscle actin (SMA, en rouge) sur des artères cutanées de l'oreille chez des souris adultes (P30). Sur des artères de même calibre, l'individu *EphA4*^{-/-} présentait une hyperinnervation artérielle par rapport à l'individu WT ; l'individu *Net*^{+/-} une hypo-innervation artérielle ; les autres individus présentaient une innervation artérielle similaire à celle du WT. **B.** Quantification réalisée sur des artères présentant un diamètre équivalent : les artères des individus *EphA4*^{-/-} étaient significativement plus innervées que celles des individus WT (t test, $p < 0,05$) et celles des individus *Net*^{+/-} étaient significativement moins innervées (t test, $p < 0,0001$). *Db het* = *Net*^{+/-};*EphA4*^{+/-}.

Ces résultats montraient que les défauts d'innervation observés au cours du développement à P2 perduraient à l'âge adulte, ce qui ouvrait des perspectives intéressantes puisque les conséquences physiologiques d'un défaut d'innervation orthosympathique artérielle pourraient être testées à l'âge adulte, notamment pour la régulation de la pression artérielle.

5 Discussion

Le but de ce projet était 1) d'étudier la structure des JNV, en comparant les résultats obtenus avec la description donnée par Burnstock (Burnstock, 2008) ; 2) d'étudier le rôle de deux molécules, la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4, dans la mise en place et le maintien des JNV à partir de P10 3) d'étudier le rôle du récepteur adrénergique α_1 dans la mise en place de JNV fonctionnelles, notamment sur la base de ce qui a été mis en évidence pour la JNM chez la Souris (Strochlic *et al.*, 2012) ; 4) de déterminer si les défauts d'innervation observés suite à l'inactivation de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 à P2 étaient limités au développement, ou bien perduraient à l'âge adulte.

5.1 Étude de la structure des JNV

La mise au point de marqueurs synaptiques spécifiques des JNV s'étant avérée plus difficile que prévue, la visualisation de la structure des JNV en microscopie non électronique s'est révélée impossible et semble compromise. Cependant, les vues réalisées par notre laboratoire à partir d'artères de souris WT et de souris *Net^{+/-}* montrent que l'espace synaptique semblait de taille compatible avec celle indiquée par Burnstock. Contrairement à ce qui avait été décrit par Burnstock, les JNV semblaient en revanche présenter une densité postsynaptique, ce qui laisse supposer l'existence d'une spécialisation postsynaptique. Ces images n'ont pas permis de statuer sur l'existence de varicosités, ni sur le caractère « en passant » de ces jonctions. Les immunomarquages sur coupe et sur tissu entier n'ont pas encore permis de préciser la structure des JNV. Les films réalisés en vidéomicroscopie à partir de co-cultures de cellules musculaires lisses et de neurones orthosympathiques et les immunomarquages réalisés ensuite ont semblé confirmer l'existence de ces varicosités. Une investigation approfondie demeure néanmoins nécessaire afin de valider la présence de ces varicosités à plus grande échelle, et de déterminer si la libération de neurotransmetteur ne se fait qu'au niveau des varicosités ou non. Les vidéos des co-cultures de cellules musculaires lisses et de neurones orthosympathiques ont montré que les contacts établis entre les neurones et les cellules musculaires n'étaient pas constants au cours du temps : selon les cas, les cônes de croissance ou les cellules musculaires lisses se rétractaient. Ces résultats semblaient corroborer l'hypothèse de Burnstock selon laquelle les JNV seraient des synapses transitoires. Néanmoins, ces résultats semi-quantitatifs nécessitent d'être approfondis pour obtenir des quantifications plus objectives et plus systématiques et déterminer *in vivo* la conséquence de la rétraction de certaines cellules musculaires lisses observée *in vitro* et enfin confirmer le caractère

transitoire des JNV. En effet, ce qui a été observé *in vitro* lors de la mise en place *de novo* de nouvelles JNV peut ne pas préfigurer de leur comportement une fois qu'elles sont établies.

5.2 Etude de la répartition des JNV à l'échelle de l'organisme

Les marqueurs utilisés pour étudier la répartition des JNV à l'échelle de l'artère n'étant pas satisfaisants, l'utilisation de nouveaux marqueurs est en cours de développement. Notamment, l'anticorps anti-NCAM que nous utilisons est un anticorps « pan-NCAM » alors qu'il en existe trois isoformes dans le système nerveux : NCAM 140, NCAM 180 et NCAM 120. NCAM 140 est exprimée dans les cônes de croissance des neurones en migration et NCAM180 est présente dans les densités postsynaptiques des neurones matures (Dallérac *et al.*, 2013b ; Jørgensen, 1995; Maness et Schachner, 2007). En utilisant un anticorps spécifique de chacune de ces isoformes, nous pourrions étudier la répartition dans notre système et utiliser NCAM180 comme marqueur des JNV sur tissu entier. Un autre candidat pour marquer les JNV sur tissu entier est la lamellipodine. Cette molécule est impliquée dans la croissance des axones (Stavoe et Colon-Ramos, 2012) et il a été montré chez *C. elegans* qu'elle se localise en région présynaptique des neurones AIY (interneurones cholinergiques impliqués dans de nombreuses fonctions végétatives et dans la locomotion chez *C. elegans*) en réponse à la Nétrine-1. L'étude de cette molécule nous permettrait indéniablement d'approfondir notre connaissance des mécanismes mis en jeu lors de l'établissement des JNV. L'optimisation des immunomarquages pour cette molécules est en cours.

5.3 Rôle de la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 dans la mise en place des JNV à partir de P10

Les immunomarquages réalisés sur des coupes d'artères mésentériques ont confirmé nos hypothèses : le couple Éphrine-A4/EphA4 semblait jouer un rôle inhibiteur sur la mise en place des JNV et la Nétrine-1 un rôle promoteur de la mise en place des JNV. Plus précisément, les résultats obtenus à partir des co-cultures de cellules musculaires lisses vasculaires et de neurones orthosympathiques suggèrent que la signalisation Éphrine-A4/EphA4 pourrait jouer un rôle inhibiteur direct de la mise en place des JNV. Les co-cultures seront poursuivies après avoir déterminé si la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4 sont exprimées dans les mêmes cellules musculaires lisses vasculaires ou dans des cellules musculaires lisses vasculaires différentes et comment cette expression influe sur la mise en place des JNV. En effet, on peut imaginer que l'emplacement d'une JNV puisse être déterminé le long de l'artère par certaines cellules exprimant des balises de signalisation positives comme la Nétrine-1, et d'autres négatives comme l'Éphrine-A4. Dans les deux cas, mais plus particulièrement si les deux molécules peuvent être exprimées par la même cellule musculaire lisse vasculaire, observe-t-on une expression successive des deux molécules ? On

peut également imaginer que l'expression la Nétrine-1 et de l'Éphrine-A4 puisse alterner sur des périodes plus ou moins longues, ce qui pourrait expliquer le caractère transitoire précédemment décrit par Burnstock. Des doubles marquages sur cellules, sur coupes et sur tissu entier permettraient de répondre à ces questions.

5.4 Rôle du récepteur adrénérique α_1 dans la mise en place des JNV

Les expériences préliminaires réalisées par notre laboratoire visant à tester la capacité de vasoconstriction chez des souris *Net^{+/-}* et chez des souris WT ont montré que la perte d'innervation artérielle induite par la délétion de la Nétrine-1 s'accompagne d'une perte fonctionnelle de vasoconstriction. Cette dernière serait possiblement due à un défaut de signalisation adrénérique α_1 , ce qui est en faveur de l'implication de celui-ci dans la mise en place de JNV fonctionnelles.

Par ailleurs, les JNV constituant le point de contact entre un neurone et une cellule non nerveuse, la cellule musculaire lisse, elles présentent un point commun avec les jonctions neuromusculaires. En ce qui concerne les jonctions neuromusculaires, il a été montré que l'agrégation des récepteurs cholinergiques joue un rôle dans leur mise en place, leur maintien et leur fonctionnalité (Strochlic *et al.*, 2012). Le récepteur adrénérique α_1 , qui est le récepteur du neurotransmetteur des neurones orthosympathiques, la noradrénaline, pourrait jouer un rôle similaire pour les JNV. Et c'est ce que nous avons testé en réalisant des immunomarquages anti-récepteur adrénérique α_1 . Sur cellule, ces marquages montraient que les récepteurs adrénériques α_1 semblaient se localiser en regard du noyau. Cette répartition ne semblait pas modifiée de façon majeure lorsqu'un contact était établi entre un neurone orthosympathique et une cellule musculaire lisse vasculaire. Sur coupe et sur tissu entier, le marquage anti-récepteur adrénérique α_1 ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence de répartition des récepteurs adrénériques α_1 entre les cellules musculaires lisses vasculaires ayant établi une synapse avec un neurone orthosympathique et les autres. L'optimisation de cet immunomarquage est à l'étude. De plus, nous envisageons de réaliser des marquages anti-récepteur adrénérique α_1 avant, pendant et après la mise en place des JNV (P8, P10 et P15) afin d'identifier une éventuelle « préagrégation » des récepteurs adrénériques α_1 avant la mise en place des JNV et le cas échéant, observer comment cette répartition évolue après la mise en place des JNV. Nous mettons également au point une méthode nous permettant de suivre les récepteurs adrénériques α_1 en vidéomicroscopie, afin de pouvoir étudier sa localisation dynamique dans les co-cultures de neurones orthosympathiques et de cellules musculaires lisses vasculaires. À l'heure actuelle, aucune donnée concernant la répartition des récepteurs adrénériques α_1 au cours de la mise en place des JNV n'est disponible dans la littérature. Il apparaît néanmoins que la visualisation d'agrégats de récepteurs à une échelle aussi réduite ne puisse se faire en immunofluorescence et

nécessiterait l'utilisation de microscopie à super-résolution et de microscopie électronique. Néanmoins, les techniques de marquage en microscopie électronique ne permettant pas de quantifier un niveau de protéines, une équipe a proposé une solution innovante : la microscopie par localisation photo-activée (Photoactivated Localization Microscopy en anglais, soit PALM) (Scarselli *et al.*, 2012). Cette technique est basée sur la photo-activation de protéines photo-activables et elle est particulièrement pertinente pour l'étude des récepteurs membranaires (Scarselli *et al.*, 2012). Cette équipe a étudié l'agrégation des récepteurs adrénergiques β_2 . Leurs résultats montrent que ces récepteurs sont partiellement préassemblés en agrégats dans des cardiomyocytes en culture à l'état basal. Il serait intéressant de pouvoir utiliser cette technique dans notre système. En effet, si des récepteurs adrénergiques non impliqués dans des synapses sont partiellement préassemblés en agrégats à l'état basal, cela renforce l'idée que les récepteurs adrénergiques auxquels nous nous intéressons puissent être également préassemblés, et peut-être dans une plus forte proportion, étant donné qu'ils sont impliqués dans la mise en place de synapses.

5.5 Interaction entre le couple Éphrine-A4 / EphA4 et la répartition des récepteurs adrénergiques α_1

Dans certains cas, des récepteurs adrénergiques α_1 semblaient migrer au contact du neurone lorsque celui-ci contactait la cellule musculaire lisse vasculaire. Sur les images réalisées à partir des co-cultures de neurones orthosympathiques et de cellules musculaires lisses vasculaires, cette relocalisation de certains récepteurs adrénergiques α_1 semblait être intervenue plus souvent lorsqu'il s'agissait de co-cultures entre neurones *EphA4*^{-/-} et cellules musculaires lisses vasculaires que lorsqu'il s'agissait de co-cultures neurones WT et cellules musculaires lisses vasculaires. Ces résultats préliminaires, qui suggèrent une interaction entre la signalisation Éphrine-A4 / EphA4 et la répartition des récepteurs adrénergiques α_1 , devront être reproduits à plus grande échelle et quantifiés.

5.6 Interactions entre d'autres molécules d'intérêt et la répartition des récepteurs adrénergiques

Des résultats similaires ont été obtenus avec les marquages anti-NCAM. Ces résultats suggèrent également une influence de NCAM sur la répartition des récepteurs adrénergiques α_1 . Ces résultats encore purement qualitatifs demandent eux aussi à être reproduits et quantifiés pour pouvoir valider ou infirmer cette hypothèse. Il serait également intéressant de déterminer si la Nétrine-1 interagit elle aussi avec les récepteurs adrénergiques α_1 et la NCAM. En effet, on pourrait imaginer une action indépendante de l'Éphrine-A4, de la Nétrine-1 et de la NCAM sur la répartition des

récepteurs adrénergiques. À l'inverse, on peut supposer une action synergique de ces trois molécules sur la répartition des récepteurs adrénergiques. Enfin, on pourrait imaginer que la Nétrine-1 interagisse avec la NCAM, et que cette dernière influence ensuite la répartition des récepteurs adrénergiques. Colón-Ramos et son équipe ont montré chez *C. elegans* que la Nétrine-1 induit, via une cascade d'activation, le regroupement de vésicules présynaptiques (Stavoe et Colón-Ramos, 2012). Dans cette cascade d'activation sont impliqués le facteur d'échange de nucléotides CED-5, la GTPase CED-10 et la protéine MIG-10. En comparant ce système avec celui que nous étudions, ce résultat pourrait être en faveur de l'hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 pourrait induire une aggrégation de récepteurs adrénergiques α_1 . On peut également émettre l'hypothèse que la Nétrine-1 agit de façon similaire à ce qui a été démontré chez *C. elegans* et qu'elle induit le préassemblage de vésicules présynaptiques dans les neurones orthosympathiques, via une cascade d'activation impliquant la lamellipodine, qui est l'analogue de MIG-10 chez la Souris.

Pour étudier plus précisément la structure et la physiologie des JNV et notamment la répartition et les interactions entre les différentes molécules jonctionnelles, nous prévoyons de les étudier en microscopie électronique à transmission et à balayage ainsi que de marquer nos molécules d'intérêt avec des atomes de métal.

5.7 Conservation à l'âge adulte des phénotypes observés à P2

Les immunomarquages réalisés sur les artères auriculaires cutanées ont confirmé les données préliminaires obtenues par le laboratoire : la Nétrine-1 avait un rôle d'attraction pour les fibres nerveuses tandis que le couple Éphrine-A4/EphA4 avait un rôle répulsif. Ces immunomarquages ont été réalisés sur des animaux à P30 et ont démontré que les phénotypes observés à P2 et P3 perduraient à l'âge adulte.

Les gain et défaut d'innervation observés respectivement chez nos mutants ne sont donc pas des phénomènes limités au développement et pourraient avoir un impact sur la régulation de la pression artérielle systémique à l'âge adulte. Nous développons actuellement des outils permettant d'inactiver génétiquement la Nétrine-1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires et le récepteur EphA4 spécifiquement dans les axones orthosympathiques, et ce de manière constitutive ou inductible. Ces différents mutants nous permettront d'inactiver nos deux couples ligand-récepteur d'intérêt lors de la mise en place de l'innervation artérielle (à P2), avant la mise en place des JNV (à P10) et à l'âge adulte afin de vérifier si l'inactivation postdéveloppementale entraîne les mêmes phénotypes que ceux observés chez les mutants constitutifs. Nous serons également en mesure d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ces

phénotypes et notamment leur impact sur la régulation de la pression artérielle systémique par doppler et télémétrie cardiovasculaire.

La quantification du niveau d'innervation sur tissu entier a révélé également que les individus *Net^{+/-}; EphA4^{+/-}* présentaient un niveau d'innervation artérielle similaire à celui des individus WT ce qui est à première vue contre-intuitif. En effet, la Nétrine-1 est une molécule attractive agissant par diffusion tandis que le couple Éphrine-A4 / EphA4 comprend des molécules répulsives de contact. Nous supposons que nos souris *Net^{+/-}; EphA4^{+/-}* étant partiellement dépourvues de Nétrine-1 et ne bénéficiant pas de l'attraction nécessaire pour que les fibres contactent les artères, présenteraient un phénotype similaire à celui des souris *Net^{+/-}*. Ce résultat doit être nuancé par le fait que nous n'avons pu comparer nos 3 individus *Net^{+/-}; EphA4^{+/-}* qu'à un seul individu WT et un seul individu KO issus de la même portée, ce qui nuit bien évidemment à la puissance statistique de nos données. Ces quantifications seront donc étendues à un plus grand nombre d'individus afin de confirmer ces résultats.

CONCLUSION

Les JNV des artères de petits calibres sont des synapses particulières, établies entre un neurone et des cellules musculaires lisses. L'espace synaptique est supérieur à celui observé pour une synapse établie entre deux neurones : il mesure entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres suivant le diamètre de l'artère (Burnstock, 2008). Il semble que, comme l'avait décrit Burnstock, les neurones ne forment pas de bouton synaptique terminal unique, mais plutôt de nombreuses varicosités le long de leur axone, leur permettant ainsi de communiquer avec un grand nombre de cellules musculaires lisses à la fois, ce qui favoriserait l'efficacité de la vasoconstriction.

Nous avons montré que la Nétrine-1 et l'Éphrine-A4, en plus de leur implication dans la mise en place de l'innervation artérielle à P2, jouent un rôle dans le maintien de cette innervation à l'âge adulte et semblent impliquées dans la mise en place des JNV, notamment en interagissant avec la répartition des récepteurs adrénergiques α_1 .

Les souris présentant une perte d'innervation suite à l'inactivation génétique partielle de la Nétrine-1 se trouvent incapables de contracter efficacement leurs artères en situation de stress, et ce, malgré des cellules musculaires lisses capables de se contracter normalement. Les défauts d'innervation artérielle ont donc des conséquences fonctionnelles importantes.

L'hypertension artérielle systémique est une affection dont la prévalence augmente, avec un pourcentage non négligeable de patients résistant aux traitements pharmacologiques (Coffman, 2011). Des essais cliniques de dénervation orthosympathique de l'artère rénale sont actuellement à l'étude et présentent des résultats encourageants (Bhatt *et al.*, 2014 Pathak *et al.*, 2012), ce qui confirme l'hypothèse que l'hypertension résistant aux traitements pourrait avoir pour origine un défaut d'innervation artérielle. Nous avons au laboratoire des modèles de souris nous permettant d'obtenir des animaux avec des artères hypo- ou hyperinnervées, de façon constitutive ou inductible, qui permettraient de disséquer finement le rôle de l'innervation orthosympathique sur la fonction artérielle. L'utilisation de ces modèles dans la compréhension de l'impact de l'innervation des artères de résistance sur la pression artérielle et l'élucidation des mécanismes assurant son maintien à l'âge adulte pourraient permettre de déterminer le rôle de l'innervation orthosympathique artérielle dans des affections comme l'hypertension et de proposer d'autres voies de recherche thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- ALTMAN J.D., TRENDELENBURG A.U., MACMILLAN L., BERNSTEIN D., LIMBIRD L., STARKE K., *et al.* Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.*, 1999. **56**, n° 1, 154–161.
- BACHMAN E.S., DHILLON H., ZHANG C.-Y., CINTI S., BIANCO A.C., KOBILKA B.K., *et al.* β AR Signaling Required for Diet-Induced Thermogenesis and Obesity Resistance. *Science*, 2002. **297**, n° 5582, 843–845.
- BALTIMORE D., LODISH H., BERK A., ZIPURSKY L., MATSUDAIRA P. et DARNELL J. *Molecular Cell Biology*. 4e ed., W H Freeman & Co, 2000. 1150 pages.
- BHATT D.L., KANDZARI D.E., O'NEILL W.W., D'AGOSTINO R., FLACK J.M., KATZEN B.T., *et al.* A controlled trial of renal denervation for resistant hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 2014. **370**, n° 15, 1393–1401.
- BLOM H.J., SHAW G.M., DEN HEIJER M. et FINNELL R.H. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. **7**, n° 9, 724–731.
- BODEN G., CHEN X., MOZZOLI M. et RYAN I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996. **81**, n° 9, 3419–3423.
- BREDE M., NAGY G., PHILIPP M., SORENSEN J.B., LOHSE M.J. et HEIN L. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Mol. Endocrinol.*, 2003. **17**, n° 8, 1640–1646.
- BREDE M., PHILIPP M., KNAUS A., MUTHIG V. et HEIN L. α 2-Adrenergic Receptor Subtypes — Novel Functions Uncovered in Gene-Targeted Mouse Models. *Biol. Cell*. 2004. **96**, n° 5, 343–348.
- BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974. **77**, n° 1, 71–94.
- BRUNET I., GORDON E., HAN J., CRISTOFARO B., BROQUERES-YOU D., LIU C., *et al.* Netrin-1 controls sympathetic arterial innervation. *J. Clin. Invest.* 2014. **124**, n° 7, 3230–3240.
- BURNSTOCK G. Non-synaptic transmission at autonomic neuroeffector junctions. *Neurochem. Int.*, 2008. **52**, n° 1-2, 14–25.
- BYLUND D.B., EIKENBERG D.C., HIEBLE J.P., LANGER S.Z., LEFKOWITZ R.J., MINNEMAN K.P., *et al.* International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, 1994. **46**, n° 2, 121–136.
- CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, 2003. **9**, n° 6, 653–660.
- CARMELIET P. et TESSIER-LAVIGNE M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring.

Nature. 2005. **436**, n° 7048, 193–200.

CAVALLI A., LATTION A.-L., HUMMLER E., NENNIGER M., PEDRAZZINI T., AUBERT J.-F., *et al.* Decreased blood pressure response in mice deficient of the α 1b-adrenergic receptor. *PNAS*, 1997. **94**, n° 21, 11589–11594.

CHAN J.L., HEIST K., DEPAOLI A.M., VELDHUIS J.D. et MANTZOROS C.S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.*, 2003. **111**, n° 9, 1409–1421.

CHRUSCINSKI A., BREDE M.E., MEINEL L., LOHSE M.J., KOBILKA B.K. et HEIN L. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2001. **60**, n° 5, 955–962.

CHRUSCINSKI A.J., ROHRER D.K., SCHAUBLE E., DESAI K.H., BERNSTEIN D. et KOBILKA B.K. Targeted Disruption of the β 2 Adrenergic Receptor Gene. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**, n° 24, 16694–16700.

CLEARY L., VANDEPUTTE C. et DOCHERTY J.R. Investigation of neurotransmission in vas deferens from α 2A/D-adrenoceptor knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* 2002. **136**, n° 6, 857–864.

COFFMAN T.M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat. Med.*, 2011. **17**, n° 11, 1402–1409.

COLON-RAMOS D.A., MARGETA M.A. et SHEN K. Glia Promote Local Synaptogenesis Through UNC-6 (Netrin) Signaling in *C. elegans*. *Science*. 2007. **318**, n° 5847, 103–106.

DALLERAC G., RAMPON C. et DOYERE V. NCAM function in the adult brain: lessons from mimetic peptides and therapeutic potential. *Neurochem. Res.*, 2013a. **38**, n° 6, 1163–1173.

DALLERAC G., RAMPON C. et DOYERE V. NCAM function in the adult brain: lessons from mimetic peptides and therapeutic potential. *Neurochem. Res.*, 2013b. **38**, n° 6, 1163–1173.

DEVIC E., XIANG Y., GOULD D. et KOBILKA B. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.*, 2001. **60**, n° 3, 577–583.

DROUIN C., DARRACQ L., TROVERO F., BLANC G., GLOWINSKI J., COTECCHIA S., *et al.* Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J. Neurosci.*, 2002. **22**, n° 7, 2873–2884.

DUBOCOVICH M.L. et LANGER S.Z. Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors. *J. Physiol. (Lond.)*, 1974. **237**, n° 3, 505–519.

EICHMANN A. et BRUNET I. Arterial innervation in development and disease. *Sci Transl Med*,

2014. **6**, n° 252, 252ps9.

EICHMANN A. et PARDANAUD L. Ontogenèse vasculaire *In : L'angiogenèse*, John Libbey Eurotext, 2009. pp. 18–33

FOUCRIER J., FRANQUINET R. et VERVOORT M. *Atlas d'embryologie descriptive*. 2e ed., Dunod, 2003. 157 pages.

GILBERT S.F. *Biologie du Développement*. 4e édition., DeBoeck Université, Paris, Bruxelles, 1996.

GLEBOVA N.O. et GINTY D.D. Heterogeneous Requirement of NGF for Sympathetic Target Innervation In Vivo. *J. Neurosci.*, 2004. **24**, n° 3, 743–751.

GLEBOVA N.O. et GINTY D.D. Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2005. **28**, 191–222.

GONZALEZ-ALONSO J. Human thermoregulation and the cardiovascular system. *Exp Physiol*, 2012. **97**, n° 3, 340–346.

GUIMARÃES S. et MOURA D. Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**, n° 2, 319–356.

HEIN L., ALTMAN J.D. et KOBILKA B.K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*, 1999. **402**, n° 6758, 181–184.

JAMES J.M. et MUKOUYAMA Y. Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Sem. Cell Dev. Biol.* 2011. **22**, n° 9, 1019–1027.

JING L., LEFEBVRE J.L., GORDON L.R. et GRANATO M. Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron*, 2009. **61**, n° 5, 721–733.

JØRGENSEN O.S. Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem. Res.*, 1995. **20**, n° 5, 533–547.

KAMEI M., SAUNDERS W.B., BAYLESS K.J., DYE L., DAVIS G.E. et WEINSTEIN B.M. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*, 2006. **442**, n° 7101, 453–456.

KASPER C., RASMUSSEN H., KASTRUP J.S., IKEMIZU S., JONES E.Y., BEREZIN V., *et al.* Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat. Struct. Biol.*, 2000. **7**, n° 5, 389–393.

KIM N. et BURDEN S.J. MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nat. Neurosci.*, 2008. **11**, n° 1, 19–27.

KIM N., STIEGLER A.L., CAMERON T.O., HALLOCK P.T., GOMEZ A.M., HUANG J.H., *et al.* Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 2008. **135**, n° 2, 334–342.

KLEIN R. et KANIA A. Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2014. **27C**, 16–24.

- KULLANDER K., MATHER N.K., DIELLA F., DOTTORI M., BOYD A.W. et KLEIN R. Kinase-dependent and kinase-independent functions of EphA4 receptors in major axon tract formation in vivo. *Neuron*, 2001. **29**, n° 1, 73–84.
- LIN W., BURGESS R.W., DOMINGUEZ B., PFAFF S.L., SANES J.R. et LEE K.F. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, 2001. **410**, n° 6832, 1057–1064.
- LINK R.E., DESAI K., HEIN L., STEVENS M.E., CHRUSCINSKI A., BERNSTEIN D., et al. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*, 1996. **273**, n° 5276, 803–805.
- LUNDBORG G. The intrinsic vascularization of human peripheral nerves: structural and functional aspects. *J Hand Surg Am*, 1979. **4**, n° 1, 34–41.
- MACMILLAN L.B., HEIN L., SMITH M.S., PIASCIK M.T. et LIMBIRD L.E. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science*, 1996. **273**, n° 5276, 801–803.
- MANESS P.F. et SCHACHNER M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, 2007. **10**, n° 1, 19–26.
- MARTIN P. et LEWIS J. Origins of the neurovascular bundle: interactions between developing nerves and blood vessels in embryonic chick skin. *Int. J. Dev. Biol.*, 1989. **33**, n° 3, 379–387.
- MESCHER A.L. *Junqueira's Basic Histology : Text and Atlas*. 13e édition., McGraw-Hill Medical, 2013. 480 pages.
- MUKOUYAMA Y., SHIN D., BRITSCH S., TANIGUCHI M. et ANDERSON D.J. Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin. *Cell*, 2002. **109**, n° 6, 693–705.
- MULLIGAN-KEHOE M.J. et SIMONS M. Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries. *Circulation*, 2014. **129**, n° 24, 2557–2566.
- NAM J., ONITSUKA I., HATCH J., UCHIDA Y., RAY S., HUANG S., et al. Coronary veins determine the pattern of sympathetic innervation in the developing heart. 2013. **140**, n° 7, 1475–1485.
- NYBROE O. et BOCK E. Structure and function of the neural cell adhesion molecules NCAM and L1. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990. **265**, 185–196.
- O'CONNELL T.D., ISHIZAKA S., NAKAMURA A., SWIGART P.M., RODRIGO M.C., SIMPSON G.L., et al. The α 1A/C- and α 1B-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J. Clin. Invest.* 2003. **111**, n° 11, pp. 1783–1791.
- PATHAK A., GIRERD X., AZIZI M., BENAMER H., HALIMI J.-M., LANTELME P., et al. Expert

consensus: renal denervation for the treatment of arterial hypertension. *Arch Cardiovasc Dis*, 2012. **105**, n° 6-7, 386–393.

PHILIPP M., BREDE M.E., HADAMEK K., GESSLER M., LOHSE M.J. et HEIN L. Placental α 2-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nat Genet*, 2002. **31**, n° 3, 311–315.

PHILIPP M., BREDE M. et HEIN L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002. **283**, n° 2, R287–295.

PHILIPP M. et HEIN L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 2004. **101**, n° 1, 65–74.

PIERCE K.L., PREMONT R.T. et LEFKOWITZ R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002. **3**, n° 9, 639–650.

PILOT-STORCK F. *Introduction à la physiologie*. Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, ENVA, 2013. 143 pages.

PLASTERK R.H.A. The year of the worm. *Bioessays*, 1999. **21**, n° 2, pp. 105–109.

REVELLI J.P., PREITNER F., SAMEC S., MUNIESA P., KUEHNE F., BOSS O., *et al.* Targeted gene disruption reveals a leptin-independent role for the mouse beta3-adrenoceptor in the regulation of body composition. *J. Clin. Invest.* 1997. **100**, n° 5, pp. 1098–1106.

REYES-GOMEZ E. *Cours Cardiovasculaire*. ENVA, 2014.

RICHARD D. et ORSAL D. *Neurophysiologie : Organisation et fonctionnement du système nerveux*. 3e ed., Dunod, 2007. 496 pages.

ROHRER D.K., DESAI K.H., JASPER J.R., STEVENS M.E., REGULA D.P., BARSH G.S., *et al.* Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *PNAS*, 1996. **93**, n° 14, 7375–7380.

ROHRER D.K., CHRUSCINSKI A., SCHAUBLE E.H., BERNSTEIN D. et KOBILKA B.K. Cardiovascular and Metabolic Alterations in Mice Lacking Both β 1- and β 2-Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**, n° 24, 16701–16708.

ROKOSH D.G. et SIMPSON P.C. Knockout of the α 1A/C-adrenergic receptor subtype: The α 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *PNAS*, 2002. **99**, n° 14, pp. 9474–9479.

ROSS M.H. et WOJCIECH P. *Ross' Histology : Text and Atlas*. 6e ed., LWW, 2010. 974 pages.

RUTISHAUSER U. et LANDMESSER L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.*, 1996. **19**, n° 10, pp. 422–427.

SANES J.R. et LICHTMAN J.W. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001. **2**, n° 11, 791–805.

SAWAMURA S., KINGERY W.S., DAVIES M.F., AGASHE G.S., CLARK J.D., KOBILKA B.K., *et al.* Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of [alpha]2B adrenoceptors. *J. Neurosci.*, 2000. **20**, n° 24, 9242–9251.

SCARSELLI M., ANNIBALE P. et RADENOVIC A. Cell Type-specific 2-Adrenergic Receptor Clusters Identified Using Photoactivated Localization Microscopy Are Not Lipid Raft Related, but Depend on Actin Cytoskeleton Integrity. *J. Biol. Chem.* 2012. **287**, n° 20, 16768–16780.

SCHEININ M., SALLINEN J. et HAAPALINNA A. Evaluation of the α_2C -adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target: Studies in transgenic mouse models. *Life Sciences*, 2001. **68**, n° 19–20, pp. 2277–2285.

SERAFINI T., COLAMARINO S.A., LEONARDO E.D., WANG H., BEDDINGTON R., SKARNES W.C., *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, 1996. **87**, n° 6, 1001–1014.

SHIGEI T., TSURU H., ISHIKAWA N. et YOSHIOKA K. Some embryological aspects of cholinergic innervation in the cardiovascular system--a close association with the subintestinal circulatory channel. *J. Pharmacol. Sci.*, 2010. **112**, n° 4, 383–396.

SIMPSON P.C., KARIYA K., KARNS L.R., LONG C.S. et KARLINER J.S. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth *In : Molecular Mechanisms of Cellular Growth*, Springer US, 1991. 35–43

SOROKA V., KOLKOVA K., KASTRUP J.S., DIEDERICHS K., BREED J., KISELYOV V.V., *et al.* Structure and Interactions of NCAM Ig1-2-3 Suggest a Novel Zipper Mechanism for Homophilic Adhesion. *Structure*, 2003. **11**, n° 10, 1291–1301.

SPRENG M., COTECCHIA S. et SCHENK F. A Behavioral Study of Alpha-1b Adrenergic Receptor Knockout Mice: Increased Reaction to Novelty and Selectively Reduced Learning Capacities. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2001. **75**, n° 2, 214–229.

STARKE K., MONTEL H., GAYK W. et MERKER R. Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1974. **285**, n° 2, 133–150.

STAVOE A.K.H. et COLON-RAMOS D.A. Netrin instructs synaptic vesicle clustering through Rac GTPase, MIG-10, and the actin cytoskeleton. 2012. **197**, n° 1, 75–88.

STAVOE A.K.H., NELSON J.C., MARTINEZ-VELAZQUEZ L.A., KLEIN M., SAMUEL A.D.T. et COLON-RAMOS D.A. Synaptic vesicle clustering requires a distinct MIG-10/Lamellipodin isoform and ABI-

- 1 downstream from Netrin. *Genes Dev.* 2012. **26**, n° 19, 2206–2221.
- STAVOE A.K.H. et COLON-RAMOS D.A. Netrin instructs synaptic vesicle clustering through Rac GTPase, MIG-10, and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, 2012.. **197**, n° 1, 75–88.
- STROCHLIC L., CARTAUD A. et CARTAUD J. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: new partners, new functions. *Bioessays*, 2005. **27**, n° 11, 1129–1135.
- STROCHLIC L., FALK J., GOILLOT E., SIGOILLOT S., BOURGEOIS F., DELERS P., *et al.* Wnt4 Participates in the Formation of Vertebrate Neuromuscular Junction. *PLOS ONE*. 2012. **7**, n° 1.
- SUSULIC V.S., FREDERICH R.C., LAWITTS J., TOZZO E., KAHN B.B., HARPER M.E., *et al.* Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1995. **270**, n° 49, pp. 29483–29492.
- TANOUE A., KOKA M., MIYAWAKI S., KOSHIMIZU T., HOSODA C., OSHIKAWA S., *et al.* Role of the α 1D-Adrenergic Receptor in the Development of Salt-Induced. *Hypertension*, 2002. **40**, n° 1, 101–106.
- TANOUE A., KOSHIMIZU T. et TSUJIMOTO G. Transgenic studies of α 1-adrenergic receptor subtype function. *Life Sciences*, 2002. **71**, n° 19, pp. 2207–2215.
- TANOUE A., NASA Y., KOSHIMIZU T., SHINOURA H., OSHIKAWA S., KAWAI T., *et al.* The α 1D-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J. Clin. Invest.* 2002. **109**, n° 6, 765–775.
- TIRET L. *Physiologie des grandes fonctions : La Circulation*. Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, EnvA, 2013. 186 pages.
- TODA N. et OKAMURA T. Recent advances in research on nitrenergic nerve-mediated vasodilatation. *Pflugers Arch.*, 2014.
- TRENDELENBURG A.-U., HEIN L., GAISER E.G. et STARKE K. Occurrence, pharmacology and function of presynaptic α 2-autoreceptors in α 2 A/D-adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1999. **360**, n° 5, 540–551.
- TRENDELENBURG A.-U., SUTEJ I., WAHL C.A., MOLDERINGS G.J., RUMP L.C. et STARKE K. A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic α 2-autoreceptors: rat vena cava, rat atria, human kidney and guinea-pig urethra. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1997. **356**, n° 6, 721–737.
- TRENDELENBURG A.-U., KLEBROFF W., HEIN L. et STARKE K. A study of presynaptic α 2-autoreceptors in α 2A/D-, α 2B- and α 2C-adrenoceptor-deficient mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 2001. **364**, n° 2, 117–130.
- TURNBULL L., MCCLOSKEY D.T., O'CONNELL T.D., SIMPSON P.C. et BAKER A.J. Alpha 1-

adrenergic receptor responses in alpha 1A-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003. **284**, n° 4, H1104–1109.

TUTEJA N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav*, 2009. **4**, n° 10, 942–947.

VALTORTA F., PENNUTO M., BONANOMI D. et BENFENATI F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 2004. **26**, n° 4, 445–453.

WALMOD P.S., KOLKOVA K., BEREZIN V. et BOCK E. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem. Res.*, 2004. **29**, n° 11, 2015–2035.

WOLPERT L., JESSELL T.M., LAWRENCE P., MEYEROWITZ E., ROBERTSON E. et SMITH J. *Principles of Development*. Third edition., Oxford University Press, Oxford, 2007.

YANG X., ARBER S., WILLIAM C., LI L., TANABE Y., JESSELL T.M., *et al.* Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron*, 2001. **30**, n° 2, 399–410.

ZUSCIK M.J., SANDS S., ROSS S.A., WAUGH D.J., GAIVIN R.J., MORILAK D., *et al.* Overexpression of the alpha1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nat. Med.*, 2000. **6**, n° 12, 1388–1394.

COMMENT LES JONCTIONS NEUROVASCULAIRES SE METTENT-ELLES EN PLACE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT CHEZ LA SOURIS ?

SIMONNET Émilie

Résumé

Les artères de petit calibre sont innervées par des neurones post-ganglionnaires orthosympathiques. Cette innervation contrôle la vasomotricité et participe au maintien de la pression artérielle. Elle se met en place progressivement à partir du 2^e jour de développement post-natal chez la Souris. À partir du 10^e jour, les premiers contacts fonctionnels entre les nerfs et les cellules musculaires lisses vasculaires de la paroi des artères, appelés jonctions neurovasculaires, se mettent en place.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le cadre d'un stage de Master 2 dans l'équipe d'Isabelle Brunet, au Collège de France. Il visait à élucider les mécanismes permettant la mise en place des jonctions neurovasculaires au bon endroit et au bon moment au cours du développement chez la souris. Notre laboratoire a en effet mis en évidence que la Nétrine-1, molécule diffusible produite par les cellules musculaires lisses vasculaires joue un rôle d'attraction sur les fibres orthosympathiques à partir du 2^e jour de développement post-natal tandis que l'Éphrine-A4 exerce une répulsion par contact. Au cours de mon stage de Master 2, j'ai étudié la structure, l'organisation et la mise en place des jonctions neurovasculaires. J'ai réalisé des immunomarquages qui ont révélé la présence de synaptophysine au niveau de ces jonctions et la présence de *Neural Cell Adhesion Molecule* dans les nerfs orthosympathiques innervant les artères. Mon travail a également permis de mettre en évidence l'implication de la Nétrine-1 et du couple ÉphrineA4/EphA4 dans le maintien de l'innervation artérielle chez l'adulte. Ces résultats suggèrent que ces molécules participent très vraisemblablement à la mise en place des jonctions neurovasculaires à partir du 10^e jour de développement post-natal.

Au-delà de son intérêt fondamental en biologie du développement, la connaissance fine de la mise en place de l'innervation artérielle pourrait améliorer la compréhension d'affections comme l'hypertension artérielle et favoriser la recherche de nouvelles voies thérapeutiques.

Mots clés

**NEUROLOGIE / PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE / INNERVATION / ARTÈRE /
SYSTÈME NERVEUX PÉRIPHÉRIQUE / SYSTÈME NERVEUX
ORTHOSYMPATHIQUE / SYNAPSE / ANGIOGENÈSE / SYNAPTOGENÈSE /
DÉVELOPPEMENT / RONGEUR / SOURIS**

Jury :

Président : Pr

Directeur : Dr Fanny Pilot-Storck

Assesseur : Dr Marie Abitbol

Invité : Pr Laurent Tiret

Invité : Dr Isabelle Brunet

HOW DO NEUROVASCULAR JUNCTIONS FORM DURING DEVELOPMENT IN MICE ?

SIMONNET Émilie

Summary

Post-ganglionic orthosympathetic neurons innervate small arteries. This innervation controls the vasomotricity and participates to arterial pressure regulation. It starts at the 2nd post-natal day in mouse and from the 10th post-natal day, the neurovascular junctions settle. These junctions constitute the functional contacts between orthosympathetic neurons and vascular smooth muscle cells.

The work presented in this thesis has been realized during a Master 2 internship in the laboratory of Isabelle Brunet at Collège de France. Its aim was to elucidate the mechanisms allowing the neurovascular junctions settlement at the right place and at the right time during development in mouse. Netrin-1 is a diffusible molecule secreted by vascular smooth muscle cells that was demonstrated by our laboratory to be attractant for orthosympathetic fibers since the 2nd post-natal day. On the contrary, Ephrin-A4 is a transmembrane molecule that was demonstrated to mediate repulsion by contact. During my Master 2 internship, I studied the structure, the organization and the settlement of the neurovascular junctions. Immunostainings revealed that Synaptophysin was present in the neurovascular junctions and that the Neural Cell Adhesion Molecule was present in the orthosympathetic nerves innervating arteries. My work further showed that Netrin-1 and Ephrin-A4/EphA4 were also involved in the maintenance of arterial innervation in adulthood. Moreover, these results suggest that Netrin-1 and Ephrin-A4 are likely involved in the settlement of the neurovascular junctions from the 10th post-natal day.

Precise understanding of arterial innervation would undoubtedly improve our comprehension of its role in cardiovascular affections such as systemic hypertension and help to discover new therapeutic opportunities.

Keywords

**NEUROLOGY/CARDIOVASCULAR PHYSIOLOGY/INNERVATION/ARTERY/
PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM/ORTHOSYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM/
/SYNAPSE/ANGIOGENESIS/SYNAPTOGENESIS/DEVELOPMENT/RODENT/MOUSE**

Jury :

President : Pr.

Director : Dr. Fanny Pilot-Storck

Assessor : Dr. Marie Abitbol

Guest : Pr. Laurent Tiret

Guest : Dr. Isabelle Brunet