



UFR PHARMACIE



Université Montpellier 1

UNIVERSITE CONSTANTINE 1

UNIVERSITE MONTPELLIER 1

THESE

pour obtenir le grade de DOCTEUR 3^{ème} cycle LMD

Discipline : Biochimie et Biotechnologie (UC1)
Biologie et santé (UM1)

N° de série :

N° d'ordre :

Ecoles Doctorales : Biochimie et biotechnologies, Constantine, Algérie.

Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2), Montpellier, France.

Présentée et soutenue publiquement par

MARIR Rafik

Le 19 septembre 2013

Caractérisation d'outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs centraux de la vasopressine

JURY

Président de jury :	BOUSSEBOUA H.	<i>Professeur à l'université Constantine1, Algérie.</i>
Directeur de thèse :	MERAIHI Z.	<i>Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.</i>
Co-directeur de thèse :	GUILLON G.	<i>Directeur de recherche CNRS Montpellier, France.</i>
Examineurs :	CHINI B.	<i>Professeur à l'université de Milan, Italie.</i>
	GUERINEAU N.	<i>Directeur de recherche Angers, France.</i>
	SAKA S.	<i>Professeur à l'université Badji M. de Annaba, Algérie.</i>

Année universitaire 2012/2013

Préambule

Jusqu'à longtemps il a été difficile de déterminer la constitution chimique des polypeptides, à cet édifice ou assemblage d'acides aminés qui peuvent contracter entre eux tant de combinaisons dont chacune possède une activité physiologique propre.

Or, pour acquérir la connaissance profonde d'un polypeptide, il faut reconstituer l'édifice, c'est à dire faire sa synthèse. Cette synthèse ne permet pas seulement de reconstituer le polypeptide naturel : elle donne encore la possibilité de construire des structures nouvelles, aux propriétés physiologiques voisines ou au contraires différentes.

Rien ne démontre mieux le double intérêt de cette synthèse que les travaux effectués jusqu'à présent sur la vasopressine et les analogues qui lui sont apparentés.

Le prix Nobel de chimie fut décerné en 1955 à Vincent du Vigneaud pour la synthèse des premières hormones polypeptidiques, vasopressine et ocytocine.

Vasopressine, une ancienne hormone aux nouvelles fonctions

Dès sa découverte, la vasopressine est apparue comme une hormone aux multiples fonctions, d'une part hormone antidiurétique régulant, la concentration physiologique, le bilan de l'eau, d'autre part, hormone vasopressive impliquée, à concentration supraphysiologique, dans la régulation de la volémie efficace. Elle s'est avérée être également une hormone hypophysiotrope modulant l'axe corticotrope et l'activité du système nerveux autonome. La vasopressine est maintenant aussi impliquée au centre d'actions comportementales insoupçonnées toutes médiées par les récepteurs centraux de la vasopressine. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

Le prix Nobel de chimie fut décerné en 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka pour leurs travaux sur les récepteurs couplés aux protéines G.

Connaitre ces récepteurs, c'est mieux savoir les utiliser

Les RCPG jouent donc un rôle clé dans les communications entre les milliards de cellules de notre corps mais aussi avec le monde extérieur. Pour la pharmacologie, ils constituent un enjeu considérable. Sven Lindin, membre du comité Nobel, affirme qu'environ la moitié des médicaments « reposent sur une action ciblant les RCPG ». En d'autres termes, mieux connaître ces récepteurs permet de créer des médicaments plus efficaces ou ayant moins d'effets secondaires. Percer les secrets de ces récepteurs, c'est tout le travail réalisé, depuis des années par les scientifiques,

Le prix Nobel de médecine fut décerné en 1994 à Alfred Gilman et Martin Rodbell pour leur découverte des protéines G et de leur rôle dans la transduction des signaux cellulaires.

L'image de la clé et de la serrure

On utilise fréquemment l'image de la clé et de la serrure pour expliquer comment une substance se couple sélectivement à un récepteur afin d'enclencher une cascade de réactions au sein de la cellule. Cette image reste approximative, dans la mesure où le récepteur n'est pas une structure figée, mais qu'il a une probabilité de se trouver dans une conformation ou dans une autre selon l'environnement dans lequel la cellule se trouve. C'est en fait toute une chaîne mouvante qu'il faut prendre en compte : le ligand, qui se lie au récepteur, qui lui-même modifie la conformation de la protéine G, ce qui engendre des réactions chimiques à l'intérieur de la cellule.

Cette thèse a permis de découvrir de nouveaux outils pharmacologiques pour mieux étudier les récepteurs V_{1A} et V_{1B} et dans sa partie bibliographique, se propose de résumer les connaissances actuelles autour de la vasopressine qui impliquent ces deux récepteurs centraux dans plusieurs processus comportementaux.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements au docteurs Joël Bockaert et Jean-Philippe Pin pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de génomique Fonctionnel (IGF) ainsi que le docteur Patrice Mollard pour son accueil dans le département d'endocrinologie.

J'exprime toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse Gilles Guillon qui a assuré le suivi scientifique de ce travail de thèse et a su me diriger avec son expérience et ses précieux conseils. Je lui témoigne toute ma gratitude pour sa disponibilité, ses encouragements et sa bonne humeur.

Je remercie également ma directrice de thèse madame Meraihi Zahia pour l'intérêt croissant qu'elle a su porter à mon travail. Qu'elle trouve en ce travail le témoignage de ma haute considération.

Je tiens à remercier le professeur Bousseboua Hacène pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'insigne honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma haute considération. Je remercie également les docteurs Bice Chini et Nathalie Guérineau d'avoir bien voulu être rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi que le professeur Saka Saad pour avoir accepté de juger ce travail. Je leur assure mon dévouement et mon profond respect.

Je tiens à remercier également tous ceux qui ont participé à ce travail Evelyne Galibert et Dominique Haddou, qu'ils trouvent en ce modeste travail toute ma reconnaissance, particulièrement Anne Virsolvy pour la bienveillante attention avec laquelle elle m'a reçu et ses précieux conseils. Je exprime ma profonde gratitude à Sylvain Richard et Michel Vigne pour leur participation à mon comité de thèse et pour leurs précieux conseils qui ont permis d'enrichir ce travail. Je remercie également les membres du département d'endocrinologie pour leurs aides et leurs conseils.

Je souhaite exprimer mes plus vifs remerciements à tous les membres de l'équipe « VSD », être parmi eux fut un vrai plaisir :

Merci à Maïthé Corbani, son attention, sa générosité scientifique et ses encouragements m'ont été précieux. Toujours disponible, son soutien inconditionnel m'a permis d'achever ce travail dans les meilleures conditions.

Merci à Michel G Desarmenien pour sa gentillesse et son honnêteté, travailler à ses côtés m'a appris énormément et fut un réel plaisir.

Merci à Magda Chafai, ma compatriote algérienne au sein de l'équipe VSD pour son humour sa joie de vivre et sa gaité. Les moments de discussions, de fou-rires partagés au « confessionnal » et par dessus tout son amitié resteront les biens les plus chers.

Merci à Julie Mion, ma colocataire de bureau et ma partenaire de thèse, sans qui, passer ces deux années à l'IGF m'aurait semblé nettement plus difficile. Sa gentillesse, sa présence, et son soutien m'ont été indispensable.

A Véra Boulay, toujours dynamique, son énergie sa volonté et sa gentillesse ont été d'une grande aide pour avancer au mieux dans mon travail, merci infiniment.

Mes remerciements s'adressent également à Aurélie, qui a apporté une touche d'humour et de légèreté à nos journées de travail intensifs et à Maxime, pour sa sympathie et son enthousiasme

Une pensée toute particulière à tous les membres de la « Dream-team » : Oualid, Driss, Elvira, Hala, Iulia, Candide, Abdelrazak, Christophe, Ronan, Mathilde, Sarah, Amandine, Salima, Salim, Mariana, Rita et Amélie.

Je remercie les stagiaires qui ont passé du temps au laboratoire et que j'ai eu plaisir à suivre. Je pense tout particulièrement à Chiara et à Sophie.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce modeste travail puisse être achevé.

SOMMAIRE

Index des figures	vii
Index des tableaux.....	viii
Abréviations	ix
Avant propos	10
Introduction.....	12
1. La vasopressine	13
1.1 Historique.....	13
1.2 Structure.....	15
1.3 Biosynthèse et métabolisme.....	15
1.4 Sécrétion au niveau central.....	17
1.5 Contrôle de la sécrétion au niveau hypophysaire.....	19
1.6 Sécrétion au niveau périphérique	25
2. L'ocytocine.....	26
2.1 Structure.....	26
2.2 Biosynthèse et métabolisme.....	27
2.3 Sécrétion	28
3. Les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine (VP/OT)	29
3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	29
3.2 Classification des récepteurs VP/OT	30
3.3 Structure des récepteurs VP/OT.....	31
3.4 Voies de signalisation des récepteurs VP/OT.....	39
3.5 Désensibilisation des RCPG et internalisation.....	46
4. Actions physiologiques et physiopathologiques de l'AVP et l'OT	48
4.1 Actions périphériques de l'AVP et de l'OT	48
4.2 Actions centrales de l'AVP et de l'OT	58
4.3 Balance fonctionnelle entre AVP et OT.....	68
5. Pharmacologie des récepteur VP/OT.....	69
5.1 Pharmacologie du récepteur V _{1A}	70
5.2 Pharmacologie du récepteur V _{1B}	71
5.3 Pharmacologie du récepteur V ₂	73
5.4 Pharmacologie du récepteur OT.....	74
5.5 Ligands fluorescents des récepteurs VP/OT	77
Objectif de travail.....	79

Méthodologies expérimentales	82
1. Ligands et synthèse chimique.....	83
1.1 Le FE 201874	83
1.2 Les d[Leu ⁴ ,Lys(Alexa) ⁸]VP	83
2. Culture cellulaire	84
2.1 Lignées cellulaires.....	84
2.2 Culture primaire	85
3. Etude des propriétés de liaison des récepteurs	86
3.1 Expériences de saturation de la liaison à l'équilibre	86
3.2 Expériences de déplacement ou de compétition	87
4. Etude des propriétés fonctionnelles des récepteurs <i>in vivo</i>	88
4.1 Voie de la phospholipase C (PLC)	89
4.2 Voie de l'adénylate cyclase (AC).....	90
4.3 Voie des MAP kinases et phosphorylation de ERK	92
5. Etude des propriétés fonctionnelles <i>ex vivo</i> des récepteurs.....	93
6. Etude de la prolifération cellulaire <i>in vivo</i>	95
7. Etudes sur le marquage et la localisation des récepteurs.....	97
7.1 Marquage en culture cellulaire hétérologue	98
7.2 Marquage en culture primaire de cellules hypophysaires	98
7.3 Marquage sur tranche de cerveau.....	98
7.4 Acquisition des images en microscopie	99
Résultats.....	101
Chapitre 1 : Caractérisation du premier agoniste sélectif du récepteur V _{1A} de la vasopressine	
1. Problématique	103
2. Publication et principaux résultats.....	104
3. Discussion.....	106
Chapitre 2 : Caractérisation d'agonistes fluorescents sélectifs en vue de la cartographie du récepteur V _{1B} chez le rat	
1. Problématique	108
2. Résultats	110
2.1 Propriétés de liaison des analogues 2, 3 et 9 pour les récepteurs VP/OT.....	110
2.2 Propriétés fonctionnelles des analogues fluorescents	113
2.3 Validation du marquage des ligands fluorescents	115
2.4 Marquage des récepteurs V _{1B} centraux sur coupe de cerveau de rat.....	120
2.5 Caractérisation fonctionnelle des récepteurs V _{1B} centraux sur coupes de cerveau de rat.....	122
3. Discussion	124
Discussions générales et perspectives	128
Références bibliographiques	134
Annexes A : Figures supplémentaires	158
Annexes B : Activité scientifique.....	161

INDEX DES FIGURES

Numéro

1. *Structure chimique et simplifiée de l'arginine vasopressine*
2. *Etapas de la biosynthèse de la vasopressine à partir du gène précurseur*
3. *Le système hypothalamo-hypophysaire*
4. *Contrôle de la sécrétion de la vasopressine par les neurotransmetteurs.*
5. *Représentation du mécanisme osmorégulateur de la sécrétion de vasopressine.*
6. *Comparaison des structures primaires de l'AVP (à droite) et de l'OT (à gauche)*
7. *Structure d'un modèle de RCPG*
8. *Alignement de séquences d'acides aminés des récepteurs de la famille VP/OT de l'humain et du rat*
9. *Schéma en collier de perle du récepteur V_{1A} humain*
10. *Schéma en collier de perle du récepteur V_{1B} humain*
11. *Schéma en collier de perle du récepteur V₂ humain*
12. *Schéma en collier de perle du récepteur OT humain*
13. *Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.*
14. *Mécanisme d'activation du récepteur V_{1A}*
15. *Mécanisme d'activation du récepteur V_{1B}*
16. *Mécanisme d'activation du récepteur V₂*
17. *Mécanisme d'activation du récepteur OT*
18. *Désensibilisation et signalisation d'un RCPG régulé par les GRK*
19. *Localisation et structure du néphron. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein.*
20. *Représentation d'une coupe histologique de surrénale*
21. *Mécanisme cellulaire d'action de la vasopressine dans une cellule principale du conduit collecteur du néphron*
22. *Les structures du cerveau associées aux comportements monogame et parental*
23. *principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V_{1A}*
24. *principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V_{1B}*
25. *principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V₂*
26. *principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur OT*
27. *Courbes de saturation*
28. *Représentation selon Scatchard*
29. *Courbe théorique d'expérience de déplacement*
30. *Courbe théorique d'expérience de mesure de second messenger*
31. *Activation de la voie phospholipase C*
32. *Activation de la voie adénylate cyclase*
33. *Activation de la voie MAP kinase*
34. *Régulation de la contraction/relaxation dans cellules musculaires lisses*
35. *Propriétés pharmacologiques des ligands fluorescents pour les récepteurs VP/OT de rat*
36. *Index de sélectivité de liaison des analogues fluorescents*
37. *Lignée de cellules AtT20 exprimant de façon stable le récepteur V_{1B} de rat*
38. *Sélectivité de marquage des récepteur V_{1B} et OT de rat*
39. *Visualisation des récepteurs V_{1B} sur des cellules d'antéhypophyse de rat en culture primaire*
40. *Distribution générale des récepteurs V_{1B} centraux*
41. *Détails de la distribution des récepteurs V_{1B} dans différentes zones du cerveau.*
42. *Marquage fonctionnel (MAP kinases) des récepteurs V_{1B}.*
43. *Ligands hautement sélectifs pour le récepteur V_{1A}*

INDEX DES TABLEAUX

Numéro

1. *Homologues structuraux de la vasopressine et de l'ocytocine.*
2. *Effets comportementaux de l'ocytocine.*
3. *Agonistes communs de la famille de récepteurs VP/OT.*
4. *Antagonistes de la vasopressine (statuts des essais cliniques en cours).*
5. *Applications thérapeutiques des antagonistes des récepteurs de la vasopressine.*
6. *Principaux ligand fluorescent des récepteurs de la vasopressine.*
7. *Propriétés de liaison des analogues fluorescents pour les récepteurs VP/OT de rat.*
8. *Propriétés fonctionnelles des analogues fluorescents pour les récepteurs VP/OT de rat.*

ABREVIATIONS

- AC.** Adénylyl cyclase
- ACTH.** Adrenocorticotropic hormone.
- AVP.** Arginine vasopressin.
- BrdU.** Bromo deoxy uridine.
- BSA.** Bovine serum albumin.
- CHO.** Chinese hamster ovary.
- d[Leu⁴,Lys⁸]VP.** 1 deamino-[4 leucine-8 lysine] vasopressine
- GHRH.** Growth hormone releasing
- HEK.** Human embryonic kidney.
- i.c.v.** Intracérébroventriculaire
- i.p.** Intrapéritoneal.
- IP₃.** Inositols triphosphates
- IPs.** Total inositol phosphates.
- Kact.** Activation constant for agonists.
- Kd.** Dissociation constant.
- Ki.** Inhibitory dissociation constant.
- Kin.** Knock-in
- Kinact.** Inactivation constant for antagonist.
- KO.** Knock-out
- LH.** Luteinizing hormone
- MAPK.** MAP kinase, Mitogen activating protein kinase
- ORF.** Open reading frame
- OT.** Oxytocin.
- PIP₂.** Phosphatidyl Inositol-4,5 biphosphate
- PLC.** Phospholipase C.
- RCPG.** Récepteur couplé aux protéines G
- RT-PCR.** Real time polymerase chain reaction
- SI.** Selectivity index.
- SNP.** Single Nucleotide Polymorphism
- VT.** Vasotocin

Avant propos

La vasopressine est une hormone impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Parmi elles, la régulation de la pression sanguine ou encore de l'homéostasie hydrique, sont toutes deux bien documentées depuis de nombreuses années. Le nombre d'études relatives à la description du rôle de la vasopressine dans les processus comportementaux est en constante augmentation. Ainsi, la découverte de nouveaux rôles pour cette ancienne hormone ouvre la voie à des perspectives très intéressantes quant au développement de nouveaux traitements pour de nombreuses pathologies comportementales, dont le stress et l'anxiété.

Les récepteurs centraux de la vasopressine V1a, V1b et OT de l'ocytocine, jouent un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions cognitives et comportementales. Les étudier permettrait de lever le voile sur leurs implications, leurs rôles et leurs distributions. Certaines études *in vivo* étant difficiles et délicates à effectuer chez l'homme, les scientifiques ont recours à l'utilisation de modèles animaux. Chez le rat, un modèle animal des plus utilisé en laboratoire, le manque d'outils sélectifs permettant d'étudier ces récepteurs se fait cruellement sentir. Jusqu'à récemment, les études effectuées dans ces domaines de recherche se basaient sur des outils qui manquaient d'affinité ou de sélectivité vis-à-vis des récepteurs d'intérêt.

A cet effet, le travail de thèse effectué a consisté à caractériser pharmacologiquement de nouveaux ligands afin de répondre aux besoins en agonistes sélectifs des récepteurs V1A et V1B.

L'introduction de ce manuscrit s'articule autour de cinq points reprenant l'état de l'art et résumant la majorité des connaissances actuelles sur la vasopressine et ses récepteurs :

- le premier point reprend toutes les données relatives à la synthèse et à la sécrétion de la vasopressine ;
- le second point s'intéresse à sa molécule sœur, l'ocytocine, et les compare sur le plan moléculaire et métabolique ;
- le troisième point s'intéresse aux cibles moléculaires de ces molécules : les récepteurs de la famille de la vasopressine et de l'ocytocine (VP/OT) ;

- le quatrième point quant à lui définit les actions physiologiques et physiopathologiques, centrales et périphériques, induites par la vasopressine et l'ocytocine par le biais de ses différents récepteurs ;
- enfin le cinquième et dernier point concerne la pharmacologie des récepteurs de la famille VP/OT qui reprend les principaux analogues moléculaires de l'AVP et l'OT présentant un intérêt pharmacologique ou thérapeutique, et pour certains fluorescents, un intérêt pour l'étude de la distribution des récepteurs de la famille VP/OT.

Ce manuscrit reprend la plupart des données liées à la vasopressine et ses récepteurs. En revanche, certaines parties seront centrées tout particulièrement autour des récepteurs V1A et V1B qui sont au centre des études de cette thèse.

INTRODUCTION

1. La vasopressine

1.1 Historique

Au tout début de 1890, un médecin britannique George Oliver, physiologiste autodidacte qui s'intéressait à la circulation sanguine, était parvenu à mesurer le diamètre des artères périphériques à l'aide d'un appareil de sa propre invention. Oliver décida de mesurer sur son propre fils l'effet d'une injection d'extrait de glandes surrénales de bœuf sur le diamètre de l'artère radiale. Impressionné par une diminution significative du diamètre de l'artère suite à l'injection, Oliver en référa à Edward Schäfer. D'abord sceptique, Schäfer consentit à mesurer cet effet sur la pression sanguine du chien. La montée hypertensive était éclatante. Oliver et Schäfer continuèrent de collaborer et étudièrent l'effet d'extraits de différentes autres glandes dont l'hypophyse sur la pression sanguine. C'est ainsi qu'ils découvrirent l'action hypertensive d'un facteur hypophysaire qui sera dénommé plus tard vasopressine.

Les décennies qui ont suivi cette découverte ont servi à la description des principaux effets physiologiques de ces extraits, parmi ces actions mis en évidence : l'activité ocytotique (Dale, 1906), l'éjection du lait (Ott et Scott, 1910) et l'activité antidiurétique (Von der Velden, 1913).

Dans les années 30, Scharrer a montré que certains neurones de l'hypothalamus sécrétaient des substances par exocytose de vésicules cytoplasmiques. À l'époque, cette observation souleva des discussions passionnées car les neurones apparaissaient alors voués à ne produire que des phénomènes électriques. Leur donner un rôle sécrétoire les rapprochant d'une cellule glandulaire bouleversait des données bien établies. Il fallut attendre la démonstration définitive de la production de neuromédiateurs variés par les terminaisons nerveuses et la découverte du transport intra-axonique pour banaliser l'idée de neurosécrétion. Plus tard, la neurosécrétion hypothalamique fut définitivement établie indiquant que la vasopressine et l'ocytocine synthétisée par les neurones des noyaux supra-optiques et paraventriculaire de l'hypothalamus ont été transportés par les axones de ces neurones dans le lobe postérieur de l'hypophyse

L'un des événements les plus importants dans le domaine des hormones neurohypophysaire fut l'élucidation de la structure chimique de l'arginine vasopressine en 1953 (Acher et Chauvet, 1953), de l'ocytocine (Du Vignaud et al., 1953; Tuppy, 1953) ainsi que la synthèse chimiques des deux peptides par la suite (Du Vignaud, 1954). A partir des années 50 les deux hormones, la vasopressine et l'ocytocine, ont fait l'objet de plusieurs études, chimiques et biologiques, qui ont abouti à une meilleure compréhension de leurs fonctions et leur mode

d'action, en grande partie grâce à l'élaboration d'outils pharmacologiques.

La production rapide d'un grand nombre d'analogues de la vasopressine et de l'ocytocine a conduit à d'importantes observations et des découvertes majeures :

- ✓ l'identification de l'arginine vasopressine comme hormone hypophysaire des vertébrés inférieurs (Sawyer et al., 1960).
- ✓ l'observation que les changements dans la structure de ces hormones hypophysaires pourraient affecter leurs actions antidiurétique et vasopresseur (Berde et al., 1964).
- ✓ la production d'antagonistes de la réponse vasopressive (Poláček et al., 1967).

Parallèlement aux études sur la structure et la synthèse de la vasopressine, la synthèse d'hormones radiomarquées a permis la découverte de leurs récepteurs spécifiques. C'est en 1959 que fut suggéré l'existence d'un récepteur rénale de la vasopressine (Fong et al., 1960). Dans cette étude, Fong et collaborateurs ont injecté de la lysine-vasopressine tritié chez le rat et ont récupéré la radioactivité liée dans les fractions particulières rénales.

L'évolution des techniques biochimique, électrophysiologique, de biologie moléculaire et cellulaire pour les 25 dernières années a considérablement élargi les connaissances du domaine de la vasopressine et de ses récepteurs. En un siècle, la vasopressine a évolué progressivement de son rôle historique de vasopresseur et d'hormone antidiurétique, vers un nouveau statut d'hormone pléiotrope impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions centrales et périphériques.

L'utilisation de fluorochromes en biologie moléculaire est un peu plus récente que celle d'isotopes radioactifs. En raison de la sensibilité accrue des microscopes à fluorescence et de la luminosité des fluorophores, l'étude de la localisation des récepteurs et leur trafic, est devenu un enjeu majeur. L'utilisation de ligands fluorescents sélectifs pour une famille de récepteurs ou pour un sous-type de récepteur donné est par conséquent très utile comme outil pharmacologique et de marquage.

Plus récemment, il est clairement démontré que l'AVP et l'OT sont les principaux régulateurs de fonctions cérébrales telles que la réponse au stress, l'affiliation, la mémoire et le comportement social (Caldwell et al., 2008)

Actuellement, il est clairement établi que l'arginine vasopressine (AVP) est synthétisée et sécrétée principalement par les neurones hypothalamiques des noyaux supra-optique et paraventriculaire. La vasopressine est également connue comme l'hormone antidiurétique (ADH), car elle est le principal régulateur du volume d'eau dans l'organisme chez la plupart des vertébrés. En outre la vasopressine est reconnue comme étant l'un des principaux régulateurs de l'activité de l'axe corticotrope par son importante influence sur la sécrétion d'ACTH.

1.2 Structure

L'arginine vasopressine (AVP) est un polypeptide cyclique comportant neuf acides aminés, dont une arginine qui occupe la position 8 qui apporte une charge positive à la molécule ainsi que deux groupements cystéine en position 1 et 6 qui sont reliés par un pont disulfure (Figure 1). L'AVP comporte également un groupement amide en position C terminal. Ce groupement amide est essentiel à l'activité physiologique de l'AVP tout comme son pont disulfure.

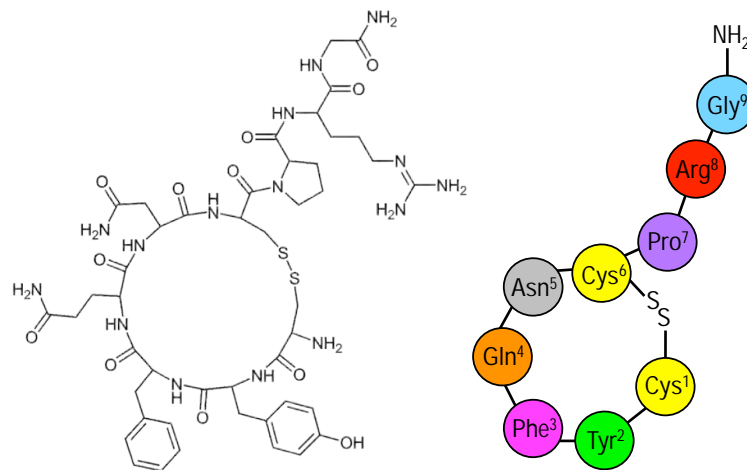


Figure 1 : Structure chimique et simplifiée de l'arginine vasopressine

L'AVP a son équivalent chez la plupart des espèces du règne animal, on peut citer la LVP ou lysine vasopressine chez le porc qui diffère de l'AVP par une lysine en position 8.

1.3 Biosynthèse et métabolisme

La vasopressine est une hormone synthétisée principalement par les neurones magnocellulaires des noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus. Les axones de ces neurones forment le lobe neurohypophysaire ou postérieur de l'hypophyse au niveau de laquelle elle est sécrétée. Elle est également synthétisée par les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire qui eux vont libérer la vasopressine au niveau de l'éminence médiane (pour revue Koshimizu et al., 2012)).

La vasopressine est codée par un gène au niveau du chromosome 20 chez l'homme et 3 chez le rat (Ivell et Richter, 1984). Ce gène comporte 2 introns et 3 exons (Figure 2). L'exon 1 code pour le peptide signal, l'AVP et la partie N-terminale de la neurophysine II, l'exon 2 code

pour la partie central de la neurophysine II et l'exon 3 code, quand à lui, pour la partie C terminale de la neurophysine II et une glycoprotéine, la copeptine.

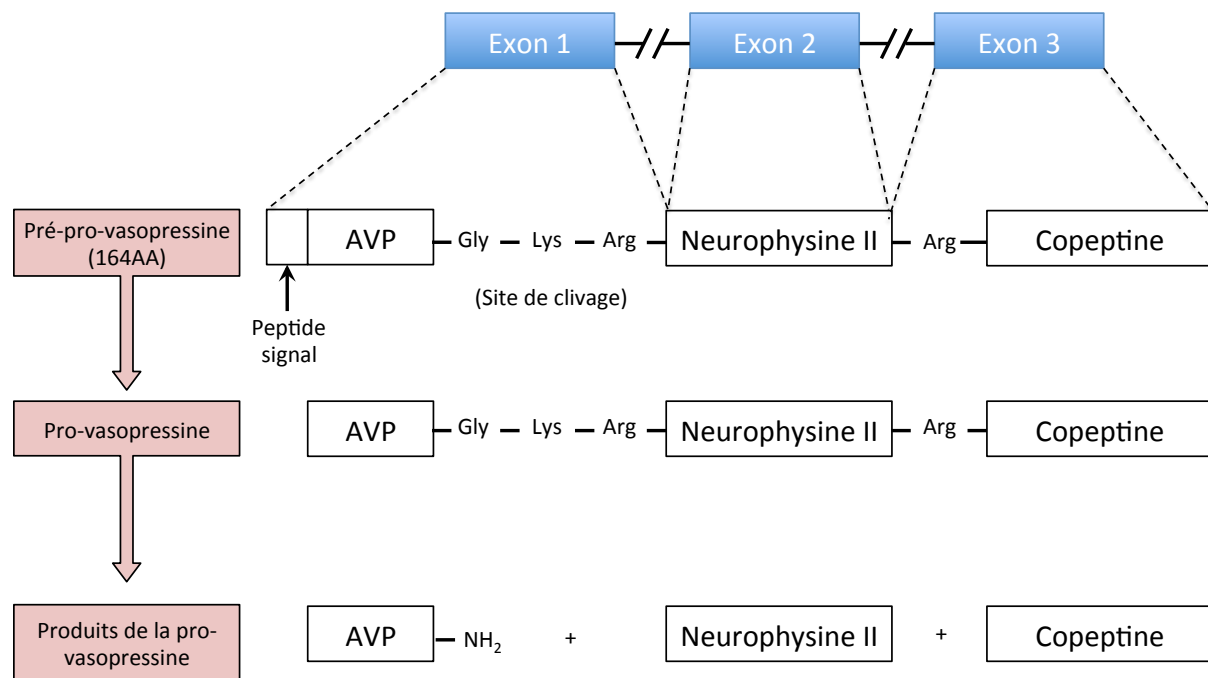


Figure 2 : Etapes de la biosynthèse de la vasopressine à partir du gène précurseur

Un précurseur de 147 acides aminés est produit, la préprovasopressine, composée par conséquent d'un peptide signal, de l'AVP, de la neurophysine II et la copeptine.

La traduction du gène en ARN messager génère la préprovasopressine par les ribosomes endoplasmiques tout en passant à travers ses cavités (grâce au peptide signal). Suite à l'hydrolyse du peptide signal est produite la provasopressine, qui sera accumulée dans les granules de sécrétion du réticulum endoplasmique (Russell et al., 1980).

La provasopressine subira une série d'hydrolyses qui provoqueront son clivage lors de sa progression dans les axones neuronaux pour générer au final une molécule d'AVP, une molécule de neurophysine II et une molécule de copeptine.

La libération de l'hormone neurohypophysaire vers la circulation est effectuée par un mécanisme d'exocytose qui est soumis à un influx nerveux

Le rôle biologique de la neurophysine II n'est pas connu pour le moment, cependant elle possède une région de liaison de haute affinité à l'AVP. La neurophysine II est capable d'oligomériser, tant qu'elle est liée à l'AVP, cette oligomérisation permet l'agrégation des complexes neurophysine II – vasopressine dans les granules de sécrétion qui se forment dans le réticulum endoplasmique. La neurophysine II servirait donc de transporteur ou de chaperonne

indispensable pour la bonne synthèse et la sécrétion de la vasopressine tout le long des axones neuronaux. Il a également été démontré que 27 acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de la neurophysine II sont nécessaires à cette liaison (de Bree et al., 2000). Par ailleurs, la neurophysine a une demi-vie supérieure à celle de l'AVP et sert de ce fait pour l'étude de certaines maladies liées à la vasopressine (mesures des niveaux de neurophysine II comme indicateur des anomalies de sécrétions neurohypophysaires (Scantamburlo et al., 2005).

Concernant la copeptine, aucun rôle physiologique ne lui est connu à ce jour. La copeptine étant plus stable que la vasopressine (Struck et al., 2005), son dosage, plus aisé que celui de la vasopressine est maintenant effectué en milieu hospitalier comme marqueur de certaines pathologies à la place de la vasopressine qui est plus sensible aux aminopeptidases, et donc plus rapidement dégradable.

1.4 Sécrétion au niveau central

L'AVP est synthétisée principalement par les neurones magnocellulaires et parvocellulaires issus des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Deux systèmes neurosécrétoires distincts sont impliqués dans la synthèse de la vasopressine.

Le premier est le système neurosécrétoire magnocellulaire. Il est principalement constitué de neurones dont les corps cellulaires se situent dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Les axones de ces neurones constituent le faisceau hypothalamo-neurohypophysaire de la tige pituitaire. Ces axones se terminent au niveau des capillaires sanguins de la neurohypophyse. A ce niveau, suite à un influx électrique, l'hormone est libérée dans le sang systémique et peut donc aller agir sur les différents organes cibles.

Le second est le système neurosécrétoire parvocellulaire. Ce système est constitué de neurones hypothalamiques dont les axones se terminent dans l'hypothalamus médiobasal (ou éminence médiane) au contact des capillaires sanguins du système porte hypophysaire (Livett et Parry, 1973; Zimmerman et al., 1977) (Figure 3). Ainsi, l'AVP sécrétée par ces neurones atteint les cellules endocrines corticotropes de l'adénohypophyse. Celles-ci expriment le récepteur V_{1B} de la vasopressine. En agissant sur la population de cellules corticotropes, l'AVP induit la sécrétion d'adrénocorticotropine (ACTH). Il est important de noter que les neurones parvocellulaires synthétisant l'AVP sont également responsables de la synthèse de la corticolibérine (CRF). Les deux hormones libérées dans l'adénohypophyse co-régulent la sécrétion d'ACTH (Fleischer et al., 1972; Gillies et al., 1982).

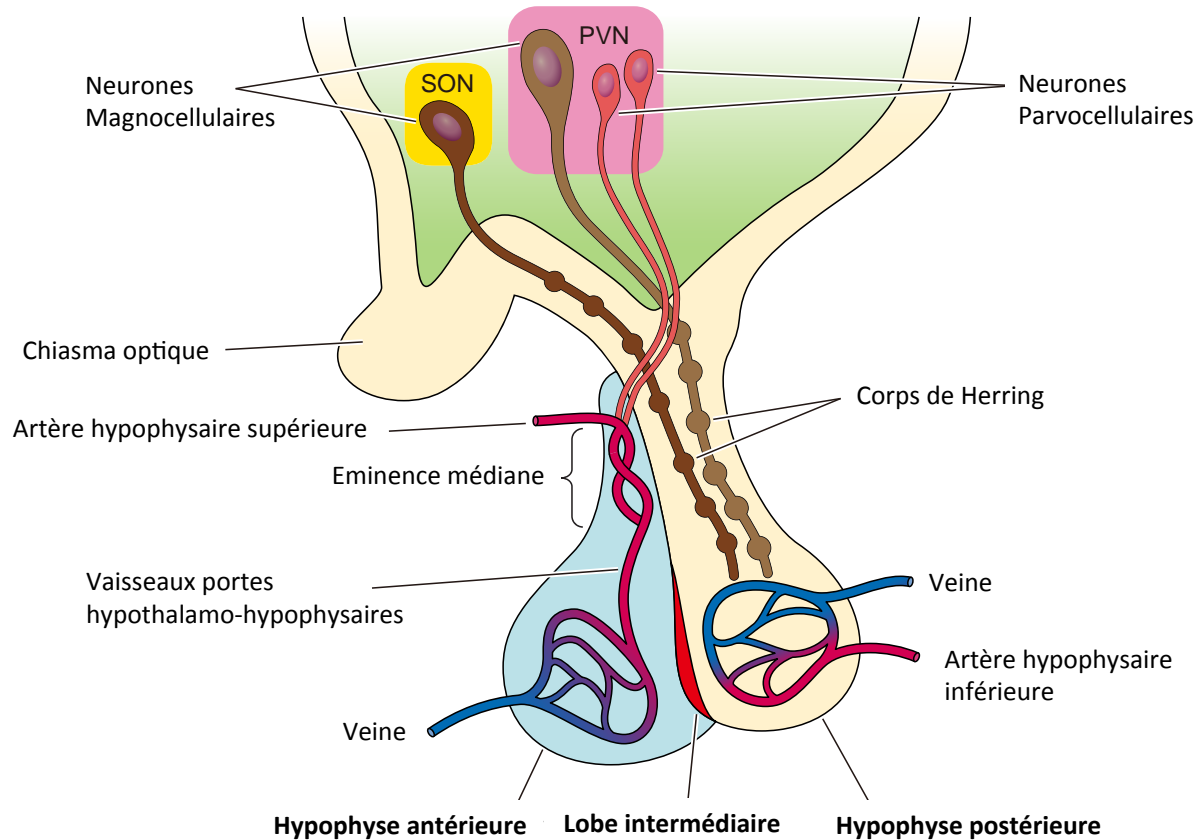


Figure 3 : Le système hypothalamo-hypophysaire (modifiée à partir de Koshimizu et al., 2012)

Représentation des zones de l'hypophyse avec les neurones sécréteurs et leur vascularisation. Les axones des neurones magnocellulaires dans le noyau paraventriculaire (PVN) et le noyau supra-optique (SON) de l'hypothalamus se terminent par l'hypophyse postérieure, qui reçoit l'approvisionnement en sang dans l'artère hypophysaire inférieure formant "le système hypothalamo-neurohypophysaire". L'AVP est synthétisée comme pré-pro-AVP dans le corps du neurone et est transmise ensuite à travers les axones. Pendant le transfert, la molécule précurseur est transformée en AVP. L'AVP est alors accumulée dans les terminaisons nerveuses de l'hypophyse postérieure. Les neurones parvocellulaires dans le PVN, d'autre part, projettent leurs axes neuronaux au plexus capillaire porte de la couche externe de l'éminence médiane. Les vaisseaux portes hypothalamo-neurohypophysaires transfèrent la libération d'AVP de l'éminence médiane à l'hypophyse antérieure, où l'AVP stimule la sécrétion d'ACTH à partir des cellules corticotropes.

Outre les deux systèmes décrits précédemment, la vasopressine est également synthétisée dans d'autres zones du système nerveux central :

- des neurones du noyau suprachiasmatique : ceux-ci projettent sur l'habenula latérale, l'organe vasculaire de la lame latérale, le noyau périventriculaire du thalamus, le septum latéral, les noyaux supraoptiques et dorsomédians de l'hypothalamus
- des neurones du noyau paraventriculaire projetant sur l'hippocampe, l'amygdale, la substance noire, le noyau du tractus solitaire, le noyau ambigu, la *substantia gelatinosa* de la moelle épinière.

- des neurones appartenant au noyau dorso-médian de l'hypothalamus, projettent caudalement vers le locus coeruleus et la moelle épinière.
- des neurones du noyau de la strie terminale
- des neurones du noyau médian de l'amygdale, projetant vers le noyau ventro-médian de l'hypothalamus, le noyau de la strie terminale, le noyau parabrachial.
- des neurones du noyau parabrachial, projetant vers le noyau médian de l'amygdale.

A noter que certaines zones expriment une ou plusieurs isoformes de récepteurs de la vasopressine. Ainsi, l'AVP produite dans ces neurones et libérée dans les différentes zones du cerveau serait responsable des effets centraux de la vasopressine.

Une fois synthétisée, la vasopressine est acheminée le long des axones des neurones magnocellulaires. Lorsqu'elle arrive aux terminaisons nerveuses des neurones, elle est incorporée dans des vésicules sécrétoires. La libération de l'hormone est soumise à un influx nerveux, de même type que pour toute sécrétion neuronale : l'augmentation de l'activité électrique des neurones ouvre des canaux calciques voltages dépendants, induisant une entrée de calcium dans le neurone et la fusion des granules neurosécrétoires à la membrane. Ceci mène à la libération de l'hormone.

1.5 Contrôle de la sécrétion au niveau hypophysaire

Le contrôle de la sécrétion hypophysaire de la vasopressine est le résultat d'un ensemble d'informations excitatrices ou inhibitrices. La sécrétion de l'AVP par la neurohypophyse est régulée de manière différente que par l'adénohypophyse du moment où les fonctions de l'hormone diffèrent selon la zone de sécrétion.

1.5.1 Contrôle de la sécrétion neuro-hypophysaire

A. Contrôle par neurotransmetteurs

De nombreux neuromédiateurs, excitateurs et inhibiteurs (Figure 4), sont impliqués dans la libération de la vasopressine par les neurones magnocellulaires.

- L'acétylcholine : présente dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires, ce neurotransmetteur est capable de stimuler la sécrétion d'AVP. Le mécanisme d'activation passe probablement via l'activation de récepteurs nicotiques (Zaninetti et al., 2000).

- La noradrénaline : son effet excitateur est en concordance avec le fait que des terminaisons nerveuses projettent sur les neurones vasopressinergiques. Cependant, la noradrénaline pourrait réguler les réflexes cardiovasculaires qui inhibent la libération de vasopressine.

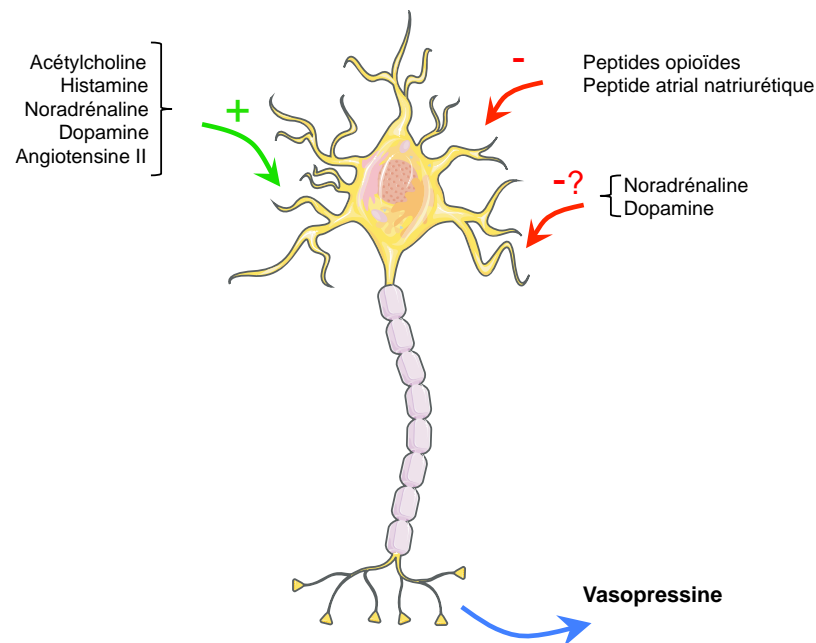


Figure 4 : Contrôle de la sécrétion de la vasopressine par les neurotransmetteurs.

En vert, les neurotransmetteurs excitateurs. En rouge, les neurotransmetteurs inhibiteurs. Les actions inhibitrices de la noradrénaline et de la dopamine ne sont pas clairement démontrées.

- La dopamine : la plupart des données indiquent que ce neurotransmetteur facilite la sécrétion d'AVP dans l'hypothalamus via ses récepteurs de type D1 (Mathiasen et al., 1996). Il existerait cependant des évidences montrant que la dopamine aurait un effet inhibiteur sur la sécrétion neuro-hypophysaire.
- L'histamine : est capable de provoquer la sécrétion d'AVP en stimulant l'activité électrique des neurones vasopressinergiques via son récepteur H1
- L'angiotensine II : administrée par injection i.c.v. ou en périphérie augmente la sécrétion d'AVP stimulée osmotiquement depuis la neurohypophyse (Höhle et al., 1996).
- Le facteur atrial natriurétique : administré par voie i.c.v. inhibe la sécrétion d'AVP injectée. Cependant on ne connaît pas d'effet direct de ce peptide sur les neurones vasopressinergiques.

- Les peptides opioïdes : ils inhiberaient la sécrétion d'AVP (ceci a été montré pour la β endorphine) via un mécanisme impliquant le récepteur KOPr peut être (Rossi et Brooks, 1996).
- D'autres substances : comme les stéroïdes, les prostaglandines, la sérotonine, le GABA, sont susceptibles de réguler la sécrétion d'AVP. Cependant leur importance physiologique n'a pas été démontrée.

Ainsi, l'acétylcholine, l'angiotensine II et le peptide atrial natriurétique possèdent un rôle pro-sécrétoire de la vasopressine lors de changements de l'osmolarité plasmatique, alors que la noradrénaline est impliquée dans les modifications hémodynamiques. Ces neurotransmetteurs sont donc impliqués dans la régulation de vasopressine selon les différentes conditions physiologiques.

Il faut également préciser que la vasopressine influence sa propre production. Ainsi, la vasopressine sécrétée par les neurones du noyau supraoptique au niveau somato-dendritique optimise l'activité électrique de neurones qui la sécrète par un mécanisme autocrine/paracrine.

La vasopressine est libérée en conditions basales dans le noyau supraoptique et soutient une activité électrique dans les neurones de ce noyau. Elle possède donc une action facilitatrice sur sa propre sécrétion (Chevalayre et al., 2000).

B. Contrôle par la voie osmoréceptrice

L'une des fonctions clé de l'AVP est la régulation de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. Pour cette raison, l'osmolarité plasmatique constitue un élément principal dans le contrôle de la sécrétion de l'AVP (pour revue voir Bourque et Oliet, 1997).

Après une série d'expériences très réussies, Verney a proposé en 1947 le concept selon lequel la sécrétion d'AVP est déterminée par l'osmolarité de l'eau corporelle. Selon Verney, les osmorécepteurs intracrâniens très sensibles aux variations de la concentration en sodium et d'autres solutés sont responsables du contrôle de la libération de la vasopressine. Des investigations ont été effectuées sur la nature de ces osmorécepteurs et ont montrées que des canaux cationiques mécanosensibles ont été identifiés dans les neurones magnocellulaires. Ces canaux sont capables de transmettre des changements osmotiques (Bourque et al., 2002).

Ces osmorécepteurs sont localisés dans 3 structures associées avec la lame terminale : l'organe subfornical, le noyau de l'aire médiane préoptique et l'organe vasculaire de la lame terminale (McKinley et al., 2004).

Lorsque l'organisme présente un besoin en eau, il se produit une augmentation de l'osmolarité du fluide extracellulaire, ce qui provoque la perte de volume des cellules exprimant les osmorécepteurs. Ce qui se traduit par la génération de stimuli électriques qui produisent une activation des neurones vasopressinergiques et la libération de l'AVP hypophysaire (Bourque et Oliet, 1997) (Figure 5).

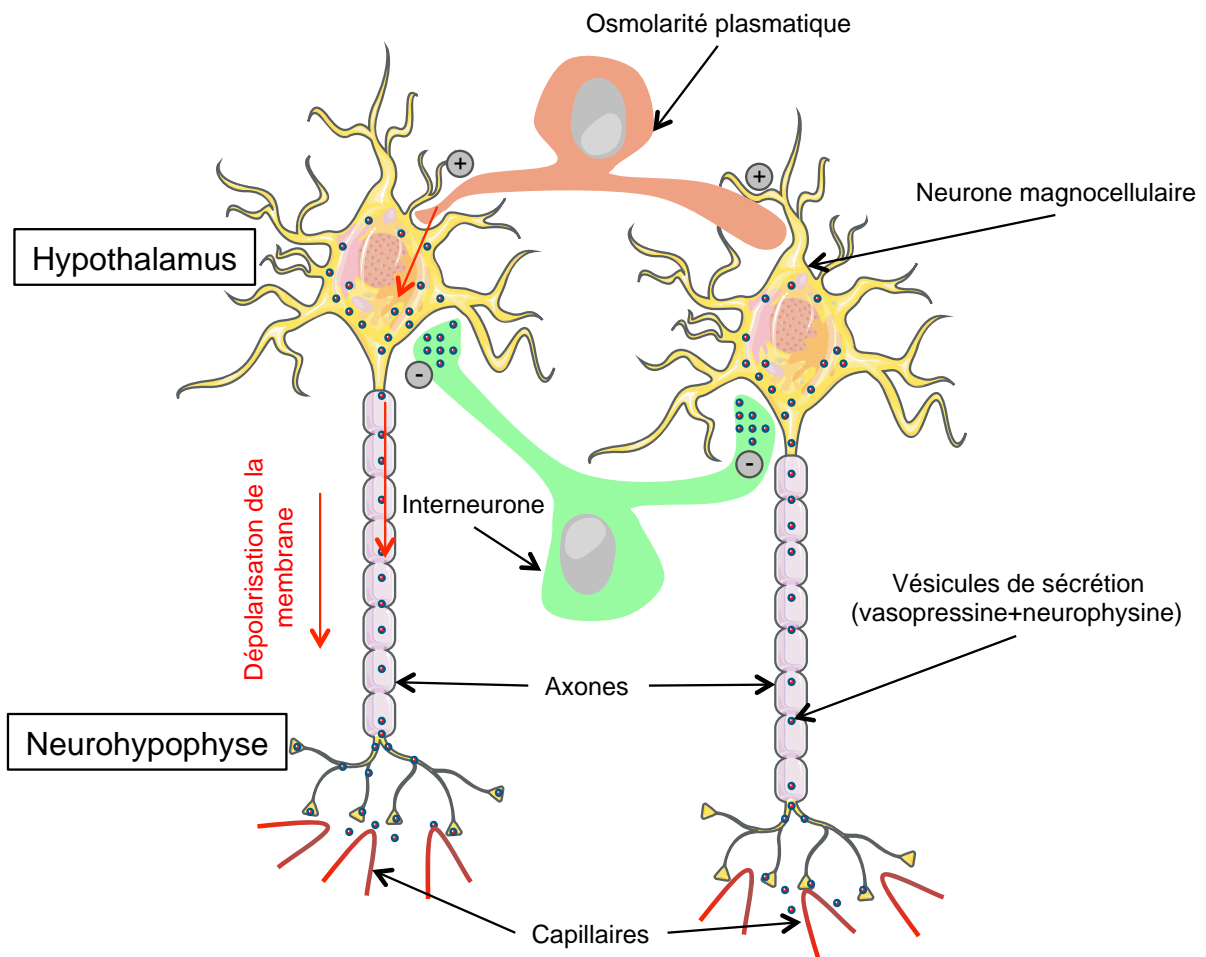


Figure 5 Représentation du mécanisme osmorégulateur de la sécrétion de vasopressine.

L'augmentation de l'osmolarité du plasma se transforme en impulsions électriques qui se transmettent à travers les axones de la cellule vasopressinergique. La dépoliarisation de la membrane produit alors l'exocytose des granules qui contiennent l'AVP induisant sa libération.

La sécrétion de vasopressine est donc contrôlée par des mécanismes très précis dont l'action permet de préserver l'osmolarité plasmatique. Un changement d'osmolarité d'à peine 1% suffit à déclencher une réponse sécrétoire considérable.

C. Contrôle par la voie barorégulatrice

Bien que la pression osmotique joue un rôle fondamental dans le contrôle de la sécrétion de l'AVP, il n'est pas l'unique facteur en charge de ce contrôle. Les principaux stimuli indépendants de l'osmolarité du plasma qui régulent la libération de l'AVP sont les variations du volume et de la pression sanguine. Ainsi, une réduction de 5 à 10% de la pression artérielle sanguine est capable d'augmenter l'activité antidiurétique induite par la sécrétion d'AVP.

La principale voie de régulation non osmotique implique l'activation de barorécepteurs de basse pression dans l'oreillette gauche et de barorécepteurs de haute pression dans le sinus carotidien et la crosse aortique. Actuellement, il existe un consensus qui dicte le contrôle de ces récepteurs concernant la sécrétion d'AVP. Ainsi, en conditions normales de volume et de pression sanguine, des impulsions afférentes des barorécepteurs inhibent les mécanismes centraux de libération de l'AVP. Une réduction du volume ou de la pression sanguine provoque une baisse de l'activité de ces récepteurs et l'activation de la libération de l'AVP par la stimulation de neurones vasopressinergiques via le nerf vague. A contrario, l'augmentation du volume sanguin peut causer des effets inverses.

C'est grâce aux études de Schrier et collaborateurs, connues depuis un certain temps pour avoir montré que cette barorégulation de la sécrétion d'AVP est induite par la stimulation des récepteurs α et β -adrénergiques. Ces récepteurs font intervenir les barorécepteurs situés au niveau du sinus carotidien (Schrier et Berl, 1972).

Lors de la baisse de la pression, les barorécepteurs transmettent moins d'influx par l'intermédiaire de neurones afférents et de voies ascendantes de l'hypothalamus et la sécrétion d'AVP augmente. A l'inverse, une élévation de la pression sanguine provoque une augmentation de la fréquence de décharge des barorécepteurs et diminue la sécrétion d'AVP.

1.5.2 Contrôle de la sécrétion adénohypophysaire

Un autre aspect fondamental mené par la vasopressine est de contrôler la régulation de l'axe corticotrope. Ainsi, la vasopressine produite dans les neurones hypothalamiques est libérée au niveau hypophysaire de façon concomitante avec la corticolibérine (CRF). Les deux hormones agissent sur l'adénohypophyse et stimulent les cellules corticotropes, qui sécrètent l'adrénocorticotropine (ACTH). L'ACTH libérée dans la circulation agit au niveau surrénalien pour stimuler la sécrétion de glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme, corticostérone chez le rat).

Suivant un rétrocontrôle, ces stéroïdes réduisent la synthèse de CRF et de vasopressine et leurs effets hypophysaires, maintenant ainsi les niveaux d'hormones dans le domaine homéostasique.

La vasopressine est connue depuis longtemps pour réguler la sécrétion d'ACTH hypophysaire (Baertschi et al., 1980; Buckingham, 1981). L'AVP est un faible simulateur par elle-même de la sécrétion d'ACTH, mais elle agit comme un modulateur important en réponse au stress en potentialisant l'effet sécrétoire de la corticolibérine (Buckingham, 1982; Gillies et al., 1982; Antoni et al., 1983).

Ainsi, la co-stimulation des cellules corticotropes par l'AVP et le CRF induit un effet plus qu'additif sur la sécrétion d'ACTH. Les actions de la vasopressine et de la corticolibérine passent par leurs récepteurs respectifs, les récepteurs V_{1B} et $CRHR_1$.

Suivant le type de stress, aigu ou chronique, la régulation de la sécrétion d'ACTH est opérée différemment par la vasopressine ou la corticolibérine (Aguilera et Rabadan-Diehl, 2000).

A. Régulation de la sécrétion en état de stress aigu

Lors d'un stress aigu, l'AVP et le CRF sont libérés de façon rapide dans la circulation porte. Ceci a pu être observé dans de nombreuses études et sur plusieurs modèles (Plotsky, 1988; Berkenbosch et al., 1989; Kovács and Sawchenko, 1996).

Le CRF évolue de façon parallèle à l'ACTH, ce qui n'est pas le cas de la vasopressine. Ainsi, les transcrits CRF augmentent rapidement, ce qui est corrélé avec la sécrétion d'ACTH. Les transcrits de la vasopressine évoluent différemment : leur production est retardée et plus prolongée que celle du CRF (Aguilera, 1998).

Le CRF est le principal régulateur de la sécrétion d'ACTH d'un stress aigu. Ceci n'est pas le cas lors d'un stress chronique.

B. Régulation de la sécrétion en état de stress chronique

La vasopressine serait le principal régulateur de la sécrétion d'ACTH lors d'un stress chronique. Ainsi, contrairement au CRF, l'AVP augmente dans les neurones parvocellulaires lors d'un stress chronique (Aguilera, 1994). Les messagers du récepteur V_{1B} (Aguilera et Rabadan-Diehl, 2000) ainsi que la liaison de vasopressine dans l'hypophyse augmentent également (Ma et Zimmel, 2002). Lors d'un stress répété, la corticolibérine associée au récepteur $CRHR_1$ est diminuée (Aguilera, 1998).

On observe aussi une augmentation du stock de vasopressine dans les terminaisons nerveuses de neurones exprimant le CRF (de Goeij et al., 1991).

1.6 Sécrétion au niveau périphérique

Bien que l'expression du gène de la vasopressine s'exprime principalement au niveau des neurones hypothalamiques dont les axones forment la neurohypophyse, l'hormone est localisée également dans différents organes périphériques extra-hypothalamiques tels que la glande surrénale, le pancréas, le cœur, les gonades et le cervelet.

L'expression périphérique du gène de la vasopressine au niveau surrénalien, cardiaque et pancréatique est cohérente avec le fait que l'hormone exerce des fonctions importantes et connues dans ces organes.

➤ *Dans le pancréas*, la vasopressine a été retrouvée dans des extraits de pancréas humain et de rat où elle stimule la sécrétion d'insuline (Amico et al., 1988).

➤ *Dans la glande surrénale*, la vasopressine est sécrétée dans les zones corticales et médullaires. Les cellules chromaffines la produisent en condition de base et sous stimulation avec l'acétylcholine ou la corticolibérine (Grazzini et al., 1998; Guillon et al., 1998). La présence de récepteurs de la vasopressine dans la glande surrénale (isoformes V_{1A} et V_{1B}) suggère un mécanisme autocrine/paracrine dans cet organe (Guillon et al., 1998).

➤ *Au niveau cardiaque*, une étude a mis en évidence une synthèse *de novo* de la vasopressine ainsi que la sécrétion de l'hormone chez le rat exposé à une augmentation de la pression sanguine (Hupf et al., 1999).

➤ *Dans les gonades*, des études ont montré une immunoréactivité positive dans les testicules de rats ainsi qu'une expression infime de transcrits de pré-pro-AVP dans les ovaires de bovin (Ivell et Burbach, 1991), suggérant que la vasopressine est présente en faible quantité (Foo et al., 1991, 1994). Chez le rat Brattleboro (rats déficients en AVP au niveau central) de l'AVP est exprimée dans les ovaires (Lim et al., 1984).

➤ *Dans l'endothélium vasculaire*, une étude immunohistochimique a permis de localiser de la vasopressine dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires de rat (Loesch et al., 1991) ainsi que dans les cellules endothéliales d'artères rénales et mésentériques de rat (Lincoln et al., 1990). Les rôles de ces sécrétions périphériques vasculaires restent à définir.

➤ *Dans plusieurs tumeurs*. C'est le cas des phéochromocytomes qui sont des tumeurs de la glande médullo-surrénalienne, synthétisant des catécholamines (Grazzini et al., 1999). Ceci est aussi le cas de tumeurs pulmonaires (cancer du poumon à petites cellules) (Campling et al., 1995).

2. L'ocytocine

2.1 Structure

A l'égal de la vasopressine, l'ocytocine (OT) est une hormone composée de 9 acides aminés qui forment un pont disulfure entre les cystéines en position 1 et 6. Tout comme l'AVP, l'OT comporte également un groupement amide en position C terminal.

Ces deux peptides montrent une grande homologie structurale bien qu'ils soient différents en position 3 et 8. Ainsi, la vasopressine possède respectivement en ces positions une phénylalanine et une arginine tandis que l'ocytocine possède une isoleucine et une leucine. (Figure 6). L'isoleucine en position 3 est fondamentale dans la structure de l'ocytocine puisqu'elle est essentielle à son interaction avec le récepteur OT (Postina et al., 1996).

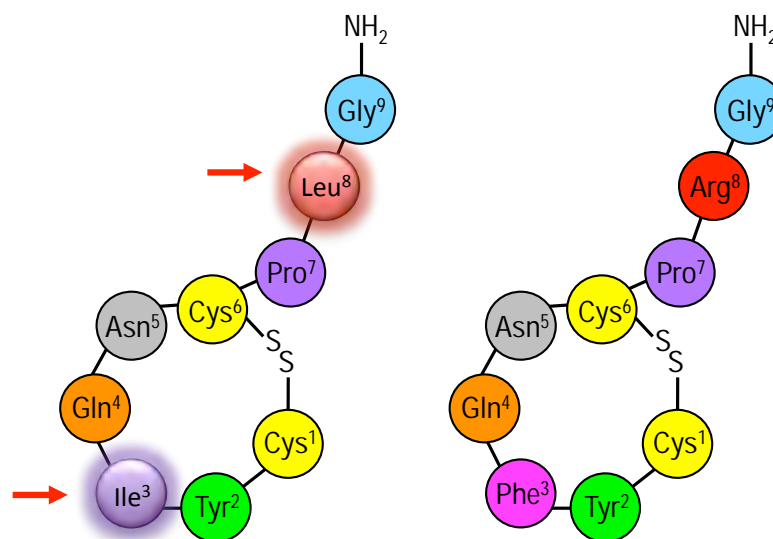


Figure 6 : Comparaison des structures primaires de l'AVP (à droite) et de l'OT (à gauche)

Les flèches rouges au niveau de la structure de l'OT indiquent les acides aminés qui divergent entre l'OT et l'AVP

Dans le règne animal, à part la lysine vasopressine, il existe une pléthore de structures équivalentes à l'AVP et l'OT qui ne diffèrent que par les acides aminés en positions 3, 4 et 8. Ainsi, il existe une uniformité structurale considérable qui est répétée entre AVP et le reste des nonapeptides homologues, cette uniformité suggère l'existence d'un gène ancestral commun qui a évolué en deux voies, aboutissant à la vasopressine et l'ocytocine (Ruppert et al., 1984).

Le fait que ces deux hormones aient été si bien conservées tout au long de l'évolution reflète très probablement leur importance physiologique.

Des composés, de la même famille que la vasopressine, ont été isolés chez de nombreux invertébrés et chez 7 familles majoritairement vertébrés, représentant un total de 120 espèces

chez lesquels un de ces composés sera présent. La séquence peptidique ainsi que l'origine animal de ces composés sont résumées dans la Table 1.

Table 1 : Homologues structuraux de la vasopressine et de l'ocytocine

(à partir de Ruppert et al, 1984)

Homologues de la vasopressine

Hormone	Structure	Espèce
[Arg ⁸] vasopressine	Cys ¹ -Tyr ² -Phe ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Mammifères
[Lys ⁸] vasopressine	Cys ¹ -Tyr ² -Phe ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Lys ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Suidés
[Phe ²] vasopressine	Cys ¹ -Phe ² -Phe ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Quelques mammifères
Vasotocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Arg ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Non-mammifères

Homologues de l'ocytocine

Hormone	Structure	Espèce
Ocytocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Leu ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Mammifères
Mésotocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Ile ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Quelques Marsupiaux
[Phe ²] mésotocine	Cys ¹ -Phe ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Ile ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Dipneuste d'Australie
Isotocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Ser ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Ile ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Actinoptérygiens
Glumitocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Ser ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Gln ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Raies
Valitocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Gln ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Val ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Requins (<i>Sq. acanthias</i>)
Aspargtocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Asn ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Leu ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Requins (<i>Sq. acanthias</i>)
Asvatocine	Cys ¹ -Tyr ² -Ile ³ -Asn ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Val ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Requins (<i>Sc. canicula</i> ; <i>T. scyllium</i>)
Phasitocine	Cys ¹ -Tyr ² -Phe ³ -Asn ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Ile ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Requins (<i>T. scyllium</i>)
Phasvatocine	Cys ¹ -Tyr ² -Phe ³ -Asn ⁴ -Asn ⁵ -Cys ⁶ -Pro ⁷ -Val ⁸ -Gly ⁹ -NH ₂	Requins (<i>Sc. canicula</i>)

2.2 Biosynthèse et métabolisme

L'OT est synthétisé, comme l'AVP, dans les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique et dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Cependant, la population de cellules sécrétrices d'OT est différente de celles sécrétrices d'AVP. De plus, d'autres neurones ocytocinergiques des noyaux supraoptique et paraventriculaire se projettent dans des régions cérébrales extra-hypothalamiques comme le septum, l'hippocampe ou la moelle épinière (Argiolas et Melis, 2004).

Chez l'homme, le gène codant pour l'OT est situé sur le chromosome 20, séparés de 8 Kb seulement du gène codant pour l'AVP. De même chez le rat, ce gène est co-localisé avec celui de l'AVP sur chromosome 11 à une distance de 11 Kb. Cependant dans ces deux cas, les deux gènes sont transcrits dans des directions opposées.

Le gène de l'OT est, tout comme celui de l'AVP, composé de trois exons :

- le premier code pour le signal de translocation, l'hormone, la GKR et les neuf premiers résidus de la neurophysine I,
- le deuxième exon code pour la partie centrale de la neurophysine I
- le troisième exon code pour l'extrémité C-terminale de la neurophysine I.

Chez certaines espèces, la neurophysines I et II sont identiques, ceci conforte le stipula précédent qui suggère que l'OT et l'AVP sont issues d'un gène ancestral commun.

Le pro-peptide de l'OT est sujet aux hydrolyses et modifications ultérieures après traduction. Cette molécule est transportée par les axones neuronaux qui atteignent l'hypophyse postérieure. L'OT mature s'accumule ensuite dans les axones jusqu'à ce qu'une impulsion électrique indique la nécessité de sa libération.

Une fois libérée, l'OT a une durée de vie de 3-5 minutes et est dégradé directement dans les reins ou le foie.

2.3 Sécrétion

La libération de l'OT stockée dans les granules de sécrétion est soumise à un influx nerveux, de même type que pour toute sécrétion neuronale : l'augmentation de l'activité électrique des neurones ouvre des canaux calciques voltages dépendants, induisant une entrée de calcium dans le neurone et la fusion des granules neurosécrétoires à la membrane. Ceci mène à la libération de l'hormone.

Les neurones vasopressinergiques ne sont pas distinguables morphologiquement des neurones ocytocinergiques, également présents dans les noyaux (magnocellulaires et parvocellulaires). Cependant, l'activité électrique de ces derniers est différente : les neurones ocytocinergiques présentent un profil d'activation tonique. Ils déchargent de façon pulsatile. Pratiquement tous les neurones émettent des bouffées de potentiels d'action synchrones, ce qui conduit à des sécrétions d'OT intermittentes dans la circulation (Brown et Moos, 1997).

En plus de sa production hypothalamique, l'OT est produite dans des organes et tissus périphériques tels que l'épithélium utérin : où elle contribue à l'augmentation des contraction lors de la parturition ou les glandes mammaires : où elle régule la contraction de l'éjection de lait lors de la tétée. Des transcrits d'OT on également été retrouvés dans les ovaires, les testicules, l'endothélium vasculaire et le cœur (Zingg et Laporte, 2003).

3. Les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine (VP/OT)

Certaines cellules libèrent des molécules (hormones, neuromédiateurs) jouant le rôle de signaux extracellulaire, la régulation de l'activité d'une cellule par un signal extracellulaire suppose l'intégration de ce dernier par la cellule.

Si le ligand pénètre dans la cellule (molécule lipophile qui peut diffuser à travers la membrane plasmique) il agira généralement au niveau du noyau en tant que facteur de transcription.

Si le ligand ne traverse pas la bicouche lipidique il aura donc besoin d'un relai à la surface cellulaire pour transmettre l'information et ceci en se fixant sur des récepteurs membranaire. Il existe différents type de récepteurs membranaire : les récepteurs couplés au protéines G (RCPG), les récepteurs à activité tyrosine kinase, les récepteurs canaux etc. *In fine*, la transduction du signal induite par la fixation du ligand engendrera une modification de l'activité de la cellule cible qui engagera une cascade d'actions cellulaires menant à une réponse cellulaire.

3.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPG constituent la plus grande famille des récepteurs membranaires (plus de 800 membres). Ils représentent plus de 2% des gènes fonctionnels du génome humain. Ces récepteurs sont impliqués dans la réception d'une grande variété de signaux tels que la lumière, des ions, des molécules odorantes, des petites molécules telles que des acides aminés ou des nucléotides, des peptides ou des médiateurs lipidiques, ainsi que des molécules de plus grande taille comme des protéines ou des enzymes (Bockaert et Pin, 1999). La liaison du ligand sur un RCPG induit des changements conformationnels de ce récepteur qui à leur tour provoquent l'activation d'un complexe protéique hétérotrimérique appelé la protéine G.

Les RCPG jouent un rôle central dans le contrôle de la grande majorité des fonctions physiologiques d'un organisme, ils sont impliqués par exemple dans le phénomène de vision, de l'odorat, goût, ainsi que dans la régulation des comportements et de l'humeur, la régulation de l'activité du système immunitaire, la neurotransmission, le métabolisme, la division et la différenciation cellulaire ainsi que d'autres fonctions. Ces récepteurs représentent une cible majeure de l'industrie pharmaceutique puisque 30% des médicaments actuellement sur le marché agissent via leurs interactions avec les RCPG (Ma et Zimmel, 2002).

3.2 Classification des récepteurs de la vasopressine

La classification de la famille des récepteurs de la vasopressine est basée sur trois critères différents: le système de transduction des signaux couplé au récepteur, son profil pharmacologique et la structure du polypeptide récepteur.

La première classification des récepteurs était basée sur le mécanisme de signalisation, c'est à dire en fonction des changements biochimiques associés à l'activation de chaque type de récepteur de l'hormone. Ce premier classement est basé sur des études réalisées au cours des années soixante-dix qui ont montré que l'effet antidiurétique de l'AVP est véhiculé par un récepteur qui provoque l'augmentation de la concentration d'AMPc. Ce récepteur serait différent de celui qui induit l'action vasopressique de l'hormone en faisant intervenir des variations dans la concentration des ions de calcium intracellulaires ($[Ca^{2+}]_i$) lors de l'activation. Sur la base de ces premiers résultats, Michell et ses collaborateurs (1979) ont proposé la première classification des récepteurs de la vasopressine qui distingue deux sous-types: V_1 et V_2 . Le sous-type V_1 est associée à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ avec la production d'inositol-triphosphate (IP_3) déclenché par l'activation d'une phospholipase C (PLC). Alors que le sous-type V_2 stimule l'adénylate cyclase qui induit la production d'AMPc.

Pour la deuxième classification, les récepteurs sont caractérisés par le profil pharmacologique qu'ils présentent par rapport à de nombreux analogues structuraux générés depuis l'élucidation de la structure de l'AVP et OT qui a permis de discriminer les sous-types V_1 et V_2 basée sur les propriétés de liaison qu'ils présentent. Ainsi, chez les mammifères, trois profils pharmacologiques distincts ont été classés et associés à différentes fonctions: les V_{1A} sont impliqués dans l'effet vasopresseur, les V_{1B} (V_3) jouent un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'ACTH et les V_2 sont responsables de la réabsorption de l'eau dans le rein. Dans toutes les espèces étudiées, les récepteurs d'un même sous-type présentent un profil pharmacologique spécifique et commun. Cependant quel que soit le sous-type de récepteur, l'affinité de la vasopressine pour son récepteur est comprise entre 0,5 et 5nM (Chini et al., 2008a).

Enfin, grâce aux progrès de la biologie moléculaire dans les années 90 la structure polypeptidique associée à chacun des profils pharmacologiques a été déterminée. Le gène codant pour chaque sous-type de récepteur est situé sur un chromosome différent: le chromosome 12, 1 et X pour le V_{1A} , le V_{1B} et le V_2 respectivement. Le récepteur V_{1A} a été cloné chez le rat (Morel et al., 1992) et par la suite chez l'humain et le mouton (Thibonnier et al., 1994; Hutchins et al., 1995). Le récepteur V_2 a également été cloné chez les deux espèces

(Birnbaumer et al., 1992; Morel et al., 1993) mais aussi chez le porc (Gorbulev et al., 1993). La séquence du récepteur V_{1B} humain, de rat et de la souris ont été déterminées un peu plus tard (de Keyzer et al., 1994; Sugimoto et al., 1994; Saito et al., 1995; Ventura et al., 1999).

En outre nous pouvons inclure le récepteur de l'ocytocine avec la famille des récepteurs de la vasopressine vu l'affinité nanomolaire de la vasopressine pour ce récepteur et la grande similitude d'affinité de l'OT et l'AVP pour l'ensemble de ces récepteurs.

3.3 Structure des récepteurs VP/OT

La plupart des récepteurs couplés aux protéines G sont de simples variations d'un modèle commun, constitué d'un seul polypeptide contenant domaines transmembranaires hydrophobes organisés en hélices α (TM1 à TM7) (Baldwin, 1993) (Figure 7). Deux des boucles extracellulaires du polypeptide constituent les sites de liaison du neurotransmetteur. Les variations structurales dans cette région déterminent quels neurotransmetteurs, quels agonistes, et quels antagonistes, vont être à même de se fixer au récepteur. Deux des boucles intracellulaires peuvent se lier et activer une protéine G. Ici, les variations structurales déterminent le type de protéine G, et par conséquent les systèmes effecteurs qui seront activés en réponse à la liaison du neurotransmetteur.

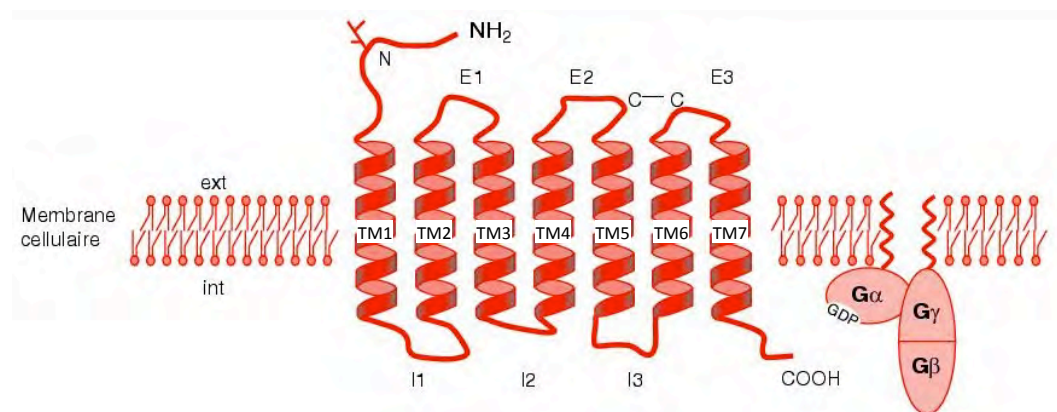


Figure 7 : Structure d'un modèle de RCPG

Représentation schématique de la structure typique en 7-TM des GPCR, ainsi que la structure d'une protéine G ($G\alpha$ -GDP et $G\beta\gamma$). Les trois boucles extracellulaires des GPCR sont appelées E1 à E3, et les trois boucles intracellulaires I1 à I3. L'extrémité aminée NH_2 de la protéine est du côté extracellulaire et l'extrémité carboxylique $COOH$ du côté intracellulaire.

Le clonage et la détermination de la structure primaire des récepteurs de la vasopressine au cours des années 90 ont constitué des étapes cruciales pour la connaissance de leurs structures. Ainsi, l'analyse de la séquence polypeptidique primaire permet de rechercher les déterminants moléculaires responsables des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques de chaque sous-type de récepteur.

Le clonage et le séquençage des récepteurs AVP/OT ont confirmé leur appartenance à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. La comparaison de la séquence primaire de ces récepteurs souligne le fait que ces récepteurs présentent un haut degré d'homologie dans leurs séquences primaires malgré les fonctions et les propriétés pharmacologiques différentes qui caractérisent chaque sous-type (Figure 8). On peut noter également que ces récepteurs présentent une forte homologie non seulement dans les hélices α transmembranaire, mais aussi dans les deux premières boucles extracellulaires. Ainsi chez l'homme parmi les 370-420 acides aminés présents on retrouve 102 résidus invariables et communs à tous les sous-types.

Si des modèles tridimensionnels, pour ces récepteurs, ont été réalisés sur la base d'homologie de séquence avec la Rhodopsine bovine, par une approche « Modélisation moléculaire, mutagénèse dirigée » (Derick et al., 2004; Rodrigo et al., 2007). Aucune étude cristallographique n'a encore été possible sur les récepteurs VP/OT.

Enfin, il est important de souligner qu'au vu de la grande similitude structurale qui existe entre l'AVP et l'OT, et celles de leurs récepteurs cibles, il est indispensable de réaliser les études pharmacologiques de chaque ligand sur les 4 isoformes de récepteurs (V_{1A} , V_{1B} , V_2 , OT), si l'on veut pouvoir utiliser ces composés sur cultures primaires cellulaires susceptibles d'exprimer plusieurs isoformes de récepteurs de la famille vasopressine/ocytocine ou *in vivo*.

De plus, il ne faut pas transposer les données obtenues chez une espèce à une autre. Les variations d'affinité de ligands pour un récepteur homologue que l'on peut observer par exemple entre le rat et l'homme nécessitent de caractériser les propriétés pharmacologiques des ligands chez les deux espèces.

Les récepteurs V_{1A} et V_{1B} étant au centre de nos études expérimentales nous leur accorderons donc une importance toute particulière dans la suite de ce travail.

3.3.1 Structure du récepteur V_{1A}

Les études combinées de modélisation en trois dimensions, de mutagenèse dirigée et de marquage covalent avec sondes photosensibles ont fourni de nouvelles connaissances sur la structure de ce récepteur.

Ainsi, concernant le site de liaison des protéines G, il semblerait que la seconde boucle intracellulaire soit responsable du couplage à la protéine G (Birnbaumer, 2000).

Le récepteur V_{1A} possède 418, 424 et 423 acides aminés chez l'homme, le rat et la souris respectivement. Ce récepteur a un poids moléculaire d'environ 47KDa. L'homologie de séquence entre ces trois espèces est d'au moins 78%. Le récepteur V_{1A} possède deux sites de glycosylation pour les récepteurs humain et murin, le premier dans sa partie N-terminale extracellulaire, sur l'asparagine 27 pour les trois espèces et l'autre au niveau de la deuxième boucle extracellulaire sur l'asparagine 196 pour le récepteur humain et sur l'asparagine 198 pour le récepteur murin. Le gène codant pour le récepteur V_{1A} est situé sur le chromosome 12 (Hawtin et al., 2001a, 2001b, 2001c).

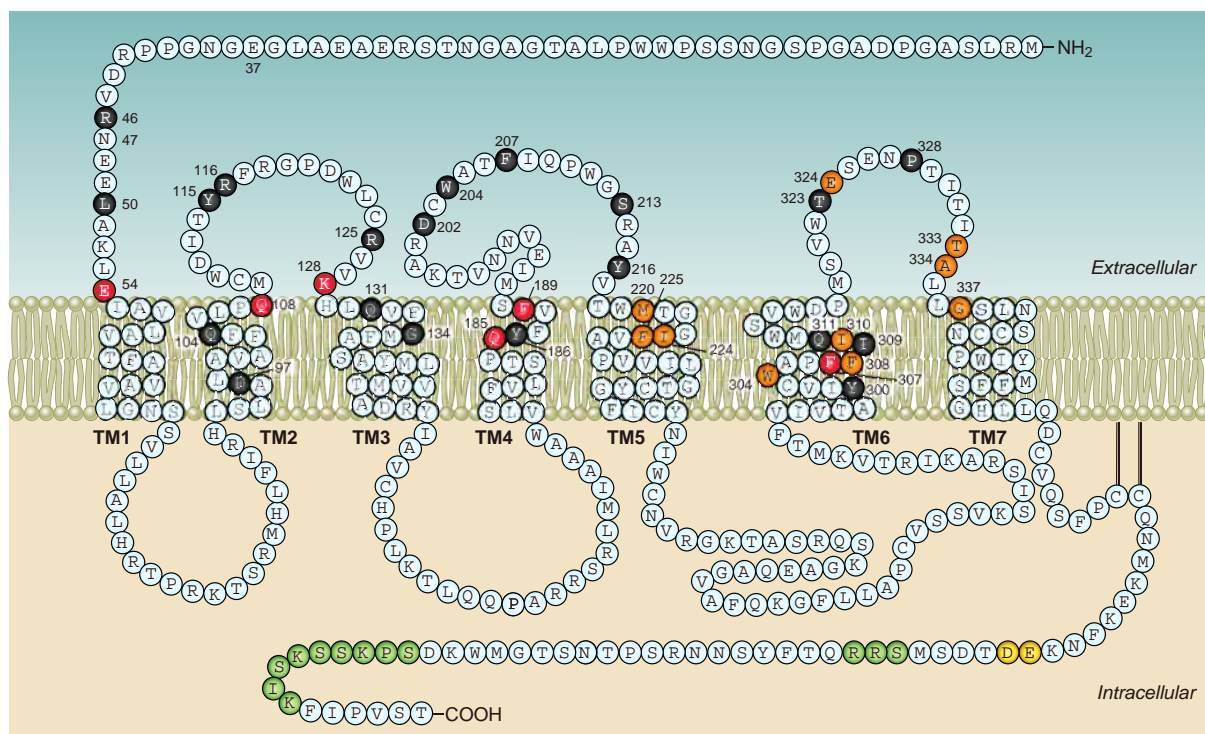


Figure 9 : Schéma en collier de perle du récepteur V_{1A} humain (Koshimizu et al., 2012))

En noir les acides aminés importants pour la liaison des agonistes, En orange, les acides aminés important pour la liaison des antagonistes. En rouge, les acides aminés impliqués dans la liaison des agonistes et des antagonistes. La topologie transmembranaire (TM) est de (Thibonnier et al., 1994). En jaune, le motif d'interaction GKC. En vert, motif d'interaction PKC.

Il possède comme les récepteurs de cette classe, un motif DRY qui est un motif essentiel pour l'activation par la protéine G. Deux séquences présentes dans le récepteur V_{1A} (KVK et KIR) sont également présentes chez le récepteur V_{1B} mais absentes dans le récepteur V_2 : ces trois séquences seraient potentiellement impliquées dans l'interaction avec la phospholipase C. L'homologie de séquence du récepteur V_{1B} avec les autres isoformes de récepteurs de la vasopressine est d'au moins 37% (Figure 9).

3.3.2 Structure du récepteur V_{1B}

Chez l'homme, le gène codant pour le récepteur V_{1B} est porté par le chromosome 1. Ce récepteur possède 425, 421 et 424 acides aminés chez le rat, la souris et l'homme respectivement. Ce récepteur a un poids moléculaire d'environ 47KDa. L'homologie de séquence entre ces trois espèces est d'au moins 78%. Le récepteur V_{1B} possède un site de glycosylation dans sa partie N terminale extracellulaire, sur l'asparagine 21. Il possède, comme les récepteurs de cette classe, un motif DRY. Le récepteur possède également 5 sites consensus pour la PKC (Sugimoto et al., 1994).

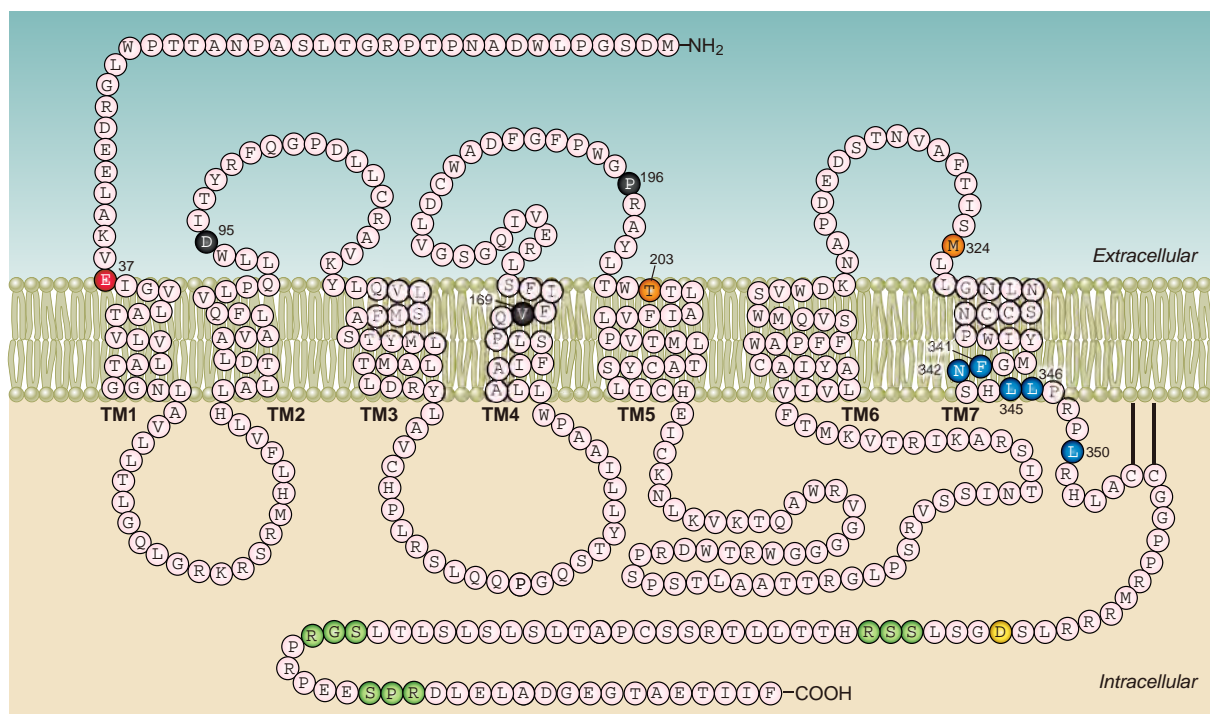


Figure 10 : Schéma en collier de perle du récepteur V_{1B} humain (Koshimizu et al., 2012)

En noir les acides aminés importants pour la liaison des agonistes, En orange, les acides aminés important pour la liaison des antagonistes. En rouge, les acides aminés impliqués dans la liaison des agonistes et des antagonistes. En bleu, les acides aminés impliqué dans la sortie du récepteur du réticulum endoplasmique. La topologie transmembranaire (TM) est de (de Keyzer et al., 1994). En jaune, le motif d'interaction GKC. En vert, motif d'interaction PKC.

Dans sa partie C terminale, il possède une séquence essentielle pour l'export du récepteur à la membrane (séquence FN(X)(2)LL(X)(3)L) : une mutation d'au moins un des cinq acides aminés hydrophobes entraîne la rétention du récepteur dans le réticulum endoplasmique (Figure 10) (Robert et al., 2005).

Le récepteur V_{1B} est structurellement plus proche du récepteur V_{1A}, cela s'exprimant par le fait que ces deux récepteurs sont couplés aux mêmes voies de signalisation.

Le site de liaison de l'antagoniste SSR149415 a été caractérisé grâce à une étude de structure-activité et de mutagenèse dirigée. L'étude réalisée par Derick et collaborateurs a montré que deux résidus, une méthionine en position 220 et une alanine en position 334 sont responsables de la sélectivité pharmacologique du SSR149415. Ainsi, en remplaçant les résidus correspondants aux positions 220 et 334 du récepteur V_{1A} par une méthionine et une alanine respectivement, l'affinité du SSR149415 et l'activation de la phospholipase C sont fortement augmentées dans ce récepteur V_{1A} muté (Derick et al., 2004).

3.3.3 Structure du récepteur V₂

La structure proposée du récepteur V₂ se base, notamment sur la diversité interspèce existante, et plus particulièrement, sur les différences entre humain et rat. Ainsi, il a été déterminé que la spécificité est définie par deux résidus localisés dans le septième domaine transmembranaire (Morel et al., 1993).

Le récepteur V₂ possède 371 acides aminés et présente un poids moléculaire d'environ 40 KDa. L'homologie de séquence entre les récepteurs humain, murin et rat est d'au moins 87%. Ce récepteur possède un site de glycosylation dans sa partie N-terminale extracellulaire, sur l'asparagine 22 pour les récepteurs V₂ des trois espèces et un second site de glycosylation sur l'asparagine 185 au niveau de la seconde boucle extracellulaire chez le rat et la souris.

Le récepteur V₂ ne possède pas de séquence DRY en comparaison avec les deux précédents récepteurs. Il a également été démontré que la troisième boucle intracellulaire était responsable de la liaison de la protéine G au récepteur V₂ (Birnbaumer, 2000) et que les résidus glutamine et glutamate en position 5 et 225 sont indispensables à l'activation de la protéine G. La lysine en position 268 quant à elle, est fondamentale dans la stimulation de la protéine G ainsi que le repliement du récepteur V₂ (Figure 11).

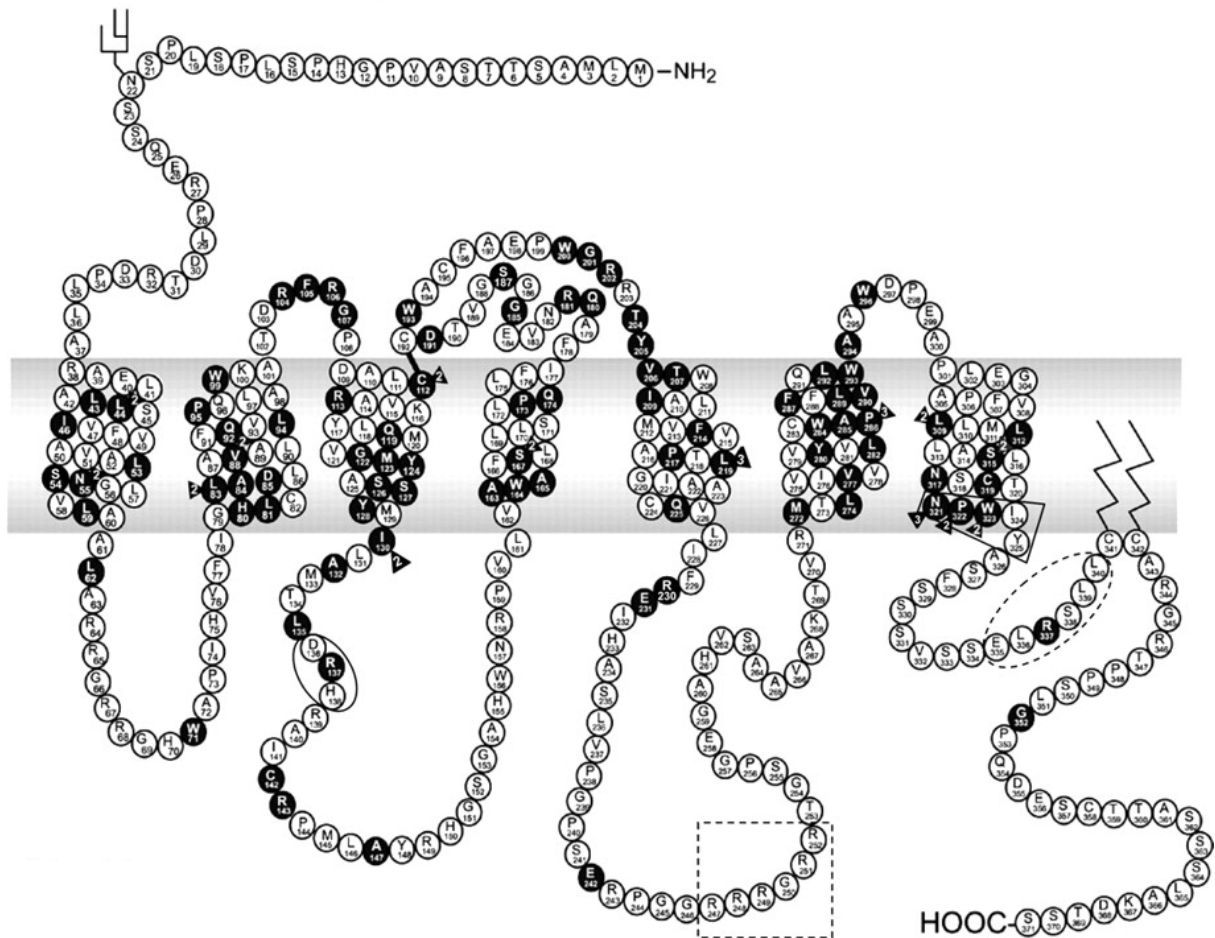


Figure 11 : Schéma en collier de perle du récepteur V_2 humain (Conn et al., 2007)

Les acides aminés en noir correspondent aux sites de mutations associés à des pathologies humaines. Les triangles indiquent des sites de mutation multiples

Dans ce récepteur, le résidu aspartate en position 103 situé dans la première boucle extracellulaire est essentielle pour la reconnaissance et la liaison des agonistes. En outre, il a été démontré que d'autres régions du récepteur jouent également un rôle dans la liaison des agonistes : la lysine en position 100 du second domaine transmembranaire, la leucine en position 202 dans la seconde boucle extracellulaire et la glycine en position 304 du septième domaine transmembranaire (Cotte et al., 1998).

Le gène du récepteur V_2 est porté par le chromosome X. De nombreuses mutations du récepteur V_2 ont été découvertes. Ces mutations sont responsables de pathologies rénales (diabète insipide néphrogénique) (Morello et al., 2000).

3.3.4 Structure du récepteur OT

Le récepteur de l'ocytocine est composé de 388 acides aminés chez le rat et la souris et 389 acides aminés pour le récepteur humain, son poids moléculaire est d'environ 42 KDa. L'homologie de séquence entre les trois récepteurs humain, murin et rat est d'environ 90%. Ces récepteurs possèdent deux sites de glycosylation en position 8 et 26. Le récepteur humain possède un site de glycosylation supplémentaire en position 15. Tous ces sites de glycosylation sont situés au niveau de l'extrémité N-terminale (Figure 12).

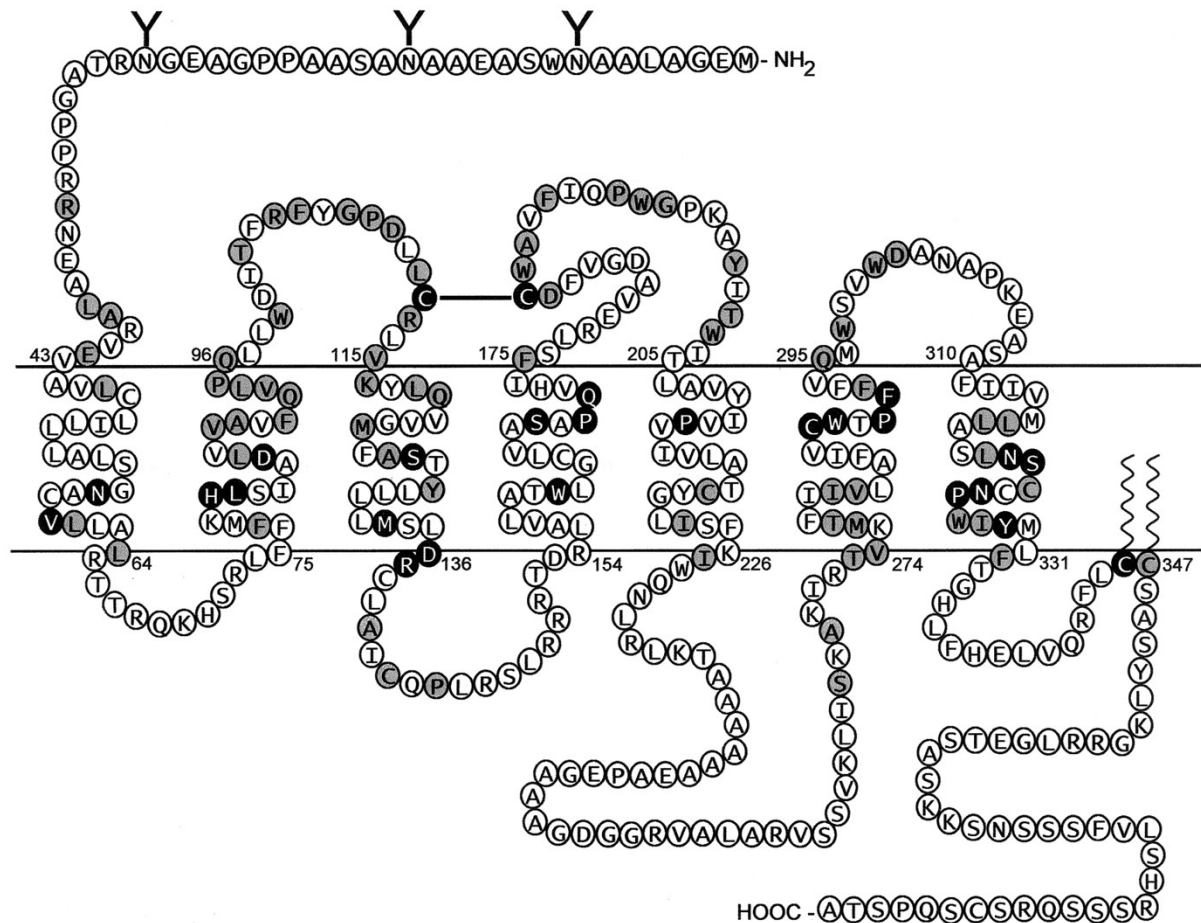


Figure 12 : Schéma en collier de perle du récepteur OT humain (Gimpl and Fahrenholz, 2001)

Les résidus conservés entre les récepteurs de la famille VP/OT sont surlignés en gris. Les résidus conservés pour l'ensemble des RCPG sont surlignés en noir. Les sites de N-glycosylation sont marqué « Y »

Par mutagenèse dirigée il a été possible de déterminer certaines zones actives du récepteur OT. Ainsi, une partie de l'extrémité N terminale ainsi que les boucles extra cellulaires E1 et E2 jouent un rôle important dans la liaison de l'hormone naturelle (Postina et al., 1996; Hawtin et al., 2001b). Plus précisément l'Arginine 1.27 ainsi que l'acide glutamique 1.35 (numérotation selon Ballesteros (Ballesteros et al., 2001)) sont 2 résidus clefs pour l'interactions avec l'OT (Wesley et al., 2002; Wootten et al., 2011). Notons que ces 2 acides aminés sont communs à

tous les récepteurs de la famille VP/OT et sont aussi importants pour la liaison de l'AVP (Rodrigo et al., 2007).

Enfin 2 acides aminés aromatiques situés dans les hélices V (Tyr 5.09) et VI (phénylalanine 6.09) sont en partie responsables de la sélectivité de couplage du récepteur OT à la voie de la phospholipase C. De façon intéressante on retrouve ces 2 acides aminés chez les récepteurs de la famille VP mais à des positions inversées. Cet échange expliquant le fait que l'AVP soit un agoniste partiel du récepteur à l'OT (Chini et al., 1996).

3.4 Voies de signalisation des récepteurs VP/OT

L'activation des RCPG implique une cascade d'événements cellulaires mettant en jeu un mécanisme commun reposant sur l'activation d'une protéine G. En 1983 a été purifiée la première protéine G (Northup et al., 1982). Les protéines G, ou *guanine nucleotide binding protein*, sont des GTPases hydrolysant le GTP en GDP. Elles sont constituées de 3 sous-unités (protéines G hétérotrimérique) : les sous unités α , β et γ .

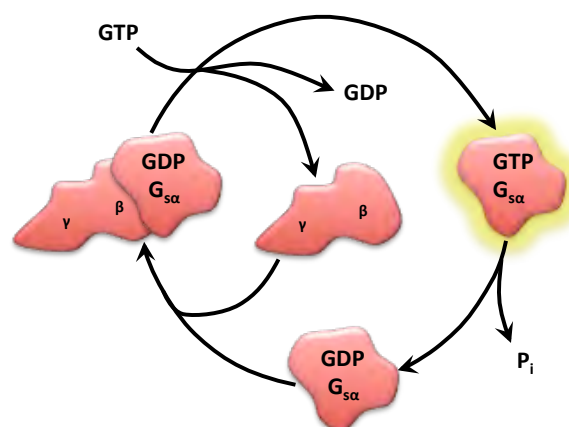
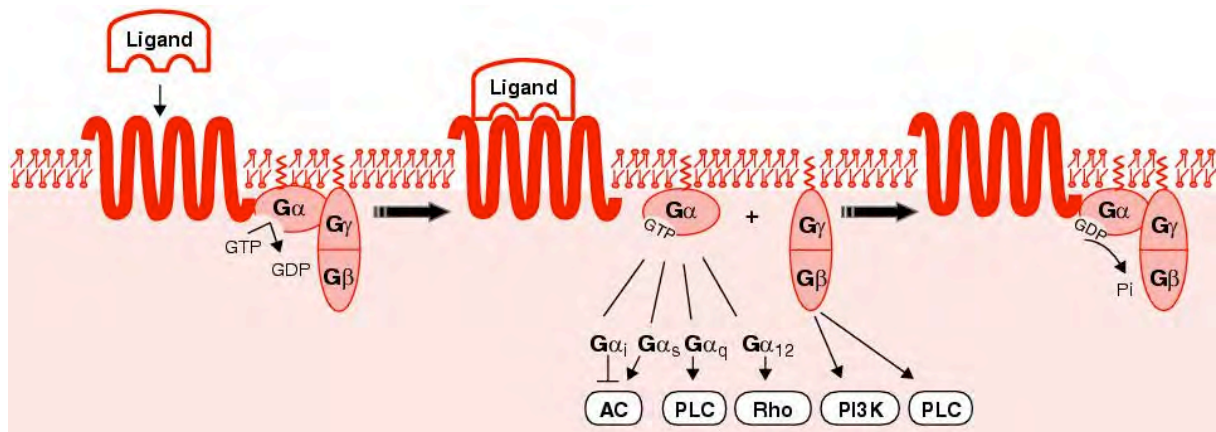


Figure 13 : Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques.

Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G en la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP à un état vide de nucléotide de haute affinité pour le récepteur. Selon le modèle classique, la liaison du GTP présent à haute concentration dans la cellule, entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur - protéine G et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$.

L'activation du récepteur par son agoniste, se traduit par des modifications structurales qui favorisent le couplage du récepteur à la protéine G (Figure 13).

Il en résulte une diminution de l'affinité de la sous-unité $G\alpha$ pour le GDP, qu'elle expulse. L'état de transition qui suit, bien qu'instable, n'en reste pas moins un état de haute affinité pour le récepteur. La fixation du GTP (présent à de hautes concentrations) au niveau de la sous-unité $G\alpha$ « libre » clôturera finalement cette première phase d'activation.

La conséquence majeure de l'échange GDP/GTP semble être une dissociation du complexe hétérotrimérique : $G\alpha$ -GTP et le complexe $G\beta\gamma$. Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs spécifiques tels que l'adénylate cyclase (AC), ou la phospholipase C (PLC).

Pour terminer le cycle, l'hydrolyse du GTP en GDP est assurée par l'action d'une GTPase et favorisée par l'activité GAP (GTPase activating protein) des RGS (Regulator of G-protein signaling).

Cette déphosphorylation met fin au signal d'activation. Le complexe $G\alpha\beta\gamma$ se recompose, stabilisant la liaison du GDP au niveau de la sous-unité $G\alpha$.

3.4.1 Voies de signalisation du récepteur V_{1A}

La stimulation du récepteur V_{1A} par la vasopressine provoque un changement structurel dans le récepteur qui lui permet de s'associer à une protéine de type $G\alpha_{q/11}$ ce qui va induire la liaison du GTP et l'activation de la PLC- β qui à son tour va hydrolyser spécifiquement le phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PIP_2) en inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG) par l'enzyme phospholipase C (Bocckino et al., 1985; Wange et al., 1991). L' IP_3 , en se fixant sur des récepteurs, ouvre des canaux ioniques situés sur le réticulum endoplasmique permettant ainsi le passage du calcium dans le compartiment cytoplasmique et donc l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Zhao and Brinton, 2002).

L'activation du récepteur V_{1A} peut également activer des canaux calciques voltage dépendant de type L (Byron and Luchessi, 2002). Dans ce cas, un influx calcique transmembranaire provoque une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dans les zones proches de la membrane via le processus de Calcium-induced, Calcium release. Il en résulte une vague calcique qui se propage ensuite dans toute la cellule. Cette action implique un couplage à la protéine $G\alpha_i$, car ce mécanisme est sensible à la toxine de *Bordetella pertussis* (Butta et al., 1993).

Ce mécanisme semble être stimulée par la dépolarisation de la membrane produite suite à l'inactivation des canaux K^+ , probablement par l'intermédiaire de la phospholipase D (PLD) (Byron and Lucchesi , 2002). Le DAG à son tour, active une protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle des substrats spécifiques de la sérine / thréonine (Figure 14)

De plus, l'interaction de l'AVP avec le récepteur V_{1A} provoque la stimulation de la PLD qui hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA), choline et phospholipase A2 (PLA2). Toujours dans la cascade de signaux induits par la vasopressine, ce récepteur entraîne l'activation de la *Mitogen activated protein kinase* (MAPK) p42/44, la phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) et des kinases dépendantes de calmoduline.

Le mécanisme d'activation nucléaire induit par le récepteur V_{1A} inclut l'induction de l'expression des gènes de réponse précoce tels que la synthèse de protéines qui peut provoquer l'hypertrophie cellulaire, l'augmentation de la teneur en protéines et la prolifération cellulaire.

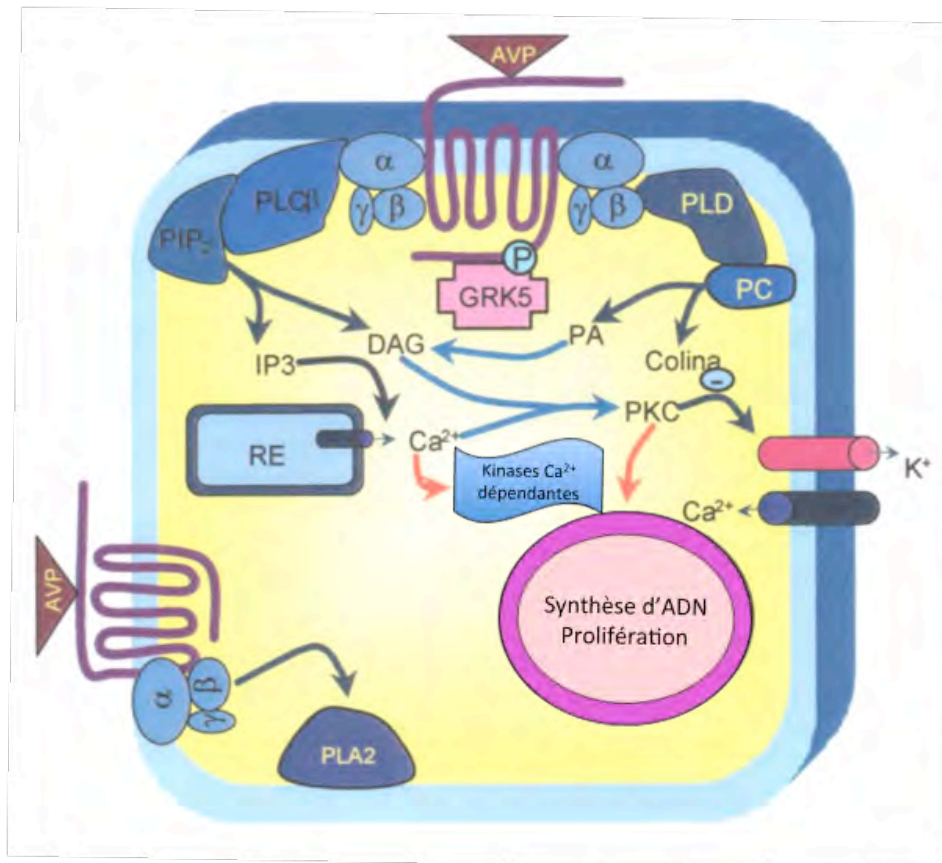


Figure 14 : Mécanisme d'activation du récepteur V_{1A}

Le mécanisme d'activation nucléaire induit par le récepteur V_{1A} inclut l'induction de l'expression des gènes de réponse précoce tels que la synthèse de protéines qui peut provoquer l'hypertrophie cellulaire, l'augmentation de la teneur en protéines et la prolifération cellulaire.

Les mécanismes intracellulaires qui favorisent l'élévation de la concentration en calcium permettent, fondamentalement, d'expliquer les effets glyco-génolytiques, vasoconstricteurs et sécrétoires régulés par le récepteur de V_{1A} (Exton, 1988; Gallo-Payet et al., 1991; Byron, 1996). Les différentes voies de signalisation impliquant l'activation des voies MAPK et PI3K permettent d'expliquer assez bien les réponses mitogéniques associées au récepteur V_{1A} dans les cellules glomérulées des glandes surrénales et dans les lignées cellulaires 3T3 et CHO (Rozenfurt et al., 1979; Geisterfer and Owens, 1989; Mazzocchi et al., 1993; Bhora et al., 1994; Ghosh et al., 2001).

3.4.2 Voies de signalisation du récepteur V_{1B}

La liaison de l'AVP au récepteur induit l'activation de la phospholipase C par une protéine $G\alpha_{q/11}$ (Thibonnier et al., 1997). La PLC provoque l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et DAG qui agissent comme des messagers secondaires au sein de la cellule (Figure 15). Les deux sont ensuite transformés pour reconstituer le substrat d'un nouveau cycle d'activation de la PLC.

Le composé hydrosoluble de la réaction de la PLC, le IP_3 , provoque la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Won and Orth, 1994). La membrane du RE contient un récepteur pour les IP_3 qui est couplé à l'ouverture des canaux de Ca^{2+} . Ce récepteur est un tétramère avec un haut degré de coopérativité nécessitant la liaison d' IP_3 avec au moins trois de ses quatre sous-unités avant l'ouverture du canal. Le résultat de ces événements est d'augmenter la concentration de calcium cytoplasmique, entraînant la propagation de l'effet dans le cytoplasme.

L' IP_3 est un second messager rapide, mais nécessite un mécanisme d'élimination puisque une augmentation prolongée de la concentration cytosolique de Ca^{2+} peut être toxique pour la cellule. Il existe deux types de voies qui provoquent la dégradation des IP_3 :

- Phosphatases spécifiques qui vont hydrolyser et libérer l'inositol. Ces enzymes sont inhibées par les ions de lithium. Ces ions sont très utiles dans l'étude du mécanisme de transduction, ainsi que dans la pharmacologie des différents types de récepteurs dans cette classe.
- Kinase spécifique qui produit l'inositoltetraphosphate (IP_4) qui est ensuite hydrolysé en inositol-1,3,4-triphosphate, isomère des IP_3 qui est incapable de déclencher la libération de Ca^{2+} . Cette kinase est calcium-dépendant et active l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique induite par l' IP_3 lui-même.

Le DAG est l'autre second messenger, il induit la translocation de la PKC directement à la membrane plasmique conjointement avec le calcium libéré à l'intérieur de la cellule (Liu et al., 1992). L'activation de cette PKC provoque la phosphorylation de différentes protéines cibles qui fonctionnent comme substrat de celui-ci et en définitive les réponses cellulaires, parmi lesquels principalement la libération d'ACTH.

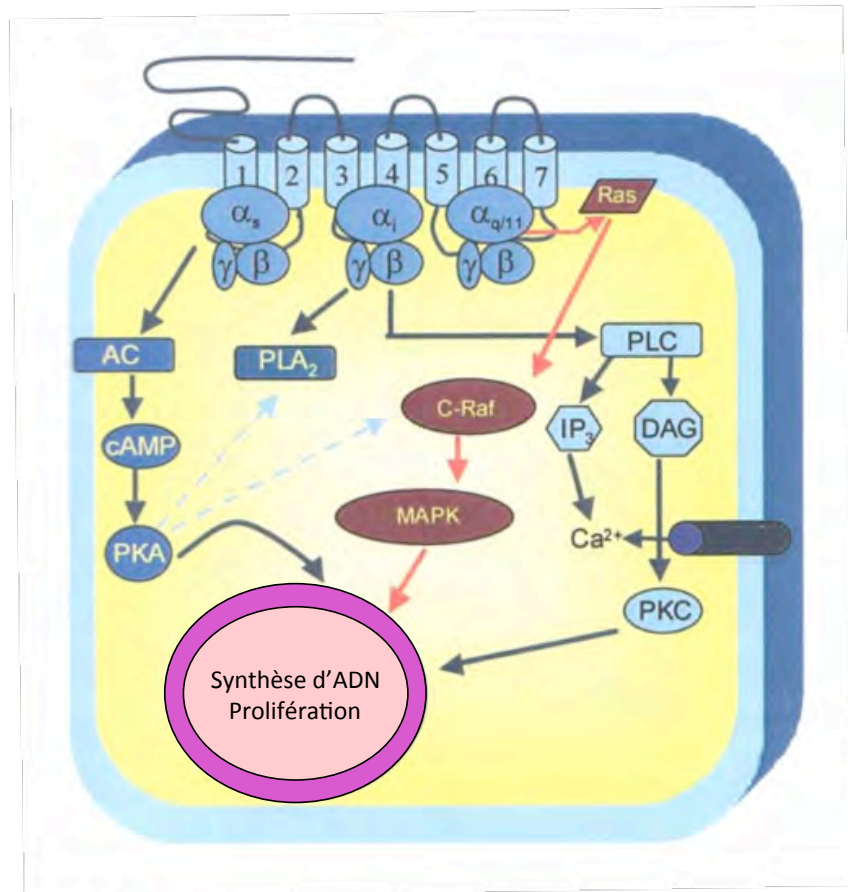


Figure 15 Mécanisme d'activation du récepteur V_{1B}

Par ailleurs, lorsque les niveaux d'expression du récepteur sur la membrane sont importants, le récepteur V_{1B} est en mesure d'activer une voie alternative qui provoque l'activation de la PKA, qui à son tour produit différentes réponses cellulaires au niveau de l'expression des gènes (Thibonnier et al., 1998). Cependant ces effets ne sont retrouvés que sur des cellules transfectées avec de très forts niveaux d'expression du récepteur V_{1B} et jamais sur culture primaire de cellules hypophysaires.

Une autre voie qui est activée par cette interaction hormone-récepteur est l'activation de la voie MAP kinases (Volpi et al., 2006), celle-ci se fait suite à l'activation de Ras et Raf, provoquant à la fin de la cascade une action mitogène de ce récepteur qui se manifeste dans le développement des tumeurs sécrétant l'ACTH.

3.4.3 Activation du récepteur V₂

Ce récepteur est exprimé principalement dans les reins au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tubule collecteur où il est responsable de la réabsorption de l'eau lors de l'antidiurèse. Il a également été retrouvé chez l'homme, dans les tumeurs hypophysaires (de Keyzer et al., 1998).

La liaison de l'AVP au récepteur V₂ provoque, après interaction avec la protéine G de type G_s, l'activation de l'adénylate cyclase, la production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A consécutivement, ceci va favoriser l'insertion de canaux d'eau (AQP2) dans la membrane cellulaire du tube collecteur du rein (Bichet, 1994) et ainsi, l'entrée d'eau à partir de la lumière cellulaire (Figure 16).

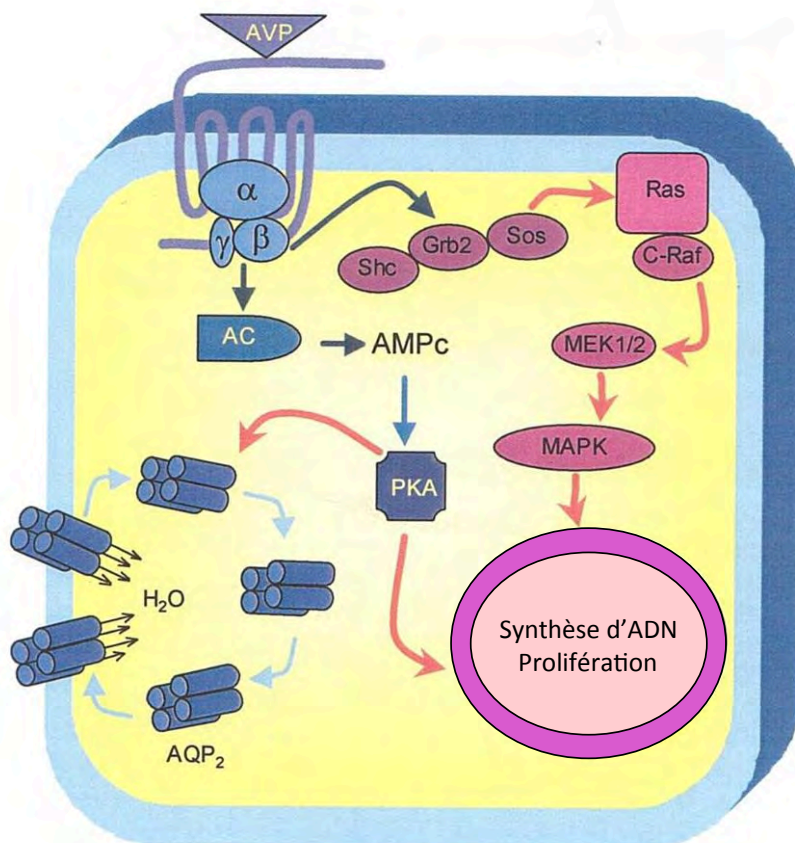


Figure 16 : Mécanisme d'activation du récepteur V₂

Dans ce sous-type de récepteur se produit également la voie d'activation de la phosphorylation de la MAPK de type ERK1 et ERK2 par l'activation d'une protéine G_s susceptible de développer une réponse mitogène (Thibonnier et al., 1998). Cette activation de la MAPK est régulée par l'interaction de la β -arrestine avec le récepteur (Tohgo et al., 2003), cette

interaction semble être indépendante de la production d'AMPc (Charest and Bouvier, 2003) et de la protéine G (Azzi et al., 2003) et pourrait être impliquée dans la polykystose rénale (Oligny-Longpré et al., 2012).

3.4.4 Activation du récepteur OT

Contrairement à l'AVP, l'ocytocine est connue pour avoir un seul type de récepteur. L'activation de ce récepteur conduit à trois mécanismes différents d'activation (Figure 17).

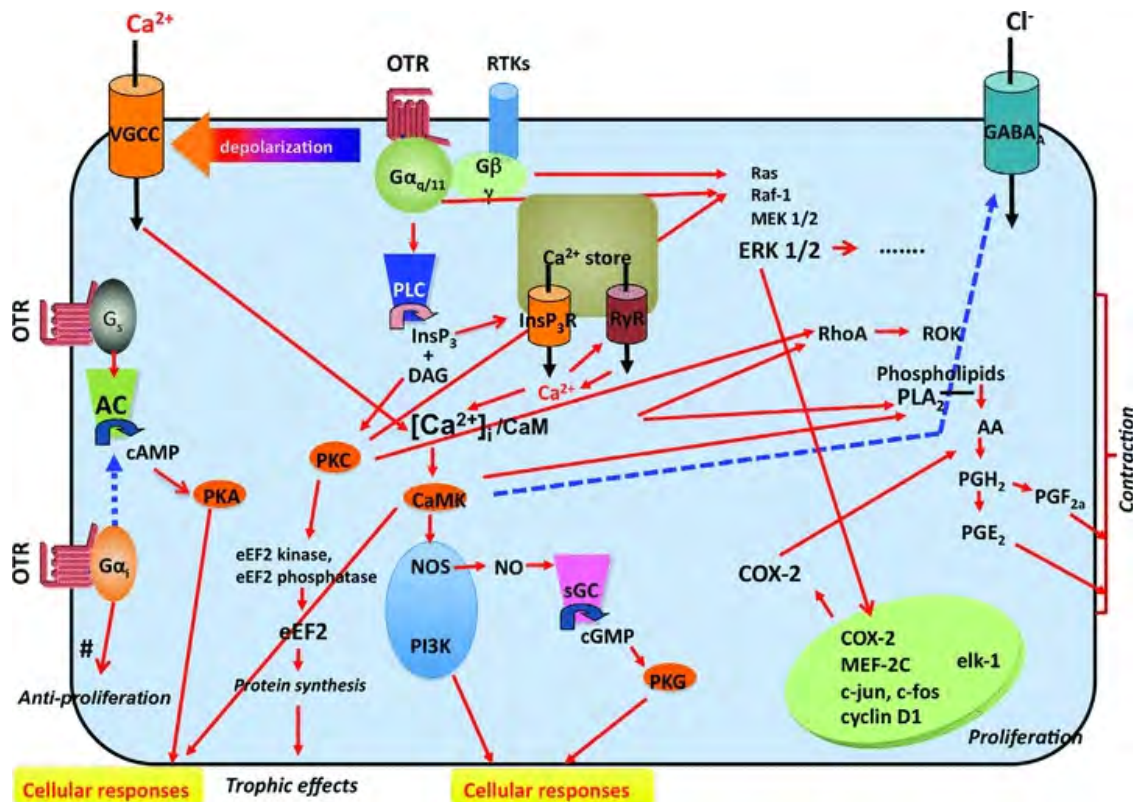


Figure 17 : Mécanisme d'activation du récepteur OT (Viero et al., 2010)

Le mécanisme majeur est régulé par la voie $G_q/PLC/IP_3$. Lorsque l'OT se lie à son récepteur, il active la protéine $G_{\alpha q/11}$ puis la phospholipase C (PLC), ce qui induit l'hydrolyse du PIP_2 en IP_3 et DAG. L' IP_3 induit à son tour la libération de Ca^{2+} . L'activation de la protéine G_q provoque également une dépolarisation membranaire qui provoquera en fin de cascade différentes réponses cellulaires telles que les contractions du muscle lisse. Le DAG quant à lui va activer la PKC et provoquera également différentes réponses cellulaires (Devost et al., 2008).

D'autres voies d'activation à travers le récepteur OT incluent les voies MAP kinases et Rho kinase (Rimoldi et al., 2003). L'augmentation de la transcription de COX 2 a pour effet d'augmenter la production de prostaglandine. L'activation des voies MAP kinase et Rho,

l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et l'augmentation de la sécrétion des prostaglandines, contribuent tous à l'effet contractile (Viero et al., 2010).

Le récepteur OT est également connu pour induire la prolifération. Cet effet prolifératif implique l'activation de la transcription d'un gène spécifique régulé par la voie MAP kinase (Zingg and Laporte, 2003).

Cependant, le récepteur OT est également couplé aux protéines G_s et G_i qui sont toutes les deux liées à la voie adénylate cyclase (AC) et peuvent l'inhiber, la G_i étant impliquée dans l'effet antiprolifératif du récepteur OT. Ces deux protéines G assure leurs fonctions en agissant sur la PKA (Busnelli et al., 2013)

3.5 Désensibilisation des RCPG et internalisation

L'activation d'un RCPG par un agoniste induit non seulement le déclenchement de voies de signalisation mais aussi une régulation de l'activité du récepteur. Cette régulation dite « négative » permet un contrôle de la durée d'activation de manière à éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. Pour être effective cette régulation nécessite un découplage physique entre le récepteur et la protéine G (Figure 18). Pour cela, le récepteur doit d'abord être phosphorylé sur des résidus sérine/thréonine, localisés dans son extrémité C-terminale.

Trois classes de protéines kinases susceptibles de réaliser cette phosphorylation se distinguent : les protéines kinases A ou C (PKA, PKC) activées par les seconds messagers (AMPC, calcium et DAG) qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel et les GRK (G protein Receptor Kinase) plus spécifiques des RCPG, qui phosphorylent le récepteur dans sa conformation active. Concrètement, cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la β -arrestine, qui prendrait la place de la protéine G sous le récepteur.

Cette étape de translocation marque l'arrêt de la signalisation cellulaire induite par le récepteur activé. Une fois à la membrane, la β -arrestine devient alors un partenaire essentiel de la machinerie d'endocytose en permettant la formation des puits recouverts de clathrine, qui sont indispensables à l'internalisation du récepteur.

L'endocytose des récepteurs joue un rôle dans la re-sensibilisation des récepteurs par la déphosphorylation, le recyclage des récepteurs, la down-régulation des récepteurs et leur signalisation. Deux classes de récepteurs se distinguent suivant la façon dont ils sont recyclés :

- Les récepteurs de classe A : La β -arrestine se fixe au récepteur phosphorylé avec une affinité relativement faible. Elle dirige le récepteur vers des puits de clathrine et se dissocie alors que le récepteur est internalisé. Le récepteur est rapidement recyclé. C'est le cas des récepteurs V_{1A} et V_{1B} (Terrillon and Bouvier, 2004; Perkowska données non publiées).
- Les récepteurs de classe B : La β -arrestine se fixe plus fortement au récepteur phosphorylé : elle ne se dissocie pas du récepteur alors que celui-ci est internalisé. Le complexe réside dans des vésicules endosomales avant d'être dirigé soit vers des lysosomes ou soit lentement à la surface. C'est le cas du récepteur V_2 (Terrillon and Bouvier, 2004).

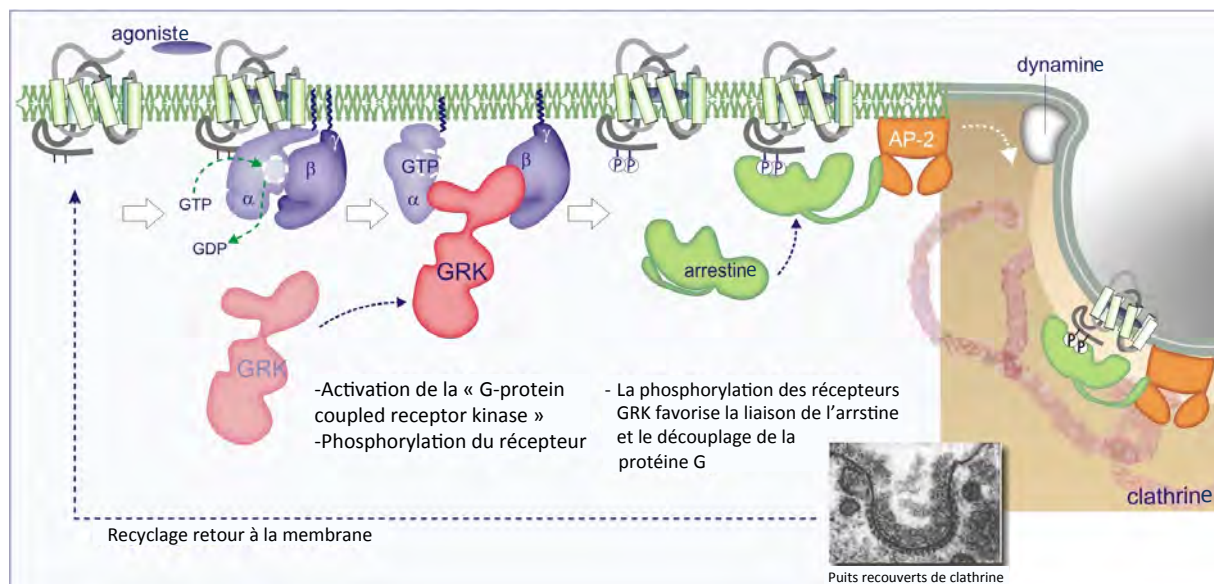


Figure 18 : Désensibilisation et signalisation d'un RCPG régulé par les GRK (Foreman et al., 2011)

Les ligands qui se lient au RCPG n'induisent pas uniquement l'activation de la protéines G mais permettent également aux GRK de phosphorylé le récepteur. Les phosphorylations par les GRK induisent la liaison de l'arrestine qui provoque la dissociation de la protéine G et l'internalisation du récepteur via l'endocytose régulée par les clathrines.

L'activation des voies de recyclage dépendantes de la β -arrestine peut entraîner l'activation d'autres cascades des signaux intercellulaires, comme la voie des MAP kinases (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Ainsi, un récepteur selon son niveau d'association avec les protéines partenaires, peut activer des cascades de transduction distinctes. La liaison de la β -arrestine sur le récepteur phosphorylé empêche la signalisation dépendante des protéines G. Elle initie de nouvelles voies de transduction, comme la voie des MAP kinases.

4. Actions physiologiques et physiopathologiques de l'AVP et l'OT

4.1. Actions périphériques de l'AVP et de l'OT

4.1.1 Localisation des récepteurs VP/OT dans les tissus périphériques

A. Distribution périphérique du récepteur V_{1A}

La majorité des effets physiologiques induits par l'AVP sont liés à l'activité du récepteur V_{1A} . L'étude des voies de signalisation couplées à la stimulation des récepteurs V_{1A} a été réalisée principalement dans les tissus qui expriment naturellement ce sous-type de récepteur (le foie, les cellules musculaires lisses ou du cortex surrénalien), mais aussi grâce à son expression stable dans certaines lignées cellulaires (3T3, A10 ou WRK-1). Le récepteur V_{1A} s'exprime aussi dans d'autres tissus et organes parmi lesquels les plaquettes, les reins, les organes reproducteurs, la rate, les adipocytes, les lymphocytes, les monocytes, les pneumocytes de type II et d'autres lignées cellulaires (A7r5 et CHO) (Thibonnier et al., 2001).

B. Distribution périphérique du récepteur V_{1B}

Ce récepteur est exprimé principalement au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure et intervient dans la régulation de la sécrétion d'ACTH. La plupart des données concernant les mécanismes de transduction du récepteur V_{1B} ont été obtenus dans ce type de cellule. Des transcrits de ce récepteur ont également été retrouvés dans de nombreux tissus (pancréas, glande surrénale etc.) (de Keyzer et al., 1994).

C. Distribution périphérique du récepteur OT

Ce récepteur a été localisé dans différents types de cellules telles que les cellules myoépithéliales de la glande mammaire, les cellules du muscle lisse utérin, les cellules endothéliales vasculaires, les ostéoblastes, trophoblaste, myoblastes et certaines lignées cellulaires (Breton et al., 2001, 2002).

4.1.2 Actions des récepteurs V_{1A} et le V_{1B} dans les tissus périphériques

Les récepteurs V_{1A} et V_{1B} sont exprimés dans de nombreux tissus périphériques. Les études génétiques sur les corrélations entre les variations du gène du récepteur V_2 et les phénotypes obtenus chez l'homme ont amélioré notre compréhension des fonctions du récepteur V_2 *in vivo* et *in vitro*. Contrairement aux récepteurs V_2 , moins d'études génétiques réalisées chez

l'homme concernant les récepteurs V_{1A} et V_{1B} sont disponibles. Par contre, ces études sont accessibles chez la souris et permettent de mieux appréhender *in vivo* le rôle physiologique de ces récepteurs.

A. Fonctions cardiovasculaires

Un large éventail des fonctions de l'AVP dans le système cardiovasculaire a été étudié dans les conditions normales et pathologiques. Les rôles complexes de l'AVP dans la régulation de la fonction circulatoire, sont régulés par ses récepteurs dans de plusieurs tissus cardiovasculaires et extra-cardiovasculaires (Johnston, 1985).

En effet, la vasopressine est une hormone essentielle à l'homéostasie de la pression artérielle. Ainsi, une hémorragie peut entraîner une augmentation de la concentration de vasopressine circulante de 20 à 200 fois, celle-ci induit une profonde vasoconstriction, ce qui permet de maintenir la perfusion des organes. Cependant, dans des conditions physiologiques normales, la contribution des récepteurs V_{1A} à cette homéostasie de la pression artérielle demeure assez faible, ceci est dû au fait que la concentration d'AVP plasmatique reste inférieure à celle nécessaire pour activer la réponse vasopressive, régulée par le récepteur V_{1A} (Arban, 2007; Augustin et al., 2010).

Il faut noter que la vasopressine n'est pas la seule hormone vasoconstrictrice de l'organisme, en conditions physiologiques normales, l'angiotensine et l'adrénaline sont les principaux vasoconstricteurs chez les mammifères. Chez l'homme, l'AVP n'agirait qu'en cas d'hémorragie sévère (Ryckwaert and Colson, 2005).

Il est toutefois devenu clair que les récepteurs de l'AVP situés à l'extérieur des organes cardiovasculaires jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la pression artérielle. L'AVP est impliquée dans l'homéostasie cardiovasculaire en régulant : 1) la pression artérielle systémique et le tonus vasculaire, 2) Le réflexe barorécepteur (baroreflexe) et la stimulation du nerf sympathique dans le SNC, 3) la fonction cardiaque, 4) La fonction rénale, et 5) l'interaction avec d'autres hormones (pour revue (Nakano, 1973; Liard, 1984; Johnston, 1985; Share, 1988; de Wardener, 2001; Holmes et al., 2003).

Dans le cas d'une insuffisance cardiaque congestive, la concentration plasmatique de vasopressine augmente. Une administration de conivaptan (antagoniste mixte de récepteur V_{1A}/V_2) induit des effets bénéfiques dans le traitement de l'insuffisance cardiaque congestive et ce dans plusieurs études chez l'homme. La double action de cet antagoniste favorise l'excrétion d'eau (composante liée à l'antagonisme du récepteur V_2) ainsi que la vasodilatation des cellules

musculaires lisses (composante liée à l'antagonisme du récepteur V_{1A}) (Burnier et al., 1999). Le conivaptan est utilisé en essai clinique pour traiter l'insuffisance cardiaque. Cependant d'autres études sont nécessaires pour vérifier son efficacité et sa sécurité à long terme.

B. Fonction rénale

En plus de l'expression du récepteur V_2 , les récepteurs V_{1A} et V_{1B} sont également présents dans le rein (Inoue et al., 2001). Le récepteur V_{1B} peut être exprimé dans la zone médullaire interne de rein de rat (Guillon G., données non publiées), bien que son rôle fonctionnel reste à préciser. Plusieurs études ont montré que le récepteur V_{1A} régule les fonctions de l'AVP dans divers zones du rein, y compris la zone glomérulaire rénale, la zone médullaire rénale ainsi que la vascularisation rénales (Acher and Chauvet, 1953; Bankir et al., 2005).

En effet, il a été proposé que les récepteurs V_{1A} régulent l'activité antidiurétique rénale via les effets pressiques de la vasopressine sur le flux sanguin rénal (cf Actions régulées par le récepteur V_2).

Plus important encore, le récepteur V_{1A} a également été retrouvé dans la médulla et le cortex de l'épaisseur ascendante de l'anse de Henle et dans la cortex, la médulla externe et la médulla interne du canal collecteur dans le rein (Acher and Chauvet, 1953; Aguilera et al., 1983; Ando et al., 1991; Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000), suggérant son implication dans la régulation de l'homéostasie des fluides corporels (Inoue et al., 2001).

C. Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien ou axe corticotrope

L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie basale et liée au stress. Parmi les tissus périphériques participant à l'axe HHS, les récepteurs V_{1B} sont exprimés dans l'hypophyse antérieure et la médullosurrénale, les récepteurs V_{1A} dans le cortex surrénalien, tandis que le récepteur OT se trouve dans une population minoritaire de cellules de l'hypophyse antérieure. Ainsi, les fonctions de l'axe HHS peuvent être modulée au niveau de plusieurs sites par l'AVP ou l'OT. Cependant, les détails de l'importance physiologique de chaque récepteur doivent encore être précisés.

L'hypothalamus contrôle la sécrétion d'ACTH de l'hypophyse antérieure par la libération de la corticolibérine (CRF) et d'AVP. L'ACTH à son tour, stimule la sécrétion de glucocorticoïdes du cortex surrénalien. Concernant la médullosurrénale, il a été démontré récemment que les conditions de stress pouvaient modifier leur structure et leur fonctionnement

notamment via l'expression différentielle de certaines connexines (Guérineau and Desarménien, 2010).

Les glucocorticoïdes de la surrénale, la corticostérone chez les rongeurs et le cortisol chez les humains régulent un large éventail de fonctions physiologiques tant dans des conditions basales que dans des conditions de stress (Antoni, 1993; Aoyagi et al., 2009). La sensibilité de l'axe HHS à des stimuli entrants est modulée par un système de feedback négatif, qui est inhibée par les glucocorticoïdes eux-mêmes (Figure 19).

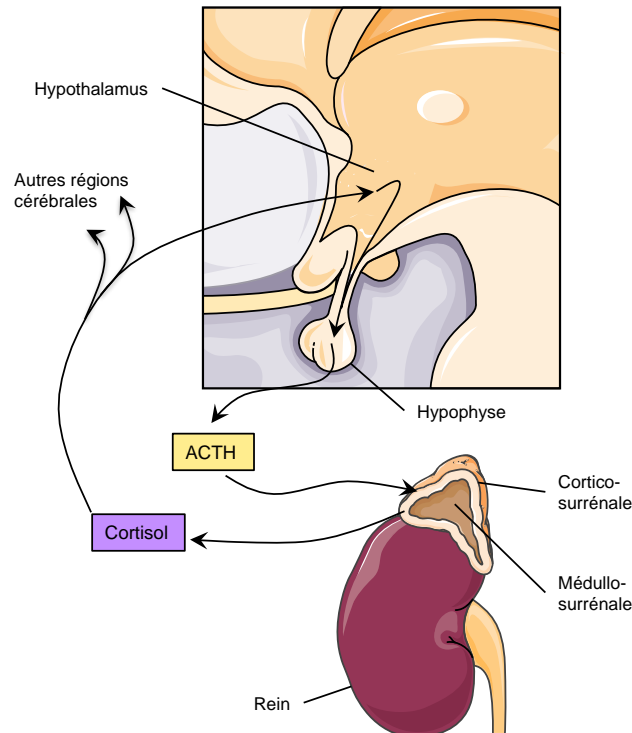


Figure 19 : Localisation et structure du néphron. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein.

Pour le contrôle de la sécrétion d'ACTH, le CRF et l'AVP agissent en synergie sur des cellules spécialisées, les cellules corticotropes, dans l'hypophyse antérieure (Aguilera et al., 1983, 2008; Alexander et al., 1997; Abu-Basha et al., 2002; Albizu et al., 2007).

La sécrétion d'ACTH de l'hypophyse antérieure induite par l'AVP est régulée par le récepteur V_{1B} (Baertschi and Friedli, 1985; Antoni, 1993). Cette action hypophysaire de la vasopressine est effectuée de façon concomitante avec l'action du CRF (Gaillard et al., 1984).

D. Fonction surrénalienne

En plus de la production centrale d'AVP dans l'hypothalamus, il a été démontré que l'AVP est synthétisé à partir de son précurseur, la prépro-AVP, dans plusieurs tissus, y compris

les ovaires, les testicules, l'utérus, le thymus, le pancréas et la médullo-surrénale (Bai et al., 1996).

La glande surrénale est une glande endocrine impliquée dans les mécanismes de stress. Elle est composée de deux parties : la partie corticale et la partie médullaire.

La partie corticale responsable de la synthèse de corticostéroïdes (glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes) et de l'aldostérone (Barberis et al., 1992; Birumachi et al., 2007), se divise elle-même en 3 parties : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée (Figure 20). En agissant sur le récepteur V_{1A} de cette zone, l'AVP augmente l'activité mitogène de la zone glomérulée dans la corticosurrénale de rat (Payet and Isler, 1976; Payet et al., 1984; Bankir et al., 2005).

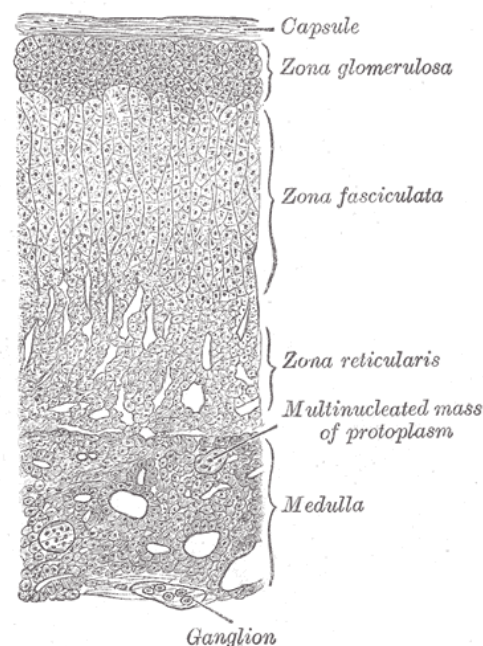


Figure 20 : Représentation d'une coupe histologique de surrénale

La zone médullaire quand à elle est composé de cellules chromaffines qui sont innervées par le nerf splanchnique. Des axones font une synapse sur ces cellules, et une stimulation avec l'acétylcholine déclenche la sécrétion de catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Cette zone exprime les récepteurs V_{1A} et V_{1B} qui induisent la libération des catécholamines par l'activation de la PLC (Grazzini et al., 1998; Mazzocchi et al., 1997). Les récepteurs V_{1B} présents dans cette zone pourraient être impliqués dans une sécrétion locale d'ACTH. De plus, la synthèse locale de vasopressine dans cette zone est responsable d'un mécanisme de régulation autocrine/paracrine des cellules chromaffines (Guillon et al., 1998) et de ce fait est impliquée dans une régulation du niveau basal de sécrétion de catécholamines.

E. Synthèse protéique et prolifération cellulaire

L'AVP est connu également pour être impliquée dans la régulation de différentes fonctions métaboliques tels que le renouvellement des protéines, la croissance et la prolifération cellulaire et transport du glucose, principalement par le biais des récepteurs V_{1A} ou V_{1B} (Trejter et al., 2005; Alonso, 2009; Alonso et al., 2009)

L'AVP induit la croissance et la prolifération par la stimulation de la synthèse de protéines dans plusieurs types cellulaires. Cette prolifération est induite par le récepteur V_{1A} . L'AVP n'est pas seulement responsable de la prolifération et la croissance mais aussi de la régénération d'organe (Nicou et al., 2003; Trejter et al., 2005), plus précisément la régénération hépatique chez le rat (Russell and Bucher, 1983).

Au niveau hépatique l'AVP est responsable également de nombreuses autres actions, on peut citer la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Exton, 1988), la régulation du flux biliaire (Nathanson et al., 1992; Serrière et al., 2001) et la régulation de la synthèse de l'urée (Drew et al., 1985).

Ces actions sont toutes régulées par le récepteur V_{1A} qui est présent à de très fortes concentrations dans les hépatocytes.

F. Homéostasie du glucose

L'AVP et des extraits de neurohypophyses sont connus pour augmenter le niveau de glucose dans le sang par l'augmentation directe de la glycogénolyse dans le foie (Clark, 1928; BERGEN et al., 1960) et en favorisant la libération de glucagon (Dunning et al., 1984; Yibchok-anun and Hsu, 1998). D'autre part, l'AVP provoque la libération d'insuline par les îlots pancréatiques (Kaneto et al., 1967), qui neutralise partiellement l'effet de l'augmentation d'AVP induite par le glucose dans le sang. La glycogénolyse hépatique induite par l'AVP est régulée principalement par le récepteur V_{1A} (Jard, 1981; Morel et al., 1992), et la libération d'insuline induite par l'AVP au niveau des cellules β ou la libération de glucagon par les cellules α du pancréas est régulée par le récepteur V_{1B} (Richardson et al., 1990; Oshikawa et al., 2004; Bosch and Neumann, 2008). Une autre étude sur des souris $V_{1B}R$ -KO et des antagonistes du récepteur V_{1B} ou OT a indiqué que le récepteur OT est probablement impliqué dans la libération de glucagon induite par l'AVP (Fujiwara et al., 2007). Bien que l'AVP soit bien reconnu comme une hormone antidiurétique et vasoconstrictrice, ces résultats suggèrent que l'accumulation de cette hormone joue plusieurs rôles dans la régulation de la concentration de glucose dans le sang.

Bien que les détails des actions de l'AVP sur l'homéostasie du glucose via les récepteurs V_{1A} , V_{1B} , V_2 et OT n'ont pas encore été pleinement élucidés, les études récentes ont contribué, cependant, de manière significative à la compréhension des rôles importants joués par l'AVP et les récepteurs V_{1A}/V_{1B} dans la tolérance au glucose.

G. Fonctions immunitaires

L'AVP et l'OT ne sont pas présents uniquement dans le système neuroendocrinien, mais aussi dans les tissus immunitaires tels que le thymus chez les humains et les rats, d'ailleurs le récepteur OT est dominant dans le thymus (Moll et al., 1988; Geenen et al., 1998).

L'OT et l'AVP sont également exprimés dans les cellules spléniques éosinophiles de souris (Kumamoto et al., 1995). En ce qui concerne les récepteurs de l'AVP et de l'OT exprimés dans les tissus immunitaires, les sites de liaison à l'OT ont été détectés dans le thymus de rat et dans les thymocytes (Elands et al., 1988), les récepteurs V_{1A} et V_{1B} ont été détectés dans des préparations membranaires spléniques de rats et les lymphocytes spléniques (Elands et al., 1990). Afin de déterminer l'importance du récepteur V_{1A} dans le développement et la fonction du système immunitaire, les souris KO aux récepteurs ont été générées et étudiées. Ces études indiquent que le récepteur V_{1A} peut réguler négativement l'activation des lymphocytes B. Ce récepteur semble jouer un rôle dans la régulation du développement des cellules B-1 et B-2 (Hu et al., 2003). Cependant sa contribution à une pléthore de facteurs qui agissent comme des modulateurs immunitaires reste toujours méconnu.

4.1.3. Actions régulées par le récepteur V_2

Le rôle antidiurétique de la vasopressine est certainement le plus étudié à ce jour ce qui a permis une meilleure compréhension de celui-ci. Ainsi, l'AVP est un élément clé dans le maintien de l'équilibre hydrominéral par son action sur la réabsorption de l'eau dans le rein (pour revue Bichet, 1994, 2006).

La vasopressine est libérée par les neurones magnocellulaires dans la circulation sanguine au niveau de la neurohypophyse puis transportée vers le rein, où elle exerce un rôle endocrinien direct sur le néphron qui est l'unité fonctionnelle rénale.

Le rôle de la vasopressine dans le néphron est d'augmenter la réabsorption de l'eau par un mécanisme de concentration d'urée. Chez les mammifères, la disposition des néphrons est fondamentale car elle permet l'activation des mécanismes qui conduisent à la concentration de l'urine.

Le site d'action de la vasopressine dans le néphron est principalement le tube collecteur. En situations d'antidiurèse, la vasopressine induit la réabsorption de l'eau dans la portion corticale et médullaire externe du tube collecteur sous l'effet de l'augmentation de la perméabilité à l'eau de la paroi dudit conduit. La réabsorption de l'eau est causée par l'existence d'un gradient de pression osmotique transépithélial qui permet aux molécules d'eau d'être réabsorbés par simple diffusion. Le rôle de la vasopressine dans ce mécanisme se limite à augmenter la perméabilité épithéliale et à faciliter le passage de l'eau de la zone lumineuse à la zone interstitielle, ce qui induit une concentration directe de l'urée.

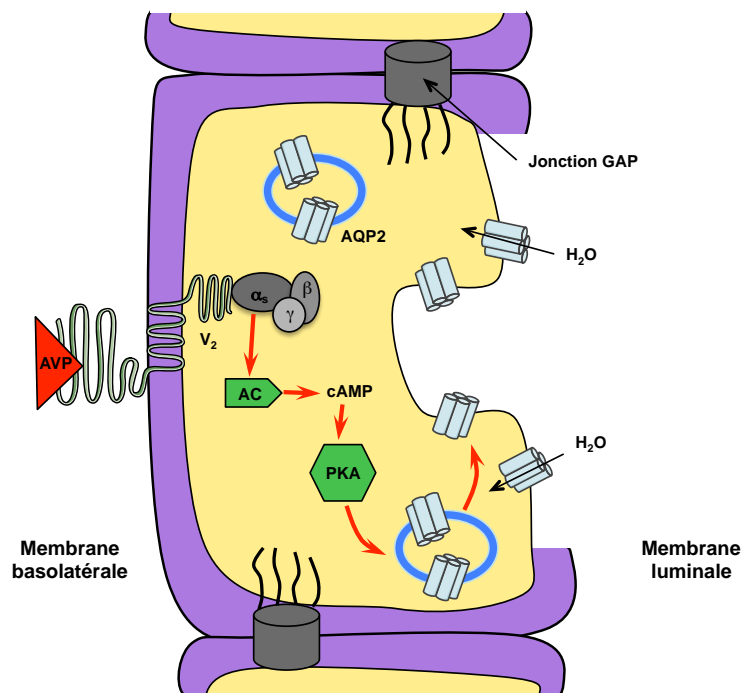


Figure 21 : Mécanisme cellulaire d'action de la vasopressine dans une cellule principale du conduit collecteur du néphron

L'augmentation de la perméabilité de l'eau en conditions d'antidiurèse se fait par le biais de l'interaction entre la vasopressine et le récepteur V_2 localisé principalement sur la face externe des néphrons dans le rein.

Lors de la liaison de l'AVP au récepteur V_2 , il se produit une stimulation de l'adénylate cyclase (AC) qui convertit l'ATP intracellulaire en AMP cyclique (AMPc) augmentant ainsi la concentration intracellulaire de ce second messenger. La cascade de processus biochimiques stimulés par l'AMPc provoque la modification de la position des deux microtubules et des

microfilaments du cytosquelette, qui à leur tour induisent la fusion des vésicules avec la membrane luminale. Les vésicules de fusion contiennent en leur sein des canaux d'eau appelés aquaporines qui permettent la réabsorption de l'eau en fonction du gradient osmotique entre l'intérieur de la cellule et l'espace extracellulaire (Figure 21) (Nielsen and Agre, 1995).

Outre la réabsorption de l'eau, l'AVP est impliqué dans l'excrétion du sodium, du chlore, du potassium et de l'urée, ainsi que dans la régulation de l'équilibre acido-basique (Bankir et al., 2005).

L'action de l'AVP sur la réabsorption de l'eau est essentielle, mais elle induit d'autres effets dans les différentes structures du rein, ces effets contribuent tous à un degré plus ou moins important dans la concentration de l'urée. Ces effets s'exercent sur les cellules vasculaires du muscle lisse, les cellules interstitielles et d'autres segments du néphron. Les effets de l'AVP sur ces types de cellules ne sont pas uniformes et dépendent des caractéristiques spécifiques de chaque type de cellule.

De plus, la vasopressine présente un rôle prolifératif non négligeable. Ainsi, selon Alonso et al 2009, il a été démontré qu'une augmentation de la vasopressine circulante stimule la prolifération de cellules tubulaires au niveau rénal via le récepteur V_2 . Une étude plus récente (Oligny-Longpré et al., 2012) a démontré quant à elle que l'implication de ERK1/2 dans la prolifération cellulaire suite à la stimulation du récepteur V_2 , nécessitait des mécanismes d'activations du récepteur de l'IGF (*Inslin-like Growth Factor*). Ces mécanismes peuvent avoir des implications non négligeables en ce qui concerne la physiopathologie rénale tel que la polykystose rénale qui se caractérise par l'augmentation de la vasopressine circulante.

De nombreuses mutations du récepteur V_2 causant le diabète insipide néphrogénique sont dues à un mauvais repliement de la protéine et à une rétention du récepteur au niveau du réticulum endoplasmique. Des antagonistes non peptidiques du récepteur V_2 permettent la réexpression des récepteurs mutés à la surface et ainsi permettent à la vasopressine d'agir et de réduire le volume urinaire. Ces molécules jouent le rôle de chaperone pharmacologique. En pénétrant à l'intérieur de la cellule, elles permettent aux récepteurs qui sont retenus dans le réticulum de passer le «contrôle qualité», et d'être réexprimés à la membrane. Parmi elles, le relcovaptan (SR49059) est une molécule très prometteuse pour traiter cette pathologie (Morello et al., 2000; Bernier et al., 2004, 2006).

Les mutations de l'aquaporine 2 (AQP2) entraînent, comme pour le récepteur V_2 une mauvaise conformation de la protéine. Les AQP2 mal repliées ne sont donc pas acheminées à la membrane.

Le diabète insipide d'origine centrale est lié à une carence de synthèse ou de sécrétion de l'AVP par l'hypothalamus. Dans la plupart des cas, il est causé par une tumeur de la région hypothalamo-hypophysaire. Les cas de diabète insipide neurogénique d'origine familiale sont assez rares. Ils sont alors causés par une mutation de gène de la vasopressine. Les mutations peuvent se trouver au niveau de l'exon codant pour la vasopressine ou la neurophysine II. Elles peuvent résulter en des mutations gain de fonction, perte de fonction ou encore en un mauvais repliement de la protéine dans les neurones magnocellulaires. Le rat Brattleboro est le modèle d'étude du diabète insipide central : il possède une mutation au niveau de l'exon 2 et ne sécrète pas de vasopressine.

La desmopressine (dDAVP) est un analogue structural de la vasopressine caractérisé depuis plus de trente ans. Ses propriétés antidiurétiques lui permettent d'être utilisée dans le traitement du diabète insipide d'origine centrale, mais également dans le traitement de l'énurésie nocturne. La dDAVP est 4 fois plus efficace que la vasopressine en terme d'activité antidiurétique. Cependant, la dDAVP est un agoniste mixte des récepteurs V_2 et V_{1B} et peut donc présenter des effets liés à l'activation du récepteur V_{1B} . Il est donc nécessaire de caractériser de nouveaux agonistes plus sélectifs.

4.1.4. Fonctions associées au récepteur OT

L'ocytocine est connue pour être l'hormone responsable de l'éjection de lait pendant la lactation chez les mammifères. Elle est indispensable à la lactation puisque les souris dont le gène codant pour l'ocytocine ou pour son récepteur est inactivé, sont incapables d'allaiter (Nishimori et al., 1996, 2008).

De plus, l'ocytocine est l'agent utérotonique le plus puissant connu à ce jour. Ainsi, elle agit sur les cellules du muscle lisse de l'utérus pour produire la contraction myométriale rythmique au moment de l'accouchement. Cette contraction déclenche une augmentation du calcium intracellulaire ce qui mène à la phosphorylation de l'appareil cellulaire contractile. D'ailleurs, avant la parturition, la quantité de récepteurs de l'ocytocine augmente dans l'utérus (Lefebvre et al., 1992). L'ocytocine n'est cependant pas essentielle à la parturition puisque les souris dont le gène codant pour l'ocytocine ou son récepteur est invalidé donnent naissance de façon normale (Nishimori et al., 1996, 2008).

Il a été démontré que l'ocytocine est impliquée dans la stimulation de la libération de l'ACTH à partir de la glande hypophysaire antérieure, là où les deux récepteurs V_{1B} et OT sont exprimés (Schlosser et al., 1994; Nakamura et al., 2008). Ainsi l'ocytocine stimule la sécrétion

d'ACTH chez les souris WT et V_{1B}R-KO et cette libération d'ACTH est significativement inhibée par l'antagoniste sélectif du récepteur V_{1B}, le SSR149415 et par l'antagoniste du récepteur OT chez la souris WT, le CL-14-26. Les résultats obtenus suggèrent que l'OT induit la libération d'ACTH via les récepteurs OT et V_{1B}, alors que l'AVP induit la libération d'ACTH uniquement via le récepteur V_{1B}. Ainsi le système ocytocine serait capable de pallier au manque de récepteurs V_{1B} chez le rat.

L'ocytocine présenterait également, comme la vasopressine, un effet sécrétoire induisant de fait la sécrétion du peptide atrial natriurétique (ANP) qui a pour effet de ralentir le cœur, de diminuer sa force de contraction et donc de réduire le flux sanguin (Gutkowska et al., 1997). L'ocytocine peut induire également la sécrétion d'insuline et de glucagon au niveau pancréatique, la première étant médiée par le récepteur V_{1B} (Lee et al., 1995) alors que le second est médié par le récepteur OT (Yibchok-anun and Hsu, 1998; Birumachi et al., 2007).

Il a également été démontré que le récepteur de l'ocytocine est présent sur les cellules endothéliales, induisant une réponse proliférative (Thibonnier et al., 1999), mais également au niveau des cellules myométriales et des léiomyomes (Busnelli et al., 2010) ainsi que les ostéoblastes (Copland et al., 1999) c'est pourquoi les souris dont les gènes codant pour l'ocytocine ou son récepteur sont inactivés présentent une profonde ostéoporose (Tamma et al., 2009).

A travers ces données, nous avons pu voir que la vasopressine et l'ocytocine sont deux hormones entrant dans la régulation de nombreux processus physiologiques. Ces deux hormones présente également des effets au niveau central, affectant le comportement.

4.2 Actions centrales de l'AVP et de l'OT

De nombreux travaux ont été effectués ces dernières années afin d'étudier le rôle des hormones neurohypophysaires dans plusieurs comportements-type.

En effet, l'AVP ne fonctionne pas seulement comme une hormone périphérique, mais aussi comme un neuropeptide qui est capable d'influer sur un large éventail de fonctions cérébrales telles que le comportement social, l'émotivité, l'apprentissage et la mémoire, et la thermorégulation (de Wied et al., 1993; Frank and Landgraf, 2008). Les études sur la localisation spécifique à l'espèce des récepteurs centraux de l'AVP, ainsi que la manipulation génétique de l'expression des récepteurs dans des modèles animaux ont considérablement fait progresser notre compréhension des effets de l'AVP sur le comportement.

4.2.1. Localisation des récepteurs VP/OT au niveau central

A. Distribution centrale du récepteur V_{1A}

La localisation des récepteurs V_{1A} dans le cerveau a été réalisée chez plusieurs espèces (rongeurs, singes, homme mais de façon moins importante) notamment par hybridation *in situ* et par autoradiographie à l'aide d'antagoniste iodé sélectif (Barberis and Tribollet, 1996). L'expression de ce récepteur est assez similaire entre les différentes espèces. Les principales zones marquées sont le septum latéral, le noyau du lit de la strie terminale (BNST), l'amygdale, le noyau suprachiasmatique, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex entorhinal (Johnson et al., 1993; Ostrowski et al., 1994; Szot et al., 1994). Une étude de Young et collaborateurs (2000) sur le cerveau de hamster montre par autoradiographie et par hybridation *in situ* :

- Une forte présence de récepteur V_{1A} dans le septum latéral, le BNST, l'aire médiale préoptique, le thalamus antérodorsal et le noyau surrachiasmatique.
- Une liaison plus modérée ainsi que moins d'ARNm au niveau du noyau central et l'amygdale et sur une partie allant de la zone latérale de l'aire préoptique jusqu'à l'hypothalamus antérieur.

De cette étude, il ressort aussi que l'expression des récepteurs V_{1A} est dépendante de la présence d'androgènes (l'expression du récepteur V_{1A} dans le noyau préoptique médian est régulée par les androgènes).

Les récepteurs V_{1A} ont également été détectés par immunocytochimie dans les astrocytes corticaux de rat (Zhao and Brinton, 2002).

B. Distribution centrale du récepteur V_{1B}

Peu d'études ont été réalisées pour localiser l'expression du récepteur V_{1B} au niveau du cerveau. Les zones détectées par hybridation *in situ*, RT-PCR et immunohistochimie sont le bulbe olfactif, le septum, la couche secondaire du cortex pyriforme, le cortex préfrontal, le cortex cingulaire, le cortex entorhinal, l'hippocampe, le noyau paraventriculaire, le noyau suprachiasmatique, le cervelet, et le noyau rouge (Lolait et al., 1995; Saito et al., 1995; Vaccari et al., 1998; Hernando et al., 2001; Stemmelin et al., 2005; Young et al., 2006).

Aucune évidence de dimorphisme sexuel concernant la localisation des sites V_{1B} cérébraux n'a été mise en évidence jusqu'à présent.

La détection des récepteurs V_{1B} a pu être réalisée par autoradiographie, à l'aide d'AVP tritié sur hypophyse de bœuf (Andrés et al., 2004). Récemment, ces données sur hypophyses ont

été validées avec la d[Leu⁴,Lys⁸]VP-[³H] sur hypophyse de rat (Tribollet E. données non publiées). La même approche a été réalisée sur coupe de cerveau de rat mais n'a montré aucun marquage notable, même dans les zones supposées exprimer le récepteur V_{1B}, ceci suggère que sa densité doit être faible.

On peut remarquer également que certaines zones du cerveau co-exprimeraient les récepteurs V_{1A} et V_{1B}. Ceci rajoute un niveau de complexité quant aux effets cérébraux attribués à la vasopressine et aux rôles joués par l'un ou l'autre des deux récepteurs.

C. Distribution centrale du récepteur OT

Il apparaît que les récepteurs de l'OT subissent des variabilités interspèce assez importantes concernant leur localisation cérébrale qu'il faut prendre en compte pour des études de localisation. On peut ainsi observer une différence de répartition des récepteurs de l'ocytocine entre le rat et l'homme :

- Chez le rat, les récepteurs de l'ocytocine sont localisés dans le système olfactif, les ganglions de la base, le thalamus, le système limbique (BNST, noyau de l'amygdale centrale, subiculum ventral), hypothalamus (noyau ventromedian), le tronc cérébral ainsi que la moelle épinière (Yoshimura et al., 1993; Vaccari et al., 1998).
- Chez l'homme, les sites de liaison de l'ocytocine ont principalement été détectés dans la substance noire (pars compacta), le globus pallidus, mais aussi dans l'insula cingulaire antérieure et médiale. Toutefois, des récepteurs OT n'ont pas été détectés dans l'hippocampe, l'amygdale, le cortex entorhinal et le bulbe olfactif. (Marazziti and Catena Dell'osso, 2008).

4.2.1. Fonctions des récepteurs V_{1A} et V_{1B} dans les processus comportementaux

A) Comportement social

➤ Comportement monogame

L'AVP est essentiel pour l'expression d'une variété de comportements sociaux dans de nombreuses espèces.

Chez les campagnols, des recherches ont montré que les comportements sexuels sont en partie associés à la vasopressine. Le campagnol des prairies présente un attachement familial profond, il est sociable et monogame. Suite à l'accouplement, le couple est très uni et habite le même nid. Les deux parents sont impliqués activement dans les soins des petits pendant une longue période et le mâle défend sa compagne.

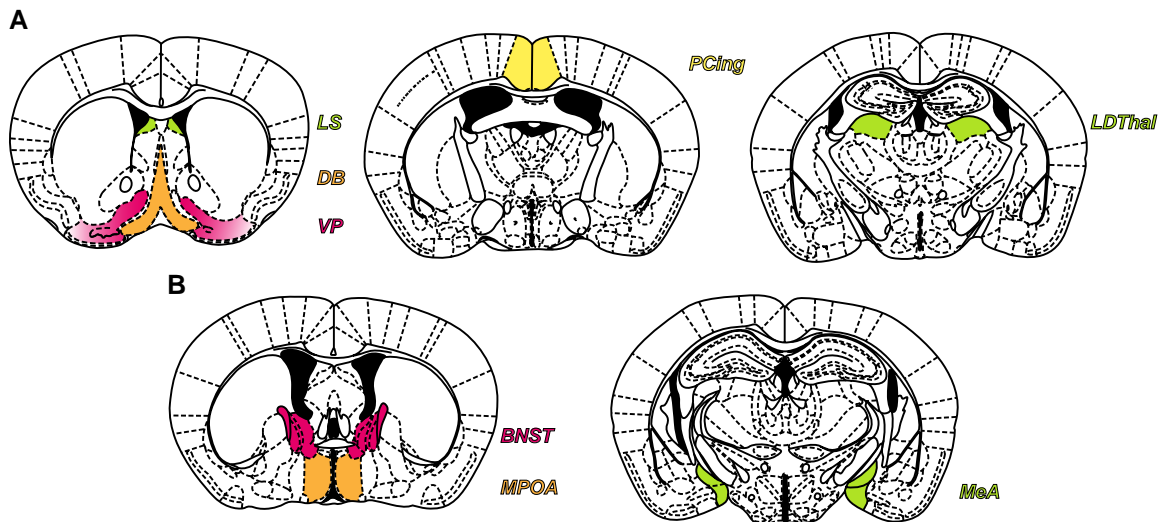


Figure 22 : Les structures du cerveau associées aux comportements monogame et parental (Koshimizu et al., 2012)

Les profils d'expression du récepteur de V_{1A} dans le cerveau sont associés fonctionnellement aux comportements monogame (A) et parental (B).

- (A) La liaison spécifique au récepteur V_{1A} est augmentée dans le septum latéral (LS) du campagnol des Montagnes volage et dans la bande diagonale (DB) du campagnol des prairies monogame. La préférence des partenaires est également augmentée par la surexpression du récepteur de V_{1A} dans le pallidum ventral (VP). L'expression du récepteur V_{1A} dans le cortex postérieur cingulaire/rétrosplénial (PCing) et le noyau thalamique latérodorsal (LDThal) est réduite chez le campagnol de prairie.
- (B) Pendant les périodes d'attentions maternelles, la libération d'AVP est augmentée dans la région préoptique médiane (MPOA) ou dans le noyau du lit de la strie terminale (BNST). Une perfusion chronique d'un antagoniste du récepteur V_{1A} dans l'amygdale médiale (MEA) altère la mémoire de la mère, alors que l'injection de l'antagoniste du récepteur de V_{1A} dans le BNST réduit l'agressivité maternelle. La distribution des zones du cerveau exprimant ces récepteurs V_{1A} a été illustrée ici.

Young et collaborateurs (1999) ont indiqué que l'administration centrale d'AVP augmente le comportement affiliatif (préférence du partenaire) chez le campagnol de prairie, mais pas chez le campagnol des montagnes, probablement à cause de différences dans la programmation génétique des circuits cérébraux associés à ces instincts. Ces derniers ont une densité plus faible de récepteurs de la vasopressine que les campagnols des prairies.

Sur les deux récepteurs de la famille de la vasopressine présents dans le cerveau, les études ont principalement été menées sur le récepteur V_{1A} . Ainsi, la distribution cérébrale des récepteurs V_{1A} est aussi divergente que le comportement des campagnols (Figure 22). Chez le campagnol de prairie, il y a plus de récepteur V_{1A} dans l'amygdale que dans le septum latéral (Winslow et al., 1993) Chez le campagnol des montagnes, l'augmentation de l'expression du récepteur V_{1A} au niveau du cerveau antérieur ventral (circuit de récompense) induit une préférence du partenaire (Lim et al., 2004). De plus, l'insertion du gène du récepteur V_{1A} de

l'espèce monogame et de sa séquence flanquante 5' dans le génome d'une souris induit un comportement similaire à celui du campagnol monogame (Young et al., 1999).

Enfin lorsque les variations individuelles du comportement chez le mâle et les expressions de récepteur V_{1A} furent examinées, la fidélité sociale et sexuelle ont été associées à l'expression du récepteur V_{1A} dans le cortex postérieur cingulaire/rétrospinal (PCing) et dans le thalamus dorsal (noyau latérodorsal, LDThal) mais pas dans le pallidum ventral (VP) ou le séptum latéral (LS) du campagnol mâle des prairies dans des conditions semi-naturelles (Ophir et al., 2008) (Figure 22).

Chez les humains, il existe une association entre l'un des génotypes du récepteur V_{1A} et les traits reflétant un comportement monogame chez les hommes, incluant la liaison du partenaire, les problèmes conjugaux perçus, et le statut matrimonial (Walum et al., 2008). Ainsi, le récepteur V_{1A} est fortement impliqué dans le comportement monogame chez les mâles de plusieurs espèces.

➤ Comportement parental

L'AVP a été impliquée dans la médiation centrale du comportement parental. Il a été démontré que l'AVP central est un régulateur important du comportement social des femelles, incluant l'intérêt et l'agression maternelle chez les rates allaitantes (Bosch and Neumann, 2008; Bosch et al., 2010). De plus, la libération d'AVP augmente de manière significative dans la région pré-optique médiane (MPO) ou a tendance à augmenter dans le BNST au cours des différentes phases d'attentions maternelles (Bosch et al., 2010). Bien que les souris KO- V_{1A} présentent un profil d'agression maternelle normale (Wersinger et al., 2007), le blocage du récepteur V_{1A} par perfusion intracérébrale à l'aide d'un antagoniste sélectif ou l'administration locale d'oligonucléotide antisens V_{1A} dans le MPO altère l'intérêt maternel aux petits (Bosch and Neumann, 2008; Nephew and Bridges, 2008). En revanche, l'injection locale d'antagoniste V_{1A} bilatéralement dans le BNST réduit l'agressivité de la mère mais pas l'attention maternelle aux petits (Bosch et al., 2010). Ainsi, le système d'AVP central avec le récepteur V_{1A} peut moduler les comportements maternels (Figure 22).

Chez les ouistitis, les mâles présentent un comportement paternel et le cortex préfrontal des pères affiche une densité importante d'épines dendritiques et une augmentation de l'expression du récepteur V_{1A} dans ces épines (Kozorovitskiy et al., 2006), suggérant que les récepteurs V_{1A} joueraient un rôle dans les soins paternels.

➤ Interaction et communication sociales

Certaines études ont suggéré que les polymorphismes du gène du récepteur V_{1A} sont associés à des troubles du spectre autistique (autisme, syndrome d'Asperger et l'autisme de haut fonctionnement) (Kim et al., 2002; Israel et al., 2008). Il est possible que l'AVP central joue un rôle important dans la régulation de l'interaction sociale. Ceci est d'un grand intérêt puisque l'interaction sociale détériorée fait partie des déficits fondamentaux du trouble autistique.

Les souris V_{1A} -KO et V_{1B} -KO ont toutes deux montré des signes d'interaction sociale réduite par rapport à des souris WT (Egashira et al., 2007, 2009). En outre, les souris V_{1B} -KO ont montré une diminution de la motivation sociale dans les tests de discriminations olfactives, puis une motivation normale après privation de nourriture, indiquant que le déficit dans le comportement de motivation n'est pas général (Wersinger et al., 2002). Par conséquent, la motivation sociale réduite est sûrement liée aux interactions sociales altérées chez les souris V_{1B} -KO.

Différentes études ont montré également que l'AVP module le comportement social et émotionnel dans le système nerveux central chez l'homme (Born et al., 2002; Thompson et al., 2006).

B. Apprentissage et mémoire

Le rôle de l'AVP dans la mémoire a été l'une des premières fonctions de l'AVP central à être caractérisé, et plus particulièrement la mémoire sociale et la connaissance sociale qui ont été largement examiné (McEwen, 2004; Goodson and Thompson, 2010). La reconnaissance sociale est une forme unique d'apprentissage et de mémoire qui implique un processus de reconnaissance des individus par l'utilisation d'un mécanisme neuronal qui est spécifique processus social.

La reconnaissance sociale est essentielle chez les animaux. Elle implique de reconnaître si un individu est un congénère appartenant au groupe, ou s'il est étranger à celui-ci. Chez les rongeurs, cette reconnaissance est dépendante de stimuli visuels et olfactifs.

Les tests de reconnaissance sociaux chez les animaux se basent sur leur tendance naturelle aux investigations olfactives des congénères étrangers. Quand un animal est exposé à un jeune congénère étranger au moins deux fois avant et après un intervalle fixe, lors de la deuxième exposition, le sujet reconnaît le congénère précédemment présenté et la durée d'investigation est plus courte (Dantzer et al., 1987).

De nombreuses études ont permis de démontrer le rôle de la vasopressine dans la reconnaissance sociale. Chez les rats Brattelboro, souche déficiente en vasopressine, un déficit de reconnaissance sociale a été remarqué, une administration d'AVP de synthèse au niveau du septum latéral par micro-dialyse améliore la reconnaissance sociale (Engelmann and Landgraf, 1994; Feifel et al., 2009) démontrant le rôle physiologique de l'AVP dans la reconnaissance sociale. Chez les rats normaux, l'application bilatérale d'un adéno-vecteur viral contenant le gène du récepteur V_{1A} du campagnol des prairies dans le septum latéral provoque l'augmentation de la reconnaissance sociale (Landgraf et al., 2003).

Le rôle crucial du récepteur V_{1A} dans la reconnaissance sociale a également été démontré chez des souris V_{1A} -KO mâles qui présentent une déficience profonde de reconnaissance sociale (Bielsky et al., 2004).

Il a été démontré également, à l'aide d'un antagoniste sélectif du récepteur V_{1A} , injecté dans des sites spécifiques, que le septum latéral était essentiel pour la reconnaissance sociale contrairement à l'amygdale médiale (Bielsky et al. 2005). Ainsi, le récepteur V_{1A} dans le septum latéral joue un rôle essentiel dans le traitement neural de stimuli sociaux nécessaires à un comportement social complexe. En effet, le septum latéral contient une forte densité de récepteurs V_{1A} (Tribollet et al., 1999).

Les souris V_{1B} -KO ont également montré un léger déficit de la reconnaissance sociale et de la mémoire pour l'ordre temporel (Wersinger et al., 2002; DeVito et al., 2009). Les souris V_{1B} -KO pourraient reconnaître des objets précédemment explorés et se rappeler quand ont-ils été explorés, mais leur capacité à se souvenir de l'ordre temporel de la présentation de ces objets a été altérée (DeVito et al., 2009). Le récepteur V_{1B} est exprimé dans les cellules pyramidales de la région CA2 de l'hippocampe à des niveaux beaucoup plus élevés que dans toute autre partie du cerveau (Young et al., 2006). Par conséquent, le récepteur V_{1B} , peut-être en CA2, semble jouer un rôle très spécifique dans le comportement social et la mémoire épisodique (DeVito et al., 2009). L'élaboration d'outil sélectif de ce récepteur peut permettre de pousser plus loin les investigations.

Dans des examens d'apprentissage spatial, les souris V_{1A} -KO ont montré leur déficit dans un labyrinthe à bras radial contrairement aux souris V_{1B} -KO (Egashira et al., 2004). Cependant, les souris V_{1A} -KO et V_{1B} -KO se sont gérées normalement dans le labyrinthe d'eau de Morris (Wersinger et al., 2002; Bielsky et al., 2004; Egashira et al., 2004, 2009). Ainsi, il apparaît que le récepteur V_{1A} est nécessaire pour la mémoire de travail ou pour un niveau élevé de la mémoire spatiale dans un labyrinthe à bras radial.

C) *Agression, anxiété et dépression*

➤ Agression

La micro-injection d'AVP dans l'hypothalamus antérieur chez les hamsters syriens mâles a augmenté le comportement agressif lors du test résident-intrus (Ferris et al., 1997; Caldwell and Albers, 2004) et inhibé lors de la micro-injection d'un antagoniste des récepteurs V_{1A}/OT dans l'hypothalamus antérieur (Ferris and Potegal, 1988).

En outre, il a été constaté que l'isolement social augmente l'agressivité par l'augmentation du nombre de récepteurs de V_{1A} dans l'hypothalamus antérieur chez les hamsters syriens mâles (Albers et al., 2006). En revanche, l'injection d'un antagoniste du récepteur V_{1A}/OT sélectif dans l'hypothalamus antérieur chez les femelles hamsters syriens augmente l'agression (Gutzler et al., 2010). Ces données suggèrent que les neurones AVP-sensibles dans l'hypothalamus antérieur sont impliqués dans le contrôle de l'agressivité chez les hamsters mâles et femelles.

L'antagoniste sélectif des récepteurs V_{1A} , le SRX251, ainsi que l'antagoniste des récepteurs V_{1B} , le SSR149415, ont montré leur capacités à réduire l'agressivité offensive vers un intrus chez les hamsters mâles (Blanchard et al., 2005; Ferris et al., 2006).

Certaines études ont montré que le récepteur V_{1B} semble être essentiel à la bonne expression de l'agression, vu que les souris KO- V_{1B} montrent une réduction de l'agressivité. Ces mêmes études ont indiqué que l'agression sociale n'a pas été affectée chez les souris V_{1A} -KO (Wersinger et al., 2002, 2007).

Cela peut être dû à une compensation développementale empêchant de déterminer le rôle pharmacologique identifiée du récepteur V_{1A} dans la modulation de l'agression.

➤ Anxiété et dépression

Pour déterminer le rôle des récepteurs V_{1A} et V_{1B} dans l'anxiété et la dépression, des études pharmacologiques et transgéniques ont été réalisées chez les rongeurs.

La dépression chez le rongeur est évaluée par le test de la nage forcée. Ce test consiste à placer le rongeur dans un bocal contenant de l'eau et dont l'animal ne peut sortir. L'animal commence par nager vigoureusement et tente de s'échapper ; puis il renonce et s'immobilise pendant des périodes plus ou moins longues au cours desquelles il ne fait que les mouvements lui permettant de maintenir la tête hors de l'eau.

Lors du test de la nage forcée, la vasopressine plasmatique n'est pas augmentée. Cependant, la vasopressine sécrétée au niveau des NSO et NPV, est augmentée (Wotjak et al., 1998).

Chez des campagnols des prairies mâles, le marquage de récepteurs V_{1A} dans les zones thalamiques est positivement corrélés aux comportements liés à l'anxiété, ce qui indique que les animaux ayant une densité de liaison au V_{1A} plus élevée dans le thalamus montrent plus de caractère anxieux (Hammock et al., 2005). Ceci suggère que le récepteur V_{1A} dans le thalamus joue un rôle dans les comportements ayant une composante d'anxiété assez forte.

Enfin chez l'homme, les niveaux élevés d'AVP sont associés à plusieurs troubles anxieux. Ainsi, les concentrations d'AVP dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans le plasma, sont élevées chez les patients souffrant de trouble obsessionnel-compulsif (TOC) (Altemus et al., 1992). De plus, la concentration d'AVP et le rapport AVP/OT sont négativement corrélés avec la sévérité de plusieurs symptômes de TOC chez les enfants atteints de TOC (Swedo et al., 1992). Chez les patients atteints de trouble panique, des polymorphismes dans les gènes des récepteurs V_{1B} et CRH-R1 modifient la susceptibilité au trouble panique (Keck et al., 2008).

Des études cliniques ont également démontré l'implication de l'AVP dans les troubles dépressifs. Ainsi, les concentrations plasmatiques de l'AVP (van Londen et al., 1997, 1998), le nombre de cellules exprimant l'AVP ou les niveaux d'AVP dans le NPV de l'hypothalamus (Purba et al., 1996) et la réponse hypophysaire en AVP (Dinan et al., 1999) sont augmentés chez les patients déprimés. De plus, les transcrits d'AVP dans le NSO sont également augmentés chez les sujets déprimés (Meynen et al., 2006). En revanche, aucun changement n'est remarqué en ce qui concerne les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Meynen et al., 2009).

En ce qui concerne les récepteurs de la vasopressine, impliqués dans ces comportements, une augmentation de l'expression du gène du récepteur V_{1A} a été trouvée dans le NPV de patients déprimés (Wang et al., 2008). Un polymorphisme nucléotidique simple (SNP) dans le gène du récepteur V_{1B} a également été constaté jouant un rôle protecteur contre la dépression majeure (van West et al., 2004). En outre, une association génétique a été rapportée entre les polymorphismes dans le gène du récepteur V_{1B} et les troubles de l'humeur chez l'enfant (Dempster et al., 2007). Ces rapports suggèrent l'implication du système AVP (en particulier, le récepteur V_{1B}) dans les troubles anxieux et dépressifs (Surget and Belzung, 2008).

4.2.2 Fonctions du récepteur OT dans les processus comportementaux

Comme nous venons de le voir, la vasopressine régule certaines fonctions comportementales à travers ses récepteurs centraux (V_{1A} et V_{1B}). La table 3 résume les expériences réalisées concernant les actions comportementales de l'ocytocine

Table 3 : Effets comportementaux de l'ocytocine.

CLASSES DE COMPORTEMENTS	COMPORTEMENT	EFFETS DE L'OCYTOCINE CHEZ LES RONGEURS	EFFETS DE L'OCYTOCINE CHEZ L'HOMME
Agressivité	Agressivité chez la femelle	Diminuée envers les petits par injection d'OT icv Augmentée envers les intrus par injection d'OT icv	ND
Affiliation	Préférence pour partenaire	Facilité chez la femelle par injection centrale d'OT	ND <i>OT administrée en intranasal favorise la confiance</i>
	Comportement paternel	ND	ND
	Comportement maternel	Facilité par injection d'OT dans le ventricule central OT favorise le déclenchement du comportement maternel	Chez les femelles allaitantes, une augmentation d'OT est associée à une diminution du stress
Mémoire sociale	Reconnaissance sociale	Atténuée par haute dose d'OT périphérique Serait facilitée à faible dose (mâles) Diminuée chez la femelle par injection d'OT icv Souris KO OT ont déficits de reconnaissance sociale	OT modulerait de façon sélective la mémoire implicite
Mémoire non sociale	Mémoire spatiale	Diminuée lors d'injections d'OT dans noyau basal de Meynert	ND
Stress, anxiété et dépression	Anxiété	Réduite par injection d'OT icv (inhibition axe HPA)	OT chez les femmes allaitantes est associée à une diminution du stress

4.3 Balance fonctionnelle entre AVP et OT

Comme nous venons de le voir, outre son action périphérique et au niveau hypothalamo-hypophysaire, il a été démontré que la vasopressine exerce un effet positif sur certaines formes de mémoire chez le rat et l'homme (De Wied, 1965; Legros et al., 1978).

La première preuve que l'ocytocine peut présenter des effets opposés à ceux de la vasopressine sur la fonction cognitive a été présentée chez le rat (Bohus et al., 1978) suggérant donc des actions "agonistes-antagonistes" de ces deux hormones. Une telle action inhibitrice de l'OT sur la mémoire a été confirmée ensuite chez l'homme (Geenen et al., 1988).

Ainsi, l'ocytocine faciliterait l'extinction de la réaction d'évitement et atténuerait le stockage de la mémoire verbale (Caruso et al., 1993). Elle a également pour effet d'atténuer la reconnaissance sociale des rats mâles (Popik and Vetulani, 1991). Chez l'homme, l'administration d'ocytocine par injection influencerait les performances mémorielles (Heinrichs et al., 2004).

D'autres données obtenues à partir d'études sur le comportement lié au stress ont également montré que l'OT aurait des effets opposés à la vasopressine. En effet, l'ocytocine centrale exerce des effets anxiolytiques et antidépresseurs, alors que la vasopressine tend à montrer des actions anxiogène et dépressive. En réponse au stress, l'ocytocine est libérée au niveau central et périphérique (Neumann and Landgraf, 2012).

La lactation, phénomène géré par l'ocytocine, est associée également à une diminution du stress et de la mauvaise humeur (Mezzacappa and Katlin, 2002). Ainsi, chez les femmes allaitantes, le niveau d'ocytocine est négativement corrélé avec le niveau de stress et d'anxiété (Uvnäs-Moberg, 1990). De plus, l'augmentation d'ocytocine lors de la tétée est suivie d'une diminution des niveaux d'ACTH et de cortisol (Heinrichs et al., 2002).

Cette balance fonctionnelle ou effet « Ying/Yang » décrite par Jean-Jacques Legros en 2001 présente les intérêts opposés des fonctions physiologiques de la vasopressine et de l'ocytocine. Ainsi, les actions de la vasopressine ont tous pour but la protection de l'homéostasie de l'individu (Rétention d'eau, régulation de la pression sanguine, l'augmentation de l'excitation et de la mémoire etc.), alors que les actions de l'ocytocine ont toutes dirigées à la maintenance du groupe social (parturition, éjection du lait, comportement sexuel et interactions sociales), il est donc tentant de voir la vasopressine comme le peptide de "l'égoïsme" et l'ocytocine comme le peptide de «l'altruiste» (Legros, 2001).

5. Pharmacologie des récepteurs VP/OT

Après la découverte de la vasopressine et de celle de ses récepteurs, la communauté scientifique a synthétisé énormément de composés pharmacologiques qui peuvent se lier de façon plus ou moins spécifique à chaque sous-type de récepteur.

L'élucidation de la structure et la synthèse de la vasopressine par Du Vigneaud (Du Vigneaud et al., 1953; Du Vigneaud, 1954) a constitué une étape cruciale pour l'élaboration d'analogues structuraux de la vasopressine. En outre, l'importance des effets physiologiques induits par cette hormone, l'implication de la vasopressine dans certaines pathologies ou même l'implication de ses récepteurs par un dysfonctionnement de leurs fonctions, ont représenté les principales causes qui ont poussé les scientifiques à la recherche de molécules affines et/ou potentiellement thérapeutiques.

L'ensemble des propriétés de ces composés ainsi que celles de chaque sous-type de récepteur, constitue la base de la pharmacologie des récepteurs de la vasopressine.

La conception d'analogue peut passer par 3 stratégies d'approches différentes :

- La modification systématique ou rationnelle de la structure du ligand naturel. De cette façon, sont conçus de nombreux composés qui se sont révélés de bons agonistes.
- La recherche aléatoire de composés chimiques différents. Cette stratégie est très laborieuse et longue, mais elle a été développée par certaines entreprises pharmaceutiques, qui ont pu développer des molécules efficaces et très satisfaisante.
- La conception de composés basés sur la structure tridimensionnelle de la vasopressine et des différents sous-types de récepteurs.

Sur l'ensemble des ligands existant actuellement, certains peuvent être peptidiques ou non peptidiques et présente une haute affinité et une sélectivité déterminée pour la famille des récepteurs de la vasopressine.

Un ligand sélectif est défini sur la base de sa grande affinité ou activité biologique pour un seul est unique récepteur de la famille VP/OT (Chini et al., 2008a).

5.1 Pharmacologie du récepteur V_{1A}

La pharmacologie du récepteur V_{1A} est relativement riche et depuis sa découverte, un bon nombre de composés à la fois agoniste comme antagonistes sélectifs, furent synthétisés. Ceci a permis une caractérisation approfondie de ce sous-type de récepteur.

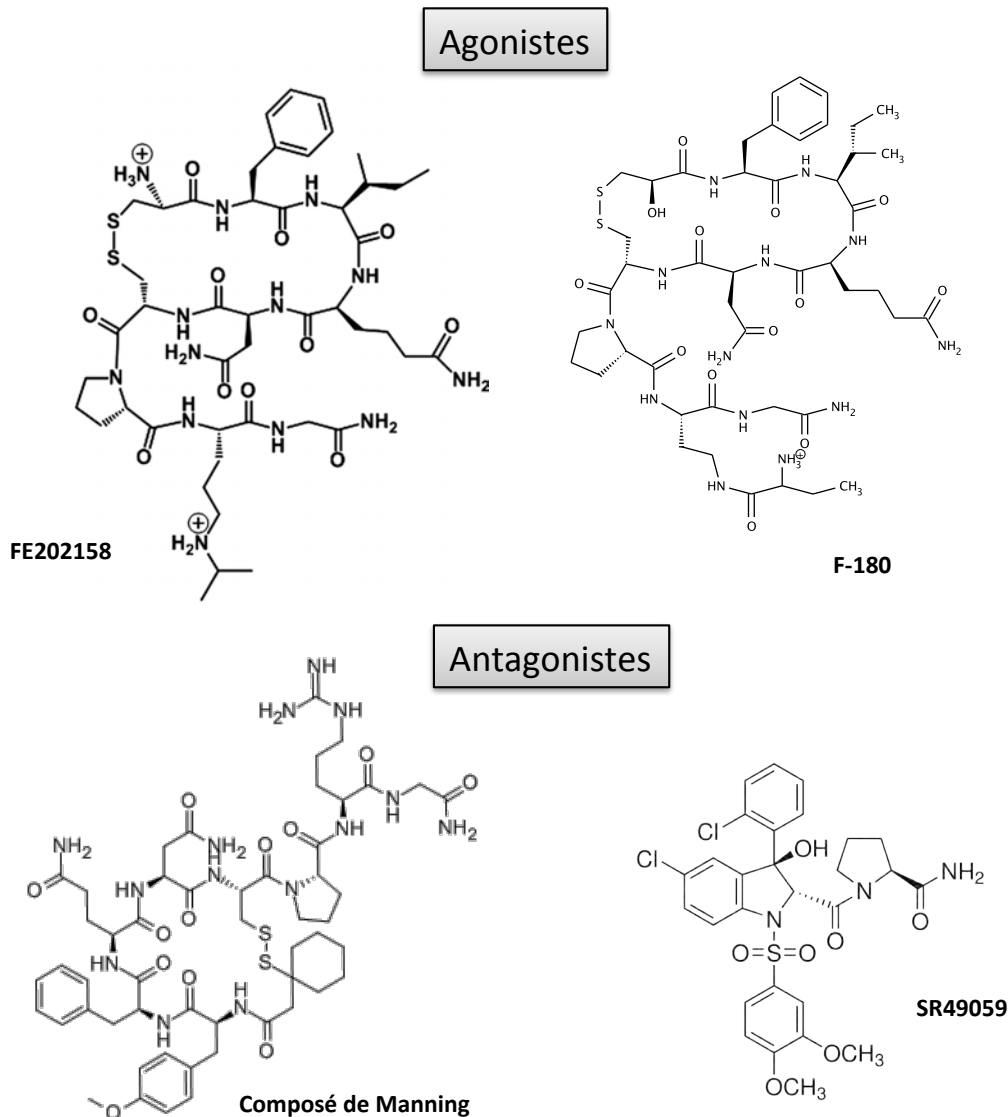


Figure 23 : principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V_{1A}

Parmi les différents antagonistes du récepteur V_{1A}, l'antagoniste peptidique par excellence pour le récepteur V_{1A} est le composé appelé « composé de Manning » ou d(CH₂)₅[Tyr(Me)²]AVP (Kruszynski et al., 1980) (Figure 23). Cet antagoniste cyclique, classé dans le groupe des dérivés cyclopentaméthyles de l'AVP, présente une forte affinité pour le récepteur V_{1A} et possède des propriétés antivasopressives. En outre, ce composé présente une mauvaise affinité pour les récepteurs V_{1B} et V₂, mais assez bonne pour le récepteur OT, ce qui limite sa sélectivité V_{1A}.

A partir du début des années 90, une nouvelle classe de molécules actives émergeait avec comme particularité leur structure non peptidique à la différence des autres analogues structurels de l'AVP. La majorité de ces molécules ont été synthétisées par des compagnies pharmaceutiques, qui ont trouvé dans l'élaboration de ce type de composés une solution afin d'éviter les problèmes de dégradation par les peptidases, favorisant ainsi, la biodisponibilité d'agent thérapeutiques potentiels.

Le groupe « Sanofi Recherche » a caractérisé en 1993 le SR49059, un puissant antagoniste non peptidique sélectif pour le récepteur V_{1A} de mammifères (Serradeil-Le Gal et al., 1993) (Figure 23). Ce composé présente une forte action anti-vasopressive *in vitro*, mais pour des problèmes de toxicité hépatique, leur utilisation en médecine a été abandonné.

Le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} , le F-180, a été synthétisé en 1998 par la société pharmaceutique « Ferring Pharmaceuticals » par une modification de la structure chimique du nonapeptide [Phe²,Orn⁸]VT (Bernadich et al., 1998) (Figure 23). Le F-180 a une bonne sélectivité pour le récepteur V_{1A} bovin et humain et a permis la caractérisation de ce type de récepteur dans les glandes surrénales bovines (Andrés et al., 2004). Toutefois, ce composé n'est pas sélectif pour le récepteur V_{1A} chez le rat.

Le nouvel agoniste V_{1A} , FE 202158 (Figure 23), récemment décrit par le laboratoire Ferring (Laporte et al., 2011) est actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement de l'hypotension vasodilatatrice. Comparé au F-180, ce peptide présente une meilleure sélectivité pour le récepteur V_{1A} humain. Chez le rat, ce composé présente une très bonne sélectivité pour le récepteur V_{1A} vis à vis du récepteur V_2 mais aucun test n'a été effectué jusque là concernant sa sélectivité vis à vis des récepteurs OT et V_{1B} .

Outre ces trois composés qui constituent les principaux outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs V_{1A} , il existe d'autres composés sélectifs de ce récepteur. Parmi les composés existant, on peut citer les antagonistes OPC-21268 et YM218 (Masaki et al., 1993; Tsukada et al., 2005).

5.2 Pharmacologie du récepteur V_{1B}

Le premier antagoniste des récepteurs V_{1B} , le SSR149415, a été synthétisé par le groupe « Sanofi-Synthelabo » en 2002 (Serradeil-Le Gal et al., 2005) (Figure 24). Ce composé non peptidique présente une excellente affinité et sélectivité pour le récepteur V_{1B} vis à vis des

récepteurs V_{1A} et V_2 . Cependant il a été démontré récemment, que l'affinité de ce composé pour le récepteur OT humain est meilleure que celle déterminé précédemment, ce qui limite dans une certaine mesure la sélectivité de cet antagoniste (Griffante et al., 2005).

Au même moment, l'équipe du Dr. Maurice Manning a synthétisé un analogue de l'AVP modifié en position 4 la $d[\text{Cha}^4]\text{AVP}$ (Figure 24) qui présente une bonne affinité et sélectivité pour le récepteur V_{1B} humain (Derick et al., 2002). Toutefois, ce composé n'est pas sélectif concernant les récepteurs de rat, principalement vis à vis du récepteur V_2 de rat.

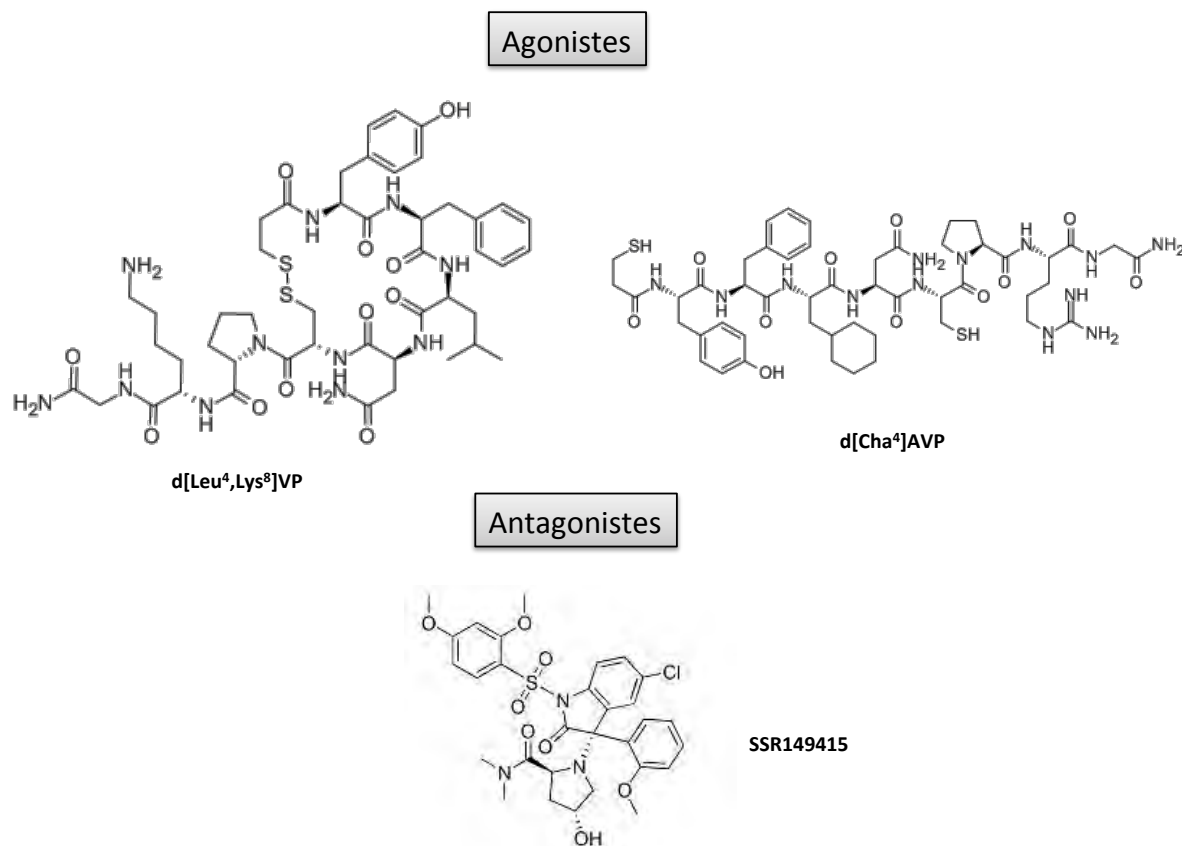


Figure 24 : principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V_{1B}

En 2007, un nouvel analogue fut synthétisé à partir de la deamino1-arginine vasopressine (dAVP), la $d[\text{Leu}^4, \text{Lys}^8]\text{VP}$ (Figure 24). En effet, il a été démontré que la désamination de l'AVP en position 1 conférait à la molécule une meilleure affinité et sélectivité pour le récepteur V_{1B} humain et de rat (Manning et al., 2012). La modification ensuite des résidus en position 4 et 8 a permis ensuite de générer le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1B} chez le rat (Pena et al., 2007) puis la caractérisation pharmacologique, fonctionnelle et physiologique pour les V_{1B} de rat.

5.3 Pharmacologie du récepteur V₂

Après la synthèse du SR49059 par le groupe «Sanofi Recherche», cette même équipe a synthétisé le SR121463A (Serradeil-Le Gal, 2001) ayant une affinité sélective pour les récepteurs V₂ humains, bovins et de rat (Figure 25) Actuellement, c'est le principal composé utilisé pour caractériser la présence de récepteurs V₂.

L'analogue structural de l'AVP la [deamino1, D-arginine8]vasopressine (dDAVP ou desmopressine®) (Figure 25) est un agoniste des récepteurs V₂ sélectif chez le rat, mais sa sélectivité chez l'homme est moindre, puisque il a été démontré que l'affinité de la dDAVP pour le récepteur V_{1B} humain est meilleure que celle pour le récepteur V₂ humain (Saito et al., 1997). Ce composé possède une activité antidiurétique puissante, sans induire de vasoconstriction ou de contractions utérines vu la faible affinité de la dDAVP pour les récepteurs V_{1A} et OT. Par conséquent, le dDAVP est utilisée dans le traitement du diabète insipide chez l'homme résultant d'une sécrétion insuffisante de l'AVP. Cependant l'augmentation de la concentration circulante d'ACTH chez certains patients, démontre que la dDAVP présente une bonne affinité pour le récepteur V_{1B} (Scott et al., 1999).

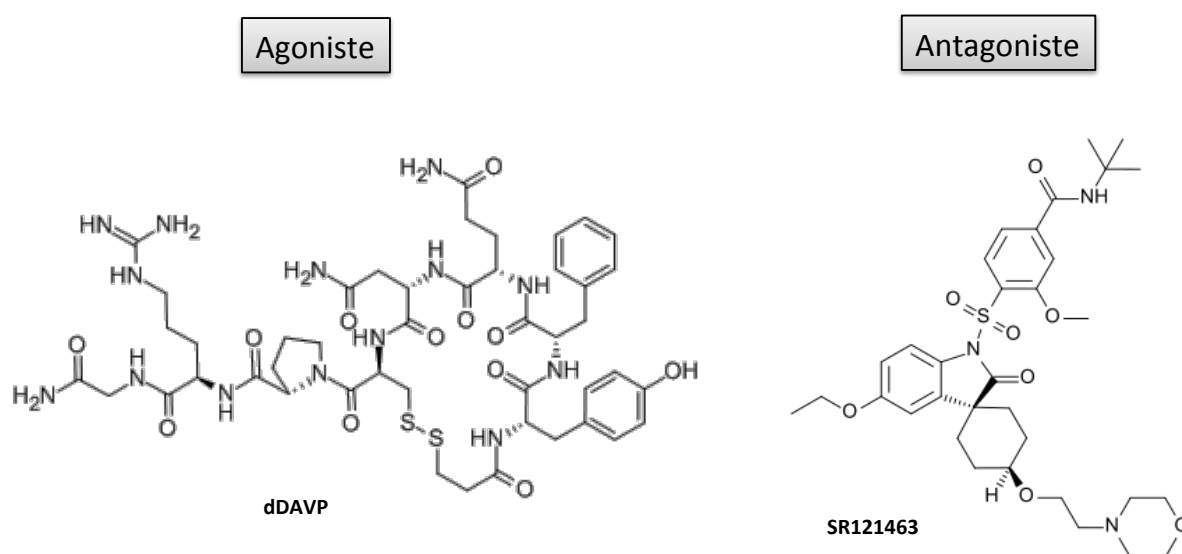


Figure 25 : principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur V₂

Les composés représentés dans la Figure 25 sont les principaux outils pharmacologiques utilisés pour étudier le récepteur V₂. D'autres composés sélectifs pour le même sous-type ont également été synthétisés. Ces composés sont des antagonistes OPC-31260 et OPC-41061 (Yamamura et al., 1992, 1992) ou des agonistes chez le rat VDAVP et dVDAVP (Sawyer et al., 1974).

5.4 Pharmacologie du récepteur OT

Le composé principal utilisé pour la caractérisation des récepteurs OT est la [Thr⁴,Gly⁷]OT qui constitue un excellent agoniste sélectif du récepteur OT de rat (Elands et al., 1988) (Figure 26).

Le SSR126768A est quant à lui un composé synthétisé par « Sanofi-Synthelabo » et présenté comme un antagoniste sélectif du récepteur OT (Serradeil-Le Gal et al., 2004). Le SSR126768A constitue un outil pharmacologique potentiellement thérapeutique dans les cas de naissances prématurées

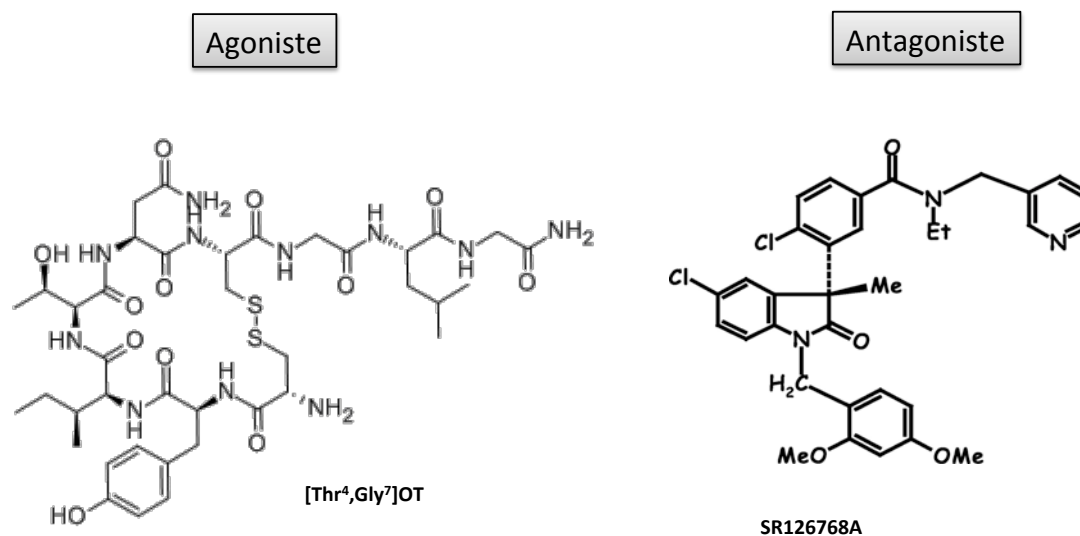


Figure 26 : principaux ligands utilisés pour la caractérisation du récepteur OT

D'autres composés, non représentés dans la Figure 26, ont été évalués et ont montré leur grande affinité et sélectivité pour le récepteur OT humain. On peut citer le FE 202767 qui fait partie de ces composés et qui représente donc un analogue prometteur potentiellement thérapeutique (Wisniewski et al., 2011).

Il a également été démontré que l'atosiban, longtemps considéré comme un antagoniste peptidique spécifique du récepteur OT, présente en réalité une affinité vis à vis du récepteur V_{1A} (Manning et al., 2012)

L'ensemble des agonistes des récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine est repris dans le tableau qui suit (Table 3) :

Table 3 : Agonistes communs de la famille de récepteurs VP/OT (modifié à partir de Manning et al 2012)

Composés	<i>Affinité Ki (nM)</i>							
	Récepteur humain				Récepteurs de rat			
	hOT	hV _{1A}	hV _{1B}	hV ₂	rOT	rV _{1A}	rV _{1B}	rV ₂
AVP	1.7	1.1	0.7	1.2	1.7	2.6	0.3	0.4
OT	0.8	120	>1000	3500	1.0	71	294	89
[Thr ⁴ ,Gly ⁷]OT	6.6	305	>10 000	>10 000	0.8	>10 000	8000	
F-180	520	11.7	2100	>10 000		480	750	2000
FE 202158	>840	4.4	>5200	>5700				
d[Cha ⁴]AVP	240	151	1.2	750	1430	2297	1.4	12.7
d[Leu ⁴ ,Lys ⁸]VP	29	69.3	0.51	6713	64	3786	0.16	101
dDAVP	203	62.4	5.8	23.3	31	100	9.3	0.3
dVDAVP	630	20.7	5.8	2.2		316	152	0.3
d[Thi ³]VDAVP	460	50	20	4.3	34	1100	680	0.3

Les valeurs d'affinités en magenta correspondent aux affinités des ligands sélectifs pour un sous-type de récepteur donné

A partir de ce tableau, il est évident que sur l'ensemble des agonistes des récepteurs VP/OT, seuls quelques uns peuvent être définis comme sélectif pour un récepteur donné.

Chez le rat par exemple, un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} permettrait de compléter la panoplie d'outils pharmacologiques sélectifs existante.

La caractérisation pharmacologique d'un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez le rat fera l'objet de la première partie des résultats illustrés dans cette thèse.

La recherche d'antagonistes des récepteurs de l'AVP a longtemps été d'un intérêt majeur pour la recherche ainsi que pour de nombreuses compagnies pharmaceutiques, notamment les compagnies Otsuka, Sanofi, Azevan, Astellas, Wyeth-Ayerst, Jonhson & Johnson, Yamanouchi et Pfizer.

La Table 4 énumère les principaux antagonistes des récepteurs de la vasopressine commercialisé ou en essai clinique. La Table 5 quant à elle, reprend les applications potentielles du développement d'antagonistes des récepteurs de la vasopressine.

Table 4 : Antagonistes de la vasopressine (statuts des essais cliniques en cours) (modifié à partir de Manning et al 2012)

Récepteurs cibles	Antagonistes	Pathologies visées	Essais cliniques en cours
V _{1A}	Relcovaptan (SR49059)	Dysménorrhée	Phase II (arrêté)
	PF-00738245		Nouveau composé
	OPC-21268		Phase II au japon et arrêté en Europe et au USA
V _{1A} /V ₂	Conivaptan (YM087)	Insuffisance cardiaque	Approuvé par la FDA*
V ₂	Tolvaptan (OPC-41061)	Insuffisance cardiaque, Diabète insipide	Approuvé par la FDA (Samsca)
	Satavaptan (SR121463B)		Phase III (arrêté)
	Lixivaptan (VPA-985)		Phase III
	Mozavaptan (OPC-31260)		Phase II
V _{1B}	Nelivaptan (SSR149415)	Stress/Dépression	Pré-clinique (arrêté)

* FDA : United states Food and Drug Administration

Table 5 : Applications thérapeutiques des antagonistes des récepteurs de la vasopressine

Antagonistes V _{1A}	Antagonistes V ₂	Antagonistes V _{1A} /V ₂	Antagonistes V _{1B}
Dysménorrhée, Accouchement avant terme	Insuffisance cardiaque congestive	Insuffisance cardiaque congestive	Maladies liées au stress, anxiété, dépression
Maladie de Raynaud	SIADH	Hypertension	Tumeurs sécrétant ACTH, Syndrome de Cushing
Hypertension	Cirrhose	Œdème cérébral	Troubles de l'axe hypothalamo-hypophysaire
Insuffisance cardiaque congestive	Hyponatrémie		
Œdème cérébral	Syndrome néphrotique		
Motion sickness	Œdème cérébral		
Oncologie (cancer du poumon à petites cellules)	Glaucome		
Troubles du système nerveux central	Hypertension		
	Diabète néphrogénique		
	Maladie de Menière		

Depuis la première synthèse chimique des nonapeptides cyclique AVP et OT, Ces deux hormones ont été au centre d'intensives études. Des centaines d'agonistes et d'antagonistes peptidiques ou non peptidiques des récepteurs de l'AVP et de l'OT, plusieurs étant de valeur clinique potentielle, ont été synthétisés et caractérisés, et sont actuellement des outils pharmacologiques très intéressantes (Manning et al., 2012). Paradoxalement, seuls quelques analogues fluorescents de AVP et OT ont été développés.

5.5 Ligands fluorescents des récepteurs VP/OT

Les ligands fluorescents constituent d'importants outils non seulement dans la caractérisation pharmacologique mais aussi dans la détermination de la localisation de récepteurs. La synthèse de composés fluorescents au début des années soixante a permis une percée dans le développement des sondes de marquage. Cependant, les fluorophores utilisés ayant une brillance assez faible, ont limité l'utilisation de ces premiers ligands fluorescents.

Le développement de ligands fluorescents plus brillant pour déterminer la distribution des récepteurs de la vasopressine dans le cerveau et dans les tissus périphériques est apparu comme une approche prometteuse.

L'étude de composés fluorescents spécifiques au récepteur V_{1B} fera l'objet de la seconde partie des résultats présentés dans cette thèse.

La Table 6 reprend la liste des plus importants ligands fluorescents des récepteurs VP/OT

Légende table 6 :

Abu, aminobutyric acid ; Cha, cyclohexylalanine ; MA, methylantranilamide ; dansyl, dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl ; AMcou, aminomethylcoumarin ; TMRho, tetramethylrhodamine ; CTMRho, carboxytetramethylrhodamine ; fluo, fluorescein ; Bodipy, bordifluoropyrromethene ; Cy, cyanine ; PVA, phenylpropionyl linear vasopressin antagonist ; HO-LVA, hydroxyphenylacetyl linear vasopressin antagonist.

Table 6 : Principaux ligand fluorescent des récepteurs de la vasopressine.

Structure	Ligand	Nature	Cible	
Cyclique	d[Lys ⁸ (tetramethylrhodamyl)]VP	Agoniste	V ₂	
	d[Lys ⁴ (fluoresceinyl), dihydro-Pro ⁷]OT		OT	
	d[Thr ⁴ , dihydroPro ⁷ , Lys ⁸ (fluoresceinyl)]OT		OT	
	[Cys ¹ (fluoresceinyl)]OT		OT	
	d[Lys ⁴ (fluoresceinyl), OHPro ⁷]AVP		V ₂	
	d[Pro ⁷ (NH-fluoresceinyl)]AVP		V ₂	
	d[Lys ⁸ (carboxyfluorescein)]VP		V ₂	
	d[Lys ⁸ (methylantranilamide)]VP		V ₂	
	d[Orn ⁸ (5/6C-Fluoresceinyl)]VT		OT	
	[HO1][Thr ⁴ , Orn ⁸ (5/6C-fluoresceinyl)]VT		OT/V _{1A}	
	[HO1][Orn ⁸ (5/6C-tetramethylrhodamyl)]VT		OT/V _{1A}	
	d[Leu ⁴ ,Lys(Alexa488) ⁸]VP		V _{1B}	
	d[Leu ⁴ ,Lys(Alexa647) ⁸]VP		V _{1B}	
	d[Leu ⁴ ,Lys(Aud-Alexa488) ⁸]VP		V _{1B}	
	d(CH ₂) ₅ [DTyr(Et) ² , Val ⁴ , Lys ⁸ (carboxytetramethylrhodamine)]VP		Antagonistes	V ₂ /V _{1A}
	d(CH ₂) ₅ [D-Tyr ² , Ile ⁴ , Lys ⁹ (N6-fluoresceinylaminothiocarbonyl)]AVP			V ₂
d(CH ₂) ₅ [DTyr ² , Ile ⁴ , Lys ⁹ (N6-tetramethylrhodamylaminothiocarbonyl)]AVP	V ₂			
d(CH ₂) ₅ [Tyr ² (Me), Thr ⁴ , Orn ⁸ (5/6carboxyfluoresceinyl), Tyr ⁹ -NH ₂]VT	OT			
desGly-NH ₂ 9, d(CH ₂) ₅ [D-Tyr ² , Thr ⁴ , Orn ⁸ (5/6carboxyfluoresceinyl)]VT	OT			
Linéaire	N- α -fluoresceinyl-thiocarbamoyl-D-Tyr(OEt)-Phe-Val-Asn-Abu-Pro-Arg-Arg-NH ₂	V _{1A}		
	[phenylacetyl ¹ , D-Tyr(Me) ² , Arg ⁶ , Arg ⁸ , Lys ⁹ (N ϵ -7-amino-4-methylcoumarin-3-acetamide)NH ₂]VP	V _{1A}		
	1-tetramethylrhodamyl-D-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH ₂	V _{1A}		
	(4-HOPh(CH ₂) ₂ CO-D-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Lys(5/6C-tetramethylrhodamyl)-Pro-Arg-NH ₂	V _{1A}		
	(4-HOPh(CH ₂) ₂ CO-D-Tyr(Me)-Phe-Gln-Asn-Arg-Pro-Lys(5/6C-tetramethylrhodamyl)-NH ₂	V _{1A}		
	[Lys ⁸ (Alexa488)]PVA	V _{1A} /OT		
	[Lys ⁸ (Alexa546)]PVA	V _{1A} /OT		

Objectifs de travail

A l'issue de cette introduction, nous avons pu voir que la vasopressine est une hormone aux multiples fonctions :

D'une part, hormone présentant des fonctions classiques, c'est l'hormone antidiurétique par excellence régulant la concentration physiologique et le bilan de l'eau, c'est également une hormone pressique impliquée dans la régulation de la volémie, ainsi qu'une hormone hypophysiotrope modulant l'axe corticotrope.

La vasopressine s'est avérée être d'autre part une hormone au centre nombreux processus cognitifs et comportementaux. Ainsi, depuis la découverte du troisième récepteur de la vasopressine (le récepteur V_{1B}), des fonctions comportementales insoupçonnées ont été découvertes, en particulier l'implication de l'hormone dans la dépression et le stress. Ces nouveaux rôles pour cette ancienne hormone ouvrent la voie à de nombreuses perspectives très intéressantes pour le physiologiste et le comportementaliste.

De ce fait, plusieurs questions se posent quant au rôle joué par chaque sous-type de récepteur dans ces processus comportementaux. De nombreuses études décrites précédemment ont placé les récepteurs OT, V_{1A} et V_{1B} au centre de ces nouvelles fonctions.

Néanmoins, les isoformes V_{1A} et V_{1B} restent les moins étudiées, souffrant d'un manque d'outils pharmacologiques sélectifs. Ainsi, en ce qui concerne le rat, aucun agoniste de haute affinité sélectif du récepteur V_{1A} n'a été caractérisé. De la même façon pour le récepteur V_{1B} , nous manquons d'outils sélectifs permettant sa localisation dans le système nerveux central. D'où la nécessité de développer de nouvelles molécules sélectives pour répondre à ces besoins.

La conception d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques pour les récepteurs de l'AVP et de l'OT est entravée par trois obstacles majeurs:

- 1) Les récepteurs AVP/OT partagent un grand degré d'homologie structurale. En conséquence, l'AVP est un peptide non sélectif qui interagit avec les quatre récepteurs de la famille AVP/OT et ceci avec une affinité nano-molaire. C'est pourquoi, il convient de générer des peptides assez différents de l'hormone naturelle pour gagner en sélectivité.
- 2) Les différences pharmacologiques entre les isoformes de récepteurs AVP/OT de rat, humain et souris sont parfois importantes (variabilité pharmacologiques inter-espèce). Elles expliquent pourquoi peu de composés sont universellement sélectifs. Ainsi le F-180, décrit comme le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} humain, ne discrimine pas un récepteur V_{1A} et OT chez le rat.

- 3) Le profil pharmacologique d'un composé donné peut également varier selon l'approche expérimentale utilisée. Chez le rat, sur la base des tests *in vivo*, le F-180 peut être considéré comme un agoniste sélectif V_{1A}/V_2 . Il présente une activité contractive significative (44% de celle de AVP), mais des propriétés antidiurétique très faibles (moins de 1% de ceux de l'AVP). Pourtant, cette sélectivité fonctionnelle n'est pas observée lors de mesure de liaison. L'affinité du F-180 pour les récepteurs V_{1A} et V_2 de rat est très faible (480 nM et 2000 nM respectivement) par rapport à l'affinité nanomolaire de l'AVP pour ces mêmes récepteurs.

L'ensemble de ces données nous a conduit, lors de ce travail de thèse, à privilégier deux axes de recherches ciblant :

Le récepteur V_{1A}

Le premier axe de recherche concerne la caractérisation d'un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez le rat. Cet outil pharmacologique faisant défaut, il était nécessaire de le développer pour poursuivre l'étude du récepteur V_{1A} *in vivo*, le rat étant avec la souris le model animal le plus utilisé au laboratoire. Un nouvel analogue, le FE 201874, a été développé par le laboratoire Ferring, et décrit comme un agoniste potentiel du récepteur V_{1A} de rat. Nous l'avons caractérisé pharmacologiquement et testé d'un point de vue fonctionnel pour évaluer son profil agoniste en système hétérologue et sur modèle natif.

Le récepteur V_{1B}

Le deuxième axe de recherche vise à caractériser des agonistes fluorescents sélectif du récepteur V_{1B} chez le rat. Ces ligands fluorescents devraient permettre de localiser les récepteurs V_{1B} centraux impliqués dans divers processus comportementaux. La connaissance des zones d'expression et de ce récepteur devraient permettre de mieux comprendre leurs mécanismes d'action. Pour cela une série d'analogues fluorescents dérivés de la $d[\text{Leu}^4, \text{Lys}^8]\text{VP}$, le premier agoniste sélectif V_{1B} caractérisé chez le rat, ont été caractérisés pharmacologiquement, puis utilisés pour étudier la distribution des récepteurs V_{1B} centraux chez le rat.

Méthodologies expérimentales

Cette partie se propose de reprendre la méthodologie expérimentale utilisée pour nos études. Certaines techniques utilisées étant détaillées dans la partie méthodes de la publication (Marir et al., 2013) seront décrites brièvement. Pour les autres, une description plus détaillée sera présentée. Une approche critique sera également portée à chaque technique, mettant en évidence les limites et les avantages de chacune.

1. Ligands et synthèse chimique

1.1 Le FE 201874

Le FE 201874 a été synthétisé par Ferring Research Institute Inc. (San Diego, CA, USA), est donc un nouveau dérivé du F-180. C'est un peptide synthétisé parmi une série de 70 peptides, présenté comme un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} humain à courte durée de vie dans le cadre du développement de nouvelles molécules à usage thérapeutique (Wisniewski et al., 2011). Le FE 201874 est un analogue de l'AVP chez lequel la tyrosine en position 2 a été substitué par une phénylalanine, la phénylalanine en position 3 par une isoleucine, la glutamine en position 4 par une homoglutamine et l'arginine en position 8 par une ornitine.

1.2 Les d[Leu⁴,Lys(Alexa)⁸]VP

Plusieurs ligands fluorescents ont été synthétisés sur la base de la structure de la d[Leu⁴,Lys⁸]VP, le premier analogue sélectif du récepteur V_{1B} de rat précédemment caractérisé par notre équipe (Pena et al., 2007) en fixant différents fluorophores sur la Lys⁸ de ce peptide. Cette approche est rendue possible grâce à l'existence d'un NH_2 libre situé sur la chaîne latérale de la Lys⁸ permettant une interaction covalente avec le fluorophore. De plus ce résidu étant situé en dehors de la poche de liaison du récepteur V_{1B} (Rodrigo et al., 2007), il est possible de modifier la structure de l'AVP à ce niveau sans trop modifier ses propriétés de liaison avec son récepteur. Une Alexa 488 et Alexa 647 ont été utilisés afin de générer des agonistes fluorescents possédant des propriétés spectrales différentes.

Le choix des fluorophores de la famille des Alexa est qu'elles présentent une très bonne luminosité ainsi qu'une bonne résistance à la dégradation et au photoblanchiment, en comparaison avec les Cyanines (Cy3 et Cy5 par exemple) (Panchuk-Voloshina et al., 1999; Berlier et al., 2003). De plus, les Alexa peuvent être relativement facile à fixer à des peptides.

L'Alexa 488 a été choisie par ce qu'elle est excitée dans la gamme des 488 nm, une longueur d'onde très commune à de nombreux microscopes à fluorescence. L'Alexa 647, a elle, été choisie pour parce qu'elle fournit un signal extrêmement lumineux ($\epsilon = 239\ 000$) par rapport à d'autres fluorophores y compris l'Alexa 488 ($\epsilon = 165\ 000$), une qualité essentielle pour détecter de faibles niveaux d'expressions de récepteurs dans des tranches de tissu. Comme l'excitation de l'Alexa 647 est dans le rouge lointain, l'auto-fluorescence cellulaire est très faible (Corbani et al., 2011).

2. Culture cellulaire

2.1 Lignées cellulaires

Différents types cellulaires exprimant de façon stable ou transitoire les différentes isoformes des récepteurs VP/OT ont été utilisés. Les travaux concernant la caractérisation des ligands pharmacologique pour l'étude des récepteurs de la vasopressine ont été effectués avec des cellules CHO, WRK1 et AtT20 exprimant de façon stable les récepteurs OT, V_{1A} et V_{1B} respectivement. Quand au récepteur V_2 , des cellules HEK ont été transfectées de façon transitoire pour l'exprimer.

Les transfections ont été réalisées par 2 approches :

- Par électroporation : c'est une méthode d'introduction d'ADN dans des cellules. L'exposition des cellules vivantes à des impulsions électriques courtes et intenses, induit des changements au niveau de la différence de potentiel transmembranaire et donc augmente la perméabilité de la membrane cellulaire. L'ADN présent dans l'espace extracellulaire peut rentrer dans les cellules en migrant vers le pôle positif de la charge, étant lui-même chargé négativement. Les cellules sont alors utilisées 24h à 48h après transfection pour avoir un taux d'expression maximal.
- Par l'utilisation d'un agent polycationique hautement branché ou dendrimères, comme le polyéthylèneimine (PEI), un polymère comportant une région cationique et une région lipidique. Cette méthode consiste à complexer l'ADN avec le PEI, le complexe ADN-PEI pénètre alors spontanément dans les cellules.

➤ *Approche critique*

La culture de cellule exprimant une seule isoforme de récepteur de façon stable (lignée cellulaire) est plus intéressante pour des études à grande échelle ou nécessitant de nombreuses expériences et ceci par ce qu'elle fournit de grandes quantités de matériel. Cependant, elle ne permet pas de tester différentes conditions d'expression des récepteurs contrairement à la transfection transitoire.

La transfection transitoire par électroporation ou par PEI permet, quant à elle, d'obtenir de grandes quantités de cellules exprimant les récepteurs d'intérêt pour un coût relativement modeste. Toutefois, l'application d'impulsions électriques sur les cellules provoque la formation de défauts nanométriques sur la membrane plasmique, défauts responsables de l'altération de la perméabilité de la membrane. De ce fait la qualité de ces cellules laisse à désirer lors de leur utilisation en imagerie.

De plus, cette méthode nécessite de transfecter les cellules préalablement à chaque expérience, ce qui très fastidieux. En outre, il faut contrôler le taux de récepteurs exprimés de façon à rester dans des proportions physiologiques car suivant le taux et l'efficacité de transfection, les résultats peuvent varier.

Pour ces études nous avons travaillé avec des taux d'expression raisonnables (>1 pmol [3 H]AVP/mg protéine membranaire) ce qui est cohérent avec les études effectuées sur tissus natif (Guillon et al., 1989).

2.2 Culture primaire

La culture primaire de cellule consiste à isoler des cellules d'un tissu d'intérêt et de les maintenir en culture, comme pour les lignées cellulaires. Pour les travaux concernant la caractérisation d'outils fluorescents pour le récepteur V_{1B} , nous avons utilisé une culture primaire d'hypophyse de rat contenant des cellules corticotropes exprimant le récepteur V_{1B} .

➤ *Approche critique*

L'avantage majeur de cette technique est qu'en culture primaire, nous disposons d'un système exprimant de façon naturelle les récepteurs d'intérêt ce qui permet de garder le contexte cellulaire naturel d'expression de ces récepteurs. Cependant, il faut noter que cette méthode est assez contraignante et qu'elle génère peu de matériel biologique.

3. Etude des propriétés de liaison des récepteurs

3.1 Expériences de saturation de la liaison à l'équilibre

L'expérience de saturation permet de prédire, lorsque l'équilibre est atteint, la quantité de ligand lié au récepteur (B) en fonction de la concentration du ligand libre (F). Elle a comme principe la mesure de la liaison spécifique à l'équilibre lors de l'incubation de concentrations croissantes de ligand radioactif avec une quantité fixe de récepteur. Ainsi, des membranes issues de cellules exprimant le récepteur d'intérêt sont incubées en présence de quantités croissantes d'hormone radioactivée avec un excès d'hormone froide (liaison non spécifique) ou sans (liaison totale). La différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique donne la fixation spécifique.

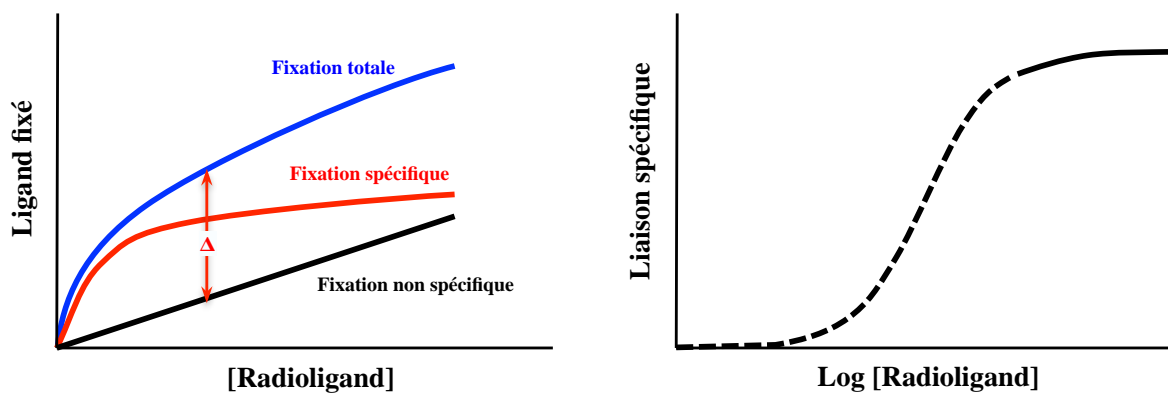
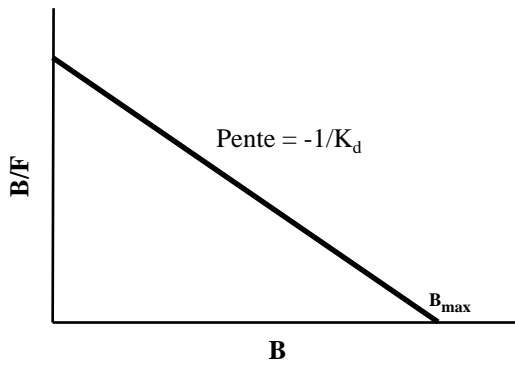


Figure 27 : Courbes de saturation

A gauche : représentation de la liaison en fonction de la concentration initiale en ligand ; à droite : représentation de la liaison spécifique en fonction du log de la concentration initiale en ligand.

La linéarisation de la courbe de saturation obtenue expérimentalement donne le diagramme de Scatchard. Ce diagramme facilite l'interprétation des résultats et permet de déduire précisément la constante d'affinité du récepteur pour son ligand (K_d) et le nombre total de sites de liaison représentant la capacité maximale de liaison (B_{max}). Une représentation en est donnée en figure 28:



B : la quantité de ligand lié.

F : la concentration de ligand libre.

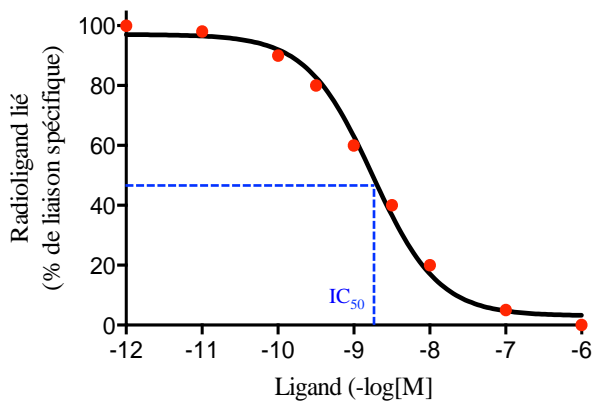
Le K_d ou constante de dissociation correspond à l'inverse de la pente.

Le B_{max} correspond à l'intersection de la droite avec l'abscisse

Figure 28 : Représentation selon Scatchard : $B/F = f(B)$.

3.2 Expérience de déplacement ou de compétition

L'expérience de déplacement permet de déterminer l'affinité de ligands non radioactifs pour le récepteur d'intérêt. C'est la mesure de la liaison spécifique à l'équilibre, d'une concentration donnée (en général égale au K_d) en ligand radiomarqué en présence d'une concentration variable et croissante de ligand froid. Le ligand froid entre en compétition avec le ligand radiomarqué pour sa liaison au récepteur, c'est pourquoi on peut parler de compétition de la liaison à l'équilibre.



$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[F]}{K_d}}$$

Figure 29 : Courbe théorique d'expérience de déplacement

Cheng et Prusoff ont déterminé en 1973 la relation qui existe entre le K_d , le K_i et l' IC_{50} (Cheng and Prusoff, 1973)

IC_{50} : Concentration inhibitrice à 50 % d'occupation des sites de liaison.

K_i : constante de dissociation à l'équilibre pour le compétiteur froid.

K_d : constante de dissociation à l'équilibre pour le ligand radiomarqué (affinité).

$[F]=[F^*]$: concentration de radioligand libre.

Le K_i représente donc bien la concentration en compétiteur froid qui se lie à 50 % des sites de liaison. Il est à préciser que l'analyse des expériences de saturation et de déplacement, telles que décrites ci-dessus, ne sont valables que dans le cas d'une liaison Mickaelienne d'une hormone avec son récepteur.

➤ *Approche critique*

Les expériences de liaison (de saturation et de compétition) sont des méthodes classiques permettant de déterminer l'affinité d'un analogue pour son récepteur. Cependant, ces expériences ne permettent que de confirmer qu'un ligand se lie avec un récepteur, ainsi que l'affinité avec laquelle il se lie.

De plus, pour être interprétables, ces expériences doivent obéir à la loi de Michaelis-Menten, c'est à dire que les ligands doivent se lier aux récepteurs de façon saturable et réversible sur des sites indépendants. Des phénomènes de coopérativité peuvent apparaître dans le cas de récepteurs possédant plusieurs sites de liaison ou de plusieurs récepteurs en interaction (oligomères de récepteurs). Ceci peut donner des courbes de Scatchards non linéaires pour de faibles ou fortes concentrations d'hormones, rendant leur interprétation complexe. Il est alors plus difficile d'analyser les expériences de déplacement.

Il est donc nécessaire de vérifier que le ligand radioactif et le ligand froid testé interagissent de façon compétitive sur le même site. Ces contrôles ont été réalisés dans nombreux cas (Serradeil-Le Gal et al., 1993). Une courbe de déplacement complet observé sur 2 ordres de grandeurs en abscisse constitue également un bon contrôle.

La nature de la molécule radioactive utilisée fait également partie des limitations de cette approche. Ainsi, un ligand iodé permettra de mesurer des concentrations faibles de récepteur comparé à un ligand tritié. Cependant l'ajout d'un atome d'iode perturbe énormément les propriétés de liaison des ligands. L'AVP iodé par exemple, présente une très mauvaise affinité pour l'ensemble des récepteurs de la famille AVP/OT. Dans d'autres cas l'ajout d'un atome d'iode sur des analogues de la vasopressine, l'OTA par exemple (Manning et al., 2008), augmente l'affinité du radioligand. Cependant, si cette approche a été possible pour générer des radioligands capables de marquer les récepteurs V_{1A} , V_2 et OT, elle n'a jamais abouti pour le récepteur V_{1B} .

Enfin, l'autre inconvénient vient du fait que les résultats obtenus pour les mesures effectuées sur préparation de membrane de tissu natif ne renseigne en rien sur le niveau d'expression d'une famille de cellule.

4. Etude des propriétés fonctionnelles des récepteurs *in vitro*

Dans nos études, la mesure de seconds messagers a été réalisée en procédant à l'incorporation d'un précurseur radiomarqué, impliqué dans la voie de signalisation étudiée, dans des cellules mises en culture exprimant le récepteur d'intérêt, le dosage des seconds

messagers se faisait par la stimulation de ces cellules avec les ligands à tester

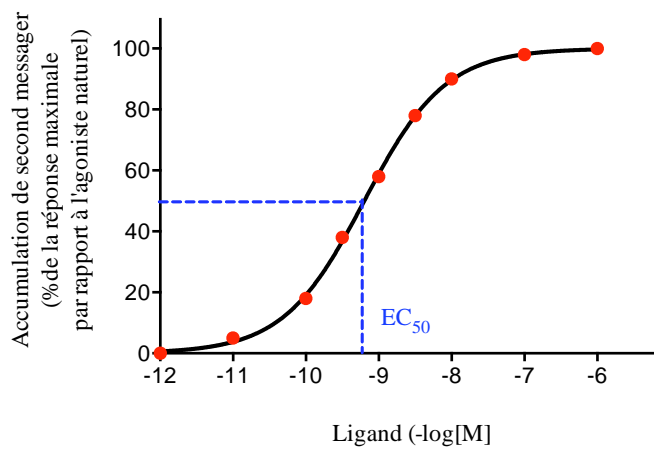


Figure 30 : Courbe théorique d'expérience de mesure de second messenger

Le K_{act} ou EC_{50} représente donc bien la concentration de ligand froid nécessaire pour induire une réponse à 50% de la réponse maximale obtenue avec l'hormone naturelle.

4.1 Voie de la phospholipase C (PLC)

L'une des voies de seconds messagers étudiée fut la voie de l'activation de la phospholipase C et la production d'inositol phosphates. Cette voie, comme le montre la figure 31 s'effectue en plusieurs étapes :

La fixation du ligand au récepteur d'intérêt induit l'échange GDP- GTP sur la protéine Gq qui se lie ensuite à une molécule de GTP. Cette liaison conduit à la dissociation de la protéine hétérotrimérique Gq activée et à l'association de la sous-unité $G_{\alpha q}$ à la phospholipase C (PLC) ce qui provoque son activation. La PLC ainsi activée, hydrolyse le PIP_2 (phosphatidyl-inositol-4-5-biphosphate) en IP_3 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycérol).

Le dosage des inositol phosphates implique donc l'incorporation de myo-[2- H^3] inositol dans les cellules. Celui-ci sera métabolisé en inositol lipides radiomarqués, précurseur des inositol phosphates. Les inositol phosphates marqués seront libérés lors de l'hydrolyse des inositol lipides par la phospholipase C et comptés par scintillation β .

L'ajout de chlorure de lithium lors des stimulations par les différents agonistes ou antagonistes bloque la conversion d'inositol-mono-phosphate en inositol et permet donc l'accumulation des inositol phosphates radiomarqués mesurés lors de l'expérience.

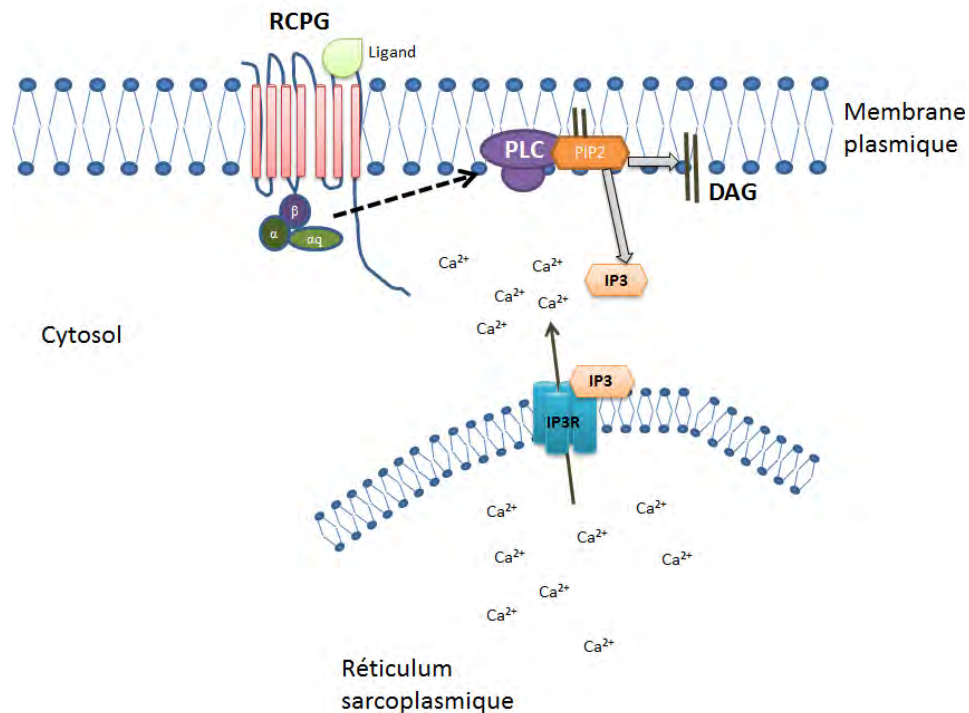


Figure 31 : Activation de la voie phospholipase C

RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; PLC: phospholipase C ; PIP2: phosphatidyl inositol biphosphate ; DAG: diacylglycérol ; IP3: inositol 1,4,5- triphosphate ; IP3R : récepteur à l'IP3 ; IP3R : récepteur à l'IP3.

Suite aux différentes stimulations, les échantillons issus des cellules sont élués de façon séquentielle sur colonnes échangeuses d'ions. L'inositol libre non métabolisé n'est pas retenu sur les colonnes échangeuses d'ions. Sa mesure rendra compte du nombre de cellules. Les inositols phosphates sont quant à eux retenus sur colonnes et élués avec une solution d'ammonium formate/acide formique. Leur mesure normalisée à la quantité d'inositol libre obtenue pour chaque échantillon permet une normalisation des données ainsi qu'une meilleure reproductibilité.

4.2 Voie de l'adénylate cyclase (AC)

L'autre voie de seconds messagers testée fut la voie de l'adénylate cyclase et la production d'AMP cyclique.

Pour doser l'AMPc, de l'adénine tritiée est incorporée aux cellules. Celle-ci sera convertie, très majoritairement en ATP radiomarqué qui sera hydrolysé en AMPc radiomarqué lors de l'activation de l'adénylate cyclase. L'ajout d'inhibiteur de phosphodiesterase (isobutylmethylxanthine, IBMX) lors des stimulations par les différents analogues bloque la conversion d'AMPc en AMP, et permet donc l'accumulation d'AMPc qui sera mesuré lors du test.

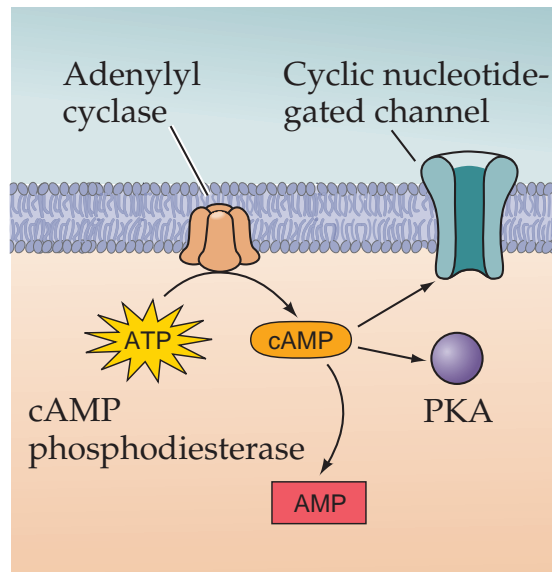


Figure 32 : Activation de la voie adénylate cyclase

ATP Adénosine triphosphate ; cAMP : cyclique adénosine monophosphate ; PKA : protéine kinase A.

Suite aux différentes stimulations, les échantillons issus de cellules sont élués de façon séquentielle sur colonnes DOWEX, qui permettent de récupérer l'ATP radiomarqué puis sur des colonnes d'alumines, qui permettent de récupérer l'AMPc radiomarqué. Sa mesure normalisé à la quantité d'ATP radiomarqué obtenue pour chaque échantillon permet une normalisation des données ainsi une meilleure reproductibilité.

➤ *Approche critique*

L'étude des voies de seconds messagers permet de déterminer la nature pharmacologique des ligands étudiés (agoniste, antagoniste, agoniste inverse). Les expériences réalisées par marquage métabolique permettent une normalisation pour chaque point de l'expérience.

Ainsi, la quantité de précurseurs de seconds messagers (ATP pour l'AMPc et inositol pour les inositol phosphates) est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le puits. Cette normalisation permet d'avoir des résultats plus précis et moins dispersés. Cependant, le marquage métabolique nécessite un grand nombre de manipulations et l'usage de radioéléments qui peuvent être dangereux. De plus, les résultats ne peuvent pas être exprimés en valeurs directes : ils doivent être calculés en pourcent de conversion du précurseur.

4.3 Voie des MAP kinases, phosphorylation de ERK

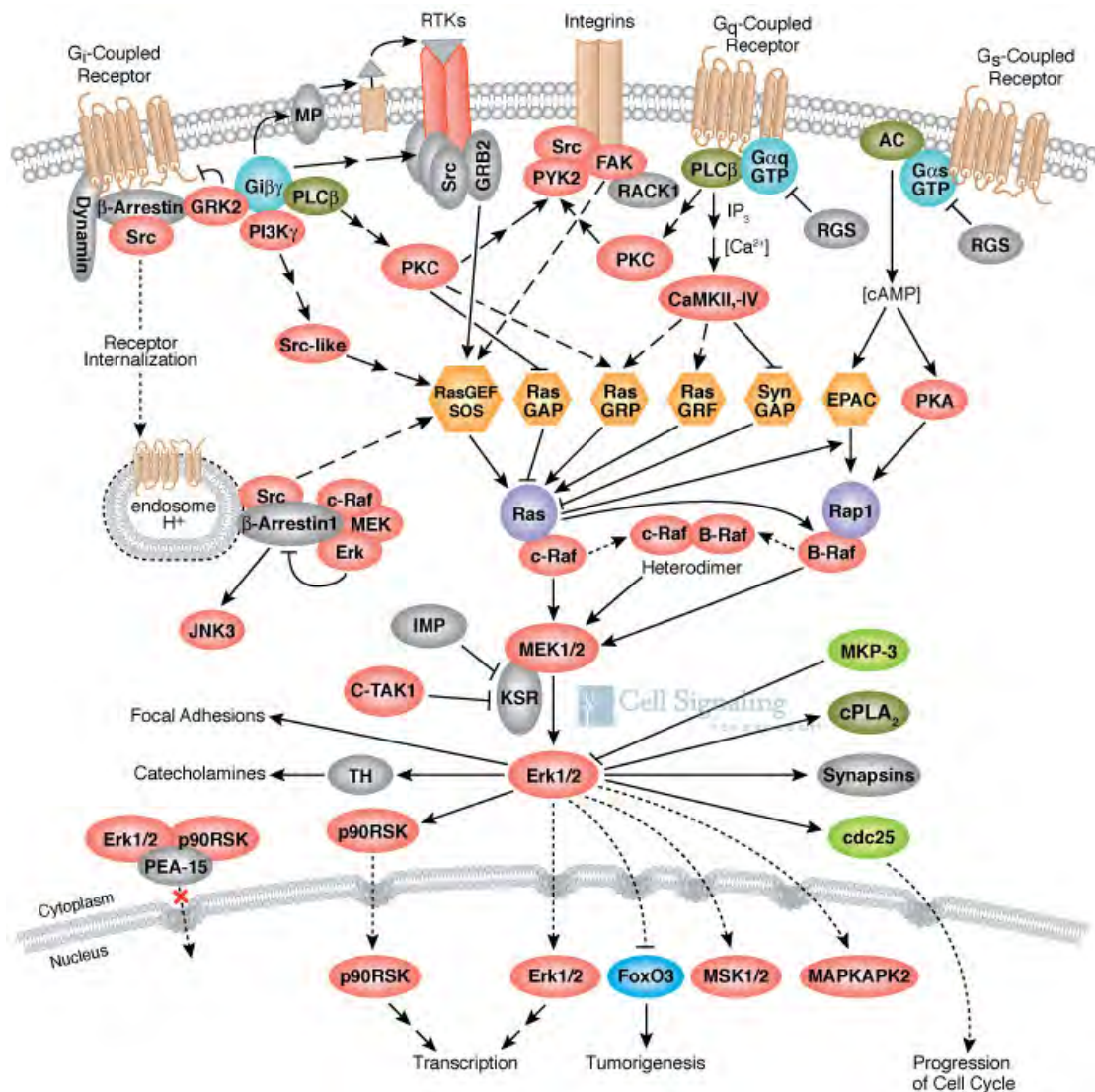


Figure 33 Activation de la voie MAP kinase (Furler and Uittenbogaart, 2010)

Les protéines ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) sont des kinases qui appartiennent à la famille des MAP kinases. Ces protéines interviennent principalement dans la croissance et la prolifération cellulaire. La régulation de la voie MAP kinases est complexe et multifactorielle (Figure 33). Certaines techniques permettent une approche immunohistochimique de la mesure de l'activation de cette voie.

Cette voie a été étudiée dans le deuxième chapitre des résultats concernant la caractérisation fonctionnelle des récepteurs V_{1B} centraux sur coupe de cerveau de rat. La détection de pERK est réalisée à l'aide d'un premier anticorps dirigé contre cette protéine et d'un second anticorps couplé à la peroxydase qui sera détecté par réaction de luminescence.

➤ *Approche critique*

L'emploi d'anticorps anti-pERK permet de localiser par marquage confocale les cellules activées par l'analogue testé sur coupe de tissu frais. Cette technique permet donc une localisation fonctionnelle d'un récepteur donné si on utilise un agoniste spécifique de ce dernier. Cependant, cette technique de marquage *in situ* nécessite l'utilisation successive de deux anticorps différents, ce qui constitue une contrainte de manipulation. De plus, le principal désavantage de cette technique est qu'elle soit qualitative non quantitative. En effet, celle-ci permet de marquer les cellules activées sans pour autant nous renseigner sur la stimulation maximale de ces cellules ou les niveaux d'expression du récepteur considéré.

En revanche, sur des lignées cellulaires, l'utilisation de kit Cisbio Phospho-ERK HTRF (Cisbio BioAssay) pour mesurer l'activité MAP kinases d'un récepteur donné semble nettement plus intéressante et permet d'obtenir une quantification de la stimulation.

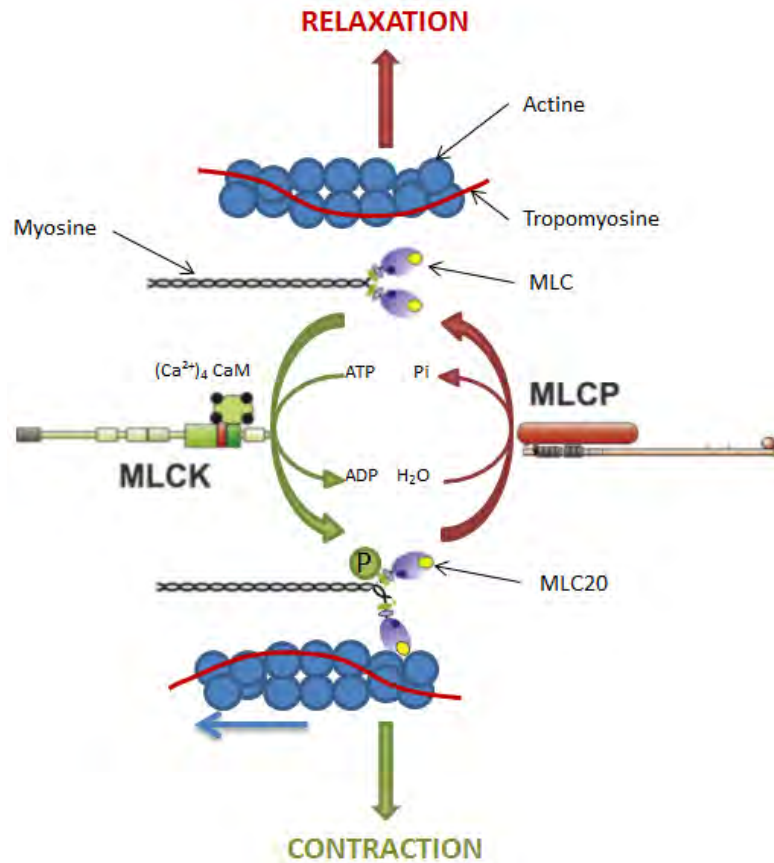
Toutefois la mesure de l'activité des MAP kinases reste délicate puisque elles sont facilement activables, ce qui peut générer parfois des faux positifs même dans des conditions contrôlées et donc nécessiter plusieurs expériences pour obtenir un résultat reproductible.

5. Etude des propriétés fonctionnelles *ex vivo* des récepteurs

Les cellules musculaires lisses vasculaires contiennent des filaments d'actine et de myosine qui forment l'appareil contractile (Figure 34).

Les filaments épais sont constitués principalement de myosine. La myosine possède une activité enzymatique ATPase nécessaire à sa fonction motrice. D'un point de vue fonctionnel, la myosine possède une activité de dégradation de l'ATP contrôlée par le Ca^{2+} . Elle ne peut interagir avec l'actine que si ses chaînes légères sont phosphorylées. La phosphorylation des chaînes légères régulatrices (MLC) provoque un changement de conformation de la myosine qui devient plus allongée et capable de se lier avec l'actine (myosine activée) (Cole and Welsh, 2011)

Les filaments fins sont constitués principalement d'actine. Les autres protéines constituant le filament fin sont la tropomyosine, la caldesmone et la calponine. La fixation de la myosine activée (qui a lié une molécule d'ATP) sur l'actine provoque un changement de conformation de la myosine qui va pivoter et provoquer un glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais. La force nécessaire est produite par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine.



*Figure 34 : Régulation de la contraction/relaxation dans cellules musculaires lisses –
Mécanisme d'action des MLCK et MLCP*

MLC : Myosin Light Chain ; MLCK : Myosin Light Chain Kinase ; MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase ; CaM : Calmoduline ; MLC20 : chaîne légère de la myosine phosphorylée (Schéma adapté de Cole et Welsh, 2011).

Ce changement de conformation va également libérer l'ADP et permettre la fixation d'un nouvel ATP (Figure 34).

La mesure *ex vivo* des propriétés fonctionnelles d'un ligand consiste à mesurer sa capacité à induire une réactivité vasculaire et dans notre cas d'étude une contractilité des anneaux d'aorte isolée.

Il a déjà été démontré que l'AVP peut induire une contraction soutenue d'anneaux vasculaires isolés obtenus à partir de l'aorte de rat. Ce modèle semblerait donc approprié pour caractériser les propriétés fonctionnelles des agonistes à tester *ex vivo*.

Les réponses aux concentrations cumulées des différents analogues sont mesurées. A la fin de la stimulation, une concentration saturante d'AVP est appliquée pour normaliser la contraction à la réponse maximale induite par l'AVP, ceci permet une meilleure reproductibilité des résultats obtenus.

➤ *Approche critique*

Les techniques de mesure de contractilité d'anneaux aortiques isolés permettent de déterminer le pouvoir contractant d'un ligand donné. Ces techniques font appel à des transducteurs reliés aux anneaux aortiques permettant la conversion de la tension exercée par ces anneaux.

L'intérêt de ces techniques est surtout la possibilité d'effectuer plusieurs mesures pour un seul et même animal. Ainsi, un rat par exemple, fournit une aorte complète qui à son tour peut être découpée en 4 à 6 anneaux de même taille (environ 3 mm) tous disposés séparément dans des cuves à bain reliées au dispositif de mesure. La stimulation par l'injection de l'analogue directement dans la cuve donne une réponse instantanée des anneaux aortique et donc une mesure immédiate. De plus, la préstimulation avec l'acétylcholine permet de vérifier la qualité de la désendothélialisation des anneaux aortiques qui provoquerait leur décontraction juste après la stimulation.

Cependant, l'utilisation de cuve unique pour une seule et même dose réponse et la désensibilisation progressive après stimulation impose d'utiliser des doses cumulatives d'un analogue, ce qui impose des calculs répétés pour déterminer les doses à rajouter afin d'obtenir la dose final à chaque concentration voulu. De plus, la moindre erreur de concentration, de manipulation ou de contamination, imposerait le rinçage de la cuve et la reprise des mesures au tout début de la première stimulation.

6. Etude de la prolifération cellulaire *in vivo*

L'incubation des cellules vivantes en présence d'analogues de nucléotides d'ADN, qui s'incorpore exclusivement lors de la réplication de l'ADN en phase S tels que la ³H-thymidine (détecté *in vitro* par comptage à scintillation, ou *in vivo* par autoradiographie) ou le Bromo-desoxy-uridine BrdU (détecté par immunocytochimie grâce à un anticorps spécifique anti-BrdU) peut fournir diverses informations selon le protocole expérimental choisi, étant donné que le cycle cellulaire dure en moyenne 16 à 24 heures :

- Si le prélèvement par rapport à la fixation de l'échantillon a lieu quelques heures après la première administration du nucléotide marqué, le marquage obtenu reflète l'activité mitotique instantanée.

- Si le prélèvement par rapport à la fixation de l'échantillon est effectué au moins un jour après une administration ponctuelle du nucléotide marqué, on peut suivre le devenir des cellules néoformées par division ; notamment *in vivo*, on peut voir si la prolifération est suivie de migration des cellules filles. Si on attend suffisamment longtemps (quelques semaines), on peut déterminer le phénotype dans lequel les cellules-filles se différencient, en combinant le marquage immunocytochimique BrdU avec le marquage immunocytochimique d'un marqueur phénotypique (double immunocytochimie).

Dans nos études, l'estimation des propriétés fonctionnelles *in vivo* consiste à mesurer la prolifération cellulaire induite par les ligands à tester grâce à l'utilisation du BrdU qui s'incorpore à l'ADN des cellules en phase de réplication (phase S du cycle cellulaire). Le BrdU est administré par injection IP à tous les animaux.

Des anticorps spécifiques pour BrdU peuvent ensuite être utilisés pour détecter le produit chimique incorporé, indiquant ainsi les cellules qui ont répliqué activement leur ADN. La liaison de l'anticorps nécessite la dénaturation de l'ADN, le plus souvent en exposant les cellules à l'acide ou à la chaleur.

➤ *Approche critique*

L'utilisation du BrdU peut présenter de nombreux avantages pour les études de proliférations cellulaires. Ainsi, le BrdU peut être transmis aux cellules filles lors de la réplication et peut être détectable plus de deux ans après la perfusion.(Eriksson et al., 1998).

Parce que le BrdU peut remplacer la thymidine lors de la réplication de l'ADN, il peut provoquer des mutations, et son utilisation est donc potentiellement un danger pour la santé du manipulateur. Toutefois, parce qu'il n'est ni radioactif ni myélotoxique à des concentrations de marquage, il est largement préféré pour les études *in vivo* des proliférations cellulaires cancéreuses.(Fujimaki et al., 1991; Hoshino et al., 1992). Cependant, à des concentrations radiosensibilisantes, le BrdU devient myelosuppressif, limitant ainsi son utilisation à la radiosensibilisation.(Russo et al., 1984).

De plus, à cause du mode semi-conservatif de la réplication de l'ADN, la dilution du marqueur le rend indétectable à partir de deux cycles de division. Pour pallier à cette dilution, dans le cas de cellules à prolifération peu intense (c'est le cas des cellules souches de l'hippocampe de Mammifères adultes), on peut renouveler l'administration de nucléotide

marqué plusieurs fois de suite (sachant que *in vivo*, ce marqueur est éliminé au bout de deux heures) : on parle alors de marquage cumulatif.

Enfin, il est à préciser également que le rôle d'un analogue décrit *in vivo* est souvent différent de celui décrit *in vitro*. On peut penser que les effets observés au niveau d'une population de cellules en culture primaire peuvent être biaisés par des artéfacts d'expression de protéines impliquées dans la cascade proliférative. De plus, une même hormone peut avoir des effets opposés selon le tissu considéré impliquant des mécanismes directs ou indirects.

Pour finir, l'inconvénient majeur de cette technique concerne la lourdeur expérimentale puisque celle-ci limite beaucoup le nombre de paramètres à tester. Sachant qu'il faut utiliser un animal par condition et en travaillant dans des conditions *in vivo* ces résultats doivent être obtenus sur au moins 3 animaux différents.

7. Etudes sur le marquage et la localisation des récepteurs

L'utilisation des caméras vidéo, des images électroniques et du traitement informatique a conduit à une renaissance de la microscopie optique au cours des trois dernières décennies. La mise au point d'un nouveau type de microscope y a également contribué. Quand on examine, au microscope optique, une cellule entière ou une coupe d'organe, on observe normalement l'objet à différentes profondeurs par une mise au point qui modifie la position de l'objectif. Ce faisant, des parties de l'objet sont au point et d'autres ne le sont plus. Mais la possibilité de mettre l'objet au point à différents niveaux réduit la netteté de l'image parce que les parties de l'objet situées au dessus et en dessous du plan de focalisation interfèrent avec les rayons issus de la région mise au point. Le développement du microscope optique à balayage confocal a permis de fournir une image d'un plan mince situé au sein d'un objet beaucoup plus épais.

Enfin, le microscope utilisé lors de nos études, tire profit également du phénomène de fluorescence, par l'utilisation de fluorochromes. Dans ses applications les plus fréquentes, le fluorochrome est uni par covalence à un anticorps ou à un ligand, afin de produire un anticorps ou un ligand fluorescent utilisable pour localiser une protéine spécifique, en l'occurrence les récepteurs V_{1B} de rat, au sein d'une cellule ou d'un tissu.

Afin d'étudier la distribution des récepteurs V_{1B} au niveau central, nous avons choisi comme approche l'utilisation d'analogues fluorescents et leur détection en microscopie confocale. Pour cela, nos études se sont basées sur le marquage de cultures cellulaires hétérologue et natives ainsi que le marquage de tranche de cerveau de rat.

7.1 Marquage en culture cellulaire hétérologue

Les cellules AtT20 et CHO sont mises en culture sur des lamelles prétraitées à la polyornithine dans des boîtes 12 puits et incubées dans un milieu DMEM, BSA 0.2 mg/mL, HEPES 25 mM, pH 7.4 pendant 1h à 12 °C en présence d'un ligand fluorescent en absence ou en présence d'un analogue (agoniste ou antagoniste) de la vasopressine non-fluorescent. Dans ce dernier cas, une pré-incubation des cellules pendant 30 minutes dans le même milieu contenant uniquement ces ligands a été effectuée. Après 3 lavage avec du PBS froid, les cellules sont fixées dans du PFA à 4% à 4 °C durant toute une nuit, puis montées sur lame avec du Mowiol.

7.2 Marquage en culture primaire de cellules hypophysaires

Les hypophyses de rat sont disséqués et la post-hypophyse éliminée. Après 3 lavages dans un milieu DMEM-F12, les glandes sont coupées en petits morceaux, transférées dans un tube en silicone et incubées dans dispase/collagénase (type I) /DNase pendant 45 minutes à 37 °C. Les cellules sont ensuite dispersées mécaniquement avec une pipette Pasteur siliconées puis centrifugées 5 minutes à 1000 rpm à température ambiante. Les cellules sont resuspendues ensuite dans 3 ml de milieu OptiMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, mises en culture dans une boîte traitée à la polyornithine et incubées une nuit à 37 °C à 5% de CO₂. Le jour suivant, les cellules sont incubées avec un ligand fluorescent comme décrit précédemment avec les cellules AtT20 et CHO. Après une fixation d'un jour à 4% de PFA et 3 lavages, les cellules sont incubées pour le marquage aux anticorps de l'ACTH (anticorps primaire IgG anti-ACTH chez le lapin, puis anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé Cy3, Jackson Lab.) et finalement incubées en présence de Hoechst pour l'identification des noyaux.

7.3 Marquage sur tranches de cerveau

Des rat Sprague Dawley âgés de 6 à 8 semaines sont sacrifiés et leur cerveau est immédiatement prélevé et immergé dans un tampon de coupe refroidi à 2°C et oxygéné (sucrose 195 mM ; NaCl 10mM ; KCl 2,5 mM ; NaH₂PO₄ 1,25 mM ; NaHCO₃ 26 mM ; glucose 15 mM ; CaCl₂ 1 mM et MgCl₂ 2 mM) . Le cerveau est ensuite sectionné en coupes de 350 microns d'épaisseur à 2°C en orientation coronale ou sagittale. Les tranches sont ensuite incubées pendant 1h à 12°C dans un tampon DMEM-BSA-HEPES (MBH) contenant le ligand fluorescent en l'absence ou en présence d'antagoniste dans une plaque à 12 puits. Les tranches

sont ensuite lavées 3 fois avec 1.4 ml de PBS sur glace et 1ml de PFA 4% est ajouté pour la fixation pendant une nuit à 4 °C. Après 2 nouveaux lavages, les anticorps sont rajoutés à la dilution d'intérêt dans du PBS ; BSA 2mg/ml ; Triton 0.1% (1ml/tranche) puis la plaque à 12 puits est incubée une nuit à 4 °C. Le jour suivant, après 3 lavages (1.4 mL PBS), le second anticorps est ajouté dans le même tampon PBS/BSA/triton et les tranches sont incubées pendant une heure à température ambiante sous agitation légère. Après 3 lavages, 0.5 µL de Hoescht dans 1 mL de PBS sont ajoutés et les tranches sont incubées pendant au moins 15 minutes à température ambiante. La dernière étape (Hoescht) est lavée juste avant d'imager. Les tranches de cerveau sont conservées dans du Na Azide 0.2% à 4 °C.

7.4 Acquisition des images en microscopie confocal

Les marquages cellulaires effectués sur les lignées cellulaire ainsi que sur culture primaire ont été imagées avec un microscope confocal Zeiss LSM510 Meta équipé d'un microscope Axiovert200 M. Un objectif 40X (NA 1.4) en immersion à huile a été utilisé. Pour la détection des cellules marquées à l'Alexa 488, l'excitation a été effectuée avec un laser argon ($\lambda = 488$ nm). L'émission de couleur verte a été collectée grâce à un filtre d'émission à bande passante 505-530 nm. Pour la détection de l'Alexa 647, un laser 633 nm hélium/néon a été utilisé. L'émission a été collectée avec un filtre LP650 nm. Pour la quantification de fluorescence, le logiciel Zeiss LSM Browser a été utilisé comme décrit précédemment (Corbani et al., 2004) avec 30 à 40 cellules pour chaque condition. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

Les images de tranches de cerveau de rat en revanche, ont été obtenues avec un microscope macroconfocal LSI Leica Leica à champ large utilisant un objectif à air x5. La distance focale est de 2.2 cm. Quatre lasers sont disponibles : Diode 405 nm (Hoescht), Argon 488 nm (Alexa488), Helium 561 nm (Cy3) et Helium 633 nm (Alexa647) et les fenêtres d'émission leur correspondant sont ajustées manuellement. Les images sont acquises sous le logiciel Leica LSA AF Lite, converties en jpeg ou en tiff et montées avec Photoshop

➤ *Approche critique*

L'utilisation de fluorophores en biologie cellulaire est un peu plus récente que celle d'isotopes radioactifs. Elle a l'avantage de donner des résultats très rapidement, en s'affranchissant des longs temps d'exposition requis pour les techniques par radioactivité, notamment avec des sondes tritiées (un mois environ)

De plus, le développement de nouveaux fluorophores ayant un rendement quantique important, tel que les Alexa, permet de marquer des structures, telles que des récepteurs, même exprimés en très faibles quantités.

En outre, la microscopie confocale permet une utilisation plus simple provoquant moins d'artéfacts de marquage. Grâce à son niveau de résolution, il est désormais possible d'avoir accès à un marquage subcellulaire, ce que ne permet pas l'utilisation de molécules radiomarquées à l'iode 125 par autoradiographie.

Cependant, la fluorescence peut présenter le désavantage de ne pas être permanente, l'intensité de la fluorescence diminuant avec le temps jusqu'à devenir indétectable (quenching).

Résultats expérimentaux

Chapitre 1 : Caractérisation du premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} de la vasopressine de rat

Ce chapitre constitue la première partie de mon travail de thèse : La caractérisation d'outils pharmacologique sélectif du récepteur V_{1A} de rat.

Il concerne la caractérisation d'une molécule dérivée du F-180 (premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez l'homme), le FE 201874 qui a été synthétisé par Kazimierz Wiisniewski dans le but de développer de nouveaux agonistes V_{1A} à visée thérapeutique.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire Ferring (Institut de recherche Ferring, San Diego en Californie, USA). Les peptides utilisés dans cette étude ont été synthétisés et purifiés par le Dr K. Wisniexski.

Dans cette étude, j'ai effectué l'ensemble des expériences de pharmacologie de liaison et de couplage, ainsi que les expériences de mesure de l'effet mitotique in vivo. J'ai réalisé également les expériences de contraction d'anneaux d'aorte de rat sous la supervissions du Dr. Anne Virsolvy à l'institut national de la santé et de la recherche publique, dans l'unité du Dr Sylvain Richard (INSERM U1046).

Les expériences de validation in vivo du FE 201874 concernant le blocage de la lactation chez les rates allaitantes ont été supervisées par le Dr Michel G Desarménien.

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le journal : British journal of pharmacology.

1. Problématique

Le développement de ligands spécifiques (peptidiques ou non-peptidiques) a constitué, et constitue toujours, un domaine de recherche actif. Celui-ci génère régulièrement de nouvelles molécules possédant un intérêt thérapeutique potentiel, ainsi que de nouveaux outils pour la recherche académique.

L'étude pharmacologique des récepteurs de la vasopressine a nécessité la synthèse de ligands peptidiques et non-peptidiques, agonistes et antagonistes, pouvant discriminer un récepteur parmi les trois autres isoformes. D'un point de vue fondamental, ces composés permettent de déterminer l'implication d'un récepteur donné dans une action physiologique qui lui est propre. De nombreux antagonistes de l'isoforme V_{1A} sont connus. Ainsi, le SR49059 est un antagoniste non-peptidique permettant d'étudier spécifiquement le récepteur V_{1A} et cela chez l'homme et le rat.

Ces dix dernières années, les ligands sélectifs du récepteur V_{1A} ont fait l'objet de nombreuses recherches. La découverte du F-180, premier agoniste peptidique sélectif du récepteur V_{1A} humain, permet d'étudier spécifiquement ce récepteur au niveau vasculaire ou encore hépatocytaire. Cependant, à ce jour, aucun agoniste sélectif de ce même récepteur n'a été décrit chez les rongeurs, un modèle animal de prédilection pour étudier les effets cognitifs et comportementaux des hormones neurohypophysaires.

Cette partie de la thèse va s'attacher à présenter la caractérisation des propriétés pharmacologiques d'un nouveau composé, le FE 201874. Ce composé, dérivé du F-180 et synthétisé par *Ferring Research Institute Inc.* parmi une série de 70 peptides, a été présenté comme un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} humain à courte durée de vie dans le cadre du développement de nouvelles molécules à usage thérapeutique. Il semblerait présenter chez le rat, sur la base de données préliminaires, une certaine spécificité V_{1A} mais a été très peu étudié (Wisniewski et al).

La publication présentée dans ce mémoire, décrit la structure de ce composé ainsi que ses propriétés pharmacologique et fonctionnelle. Elle a pour but de combler le manque en agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez le rat.

2. Publication et principaux résultats

Pharmacological characterization of FE 201874, the first selective high affinity rat V_{1A} vasopressin receptor agonist

Cette publication présente les données relatives à la caractérisation pharmacologique et physiologique du FE 201874, le premier agoniste de haute affinité sélectif du récepteur V_{1A} de rat.

La caractérisation pharmacologique du FE 201874 a été réalisée chez le rat par plusieurs approches *in vitro*. Nous avons montré que ce dérivé du F-180 possède une affinité nanomolaire pour le récepteur V_{1A} présent sur les membranes de cellules WRK1 et de foie de rat ($K_i = 0.65 \pm 0.04$ et $K_i = 1.5 \pm 0.1$ nM respectivement). Il présente une sélectivité V_{1B}/V_{1A} et V₂/V_{1A} très bonne. Cependant, il est peu sélectif vis à vis du récepteur OT ($K_i = 61.8 \pm 14.2$ nM). De même, le FE 201874 n'est pas complètement sélectif chez l'homme et la souris, espèces chez lesquelles il présente aussi une mauvaise sélectivité vis-à-vis du récepteur de l'ocytocine.

L'étude des propriétés fonctionnelles du FE201874 montre qu'il se comporte comme agoniste complet du récepteur V_{1A}. De façon intéressante, comme cela a déjà été décrit pour son précurseur, le F-180 (Andrés et al., 2002), le FE201874 se comporte comme un antagoniste du récepteur OT de rat. Cette propriété confère donc une sélectivité complète de l'isoforme V_{1A} en test fonctionnel.

La spécificité pharmacologique du FE 201874 a aussi été validée *ex vivo* et *in vivo* puisqu'il est capable, tout comme l'AVP, de stimuler la contraction d'anneaux aortique ainsi que la prolifération cellulaire au niveau cortico-surrénalien, deux fonctions connues pour dépendre de l'activation du récepteur V_{1A} de la vasopressine.

Ce composé va compléter la batterie d'outils disponibles pour déterminer la contribution de chaque isoforme des récepteurs AVP/OT dans les processus physiologiques et cognitifs.

3. Discussion

Notre étude a permis la caractérisation du premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez le rat. D'un point de vue pharmacologique, le FE 201874 est un très bon ligand sélectif V_{1B}/V_{1A} et V_2/V_{1A} vis à vis des expériences de liaison et peu sélectif OT/ V_{1A} , ce composé ayant une affinité non négligeable pour le récepteur OT. Son caractère, agoniste V_{1A} et antagoniste OT lui confère une sélectivité complète V_{1A} pour toute approche fonctionnelle. Ainsi, avec le SR49059 (antagoniste sélectif du récepteur V_{1A} (Serradeil-Le Gal et al., 1993), le physiologiste possède tout l'arsenal pharmacologique nécessaire pour caractériser chez le rat, sans ambiguïté, l'implication du récepteur V_{1A} dans une action physiologique donnée.

L'avantage de ce peptide tient en partie à sa structure peptidique qui lui confère, à la différence du SR49059, une bonne solubilité dans les solvants aqueux ce qui facilite son utilisation. Ainsi, il n'est pas nécessaire de le dissoudre dans le DMSO, avant son utilisation sous forme diluée dans des tampons physiologiques pouvant conduire à des artefacts dus à des re-précipitation lors de l'injection *in vivo*. Cependant, tout comme l'AVP ou l'ocytocine, il se dégrade assez vite.

En utilisant le FE201874 comme dans nos expériences de mesure de prolifération cellulaire au niveau surrénalien par diffusion à l'aide de mini-pompes osmotiques, nous pouvons garantir un niveau de peptide circulant relativement stable et donc proche de la réalité physiologique. L'ensemble de ces propriétés en font un bon outil pour la réalisation de tests comportementaux où le récepteur V_{1A} est suspecté de jouer un rôle.

D'un point de vue chimique, ce peptide possède aussi une ornithine en position 8 donc un NH_2 situé sur la chaîne latérale du peptide disponible pour greffer un résidu donné. L'acide aminé en position 8 est en général situé en dehors de la poche de liaison du récepteur (Rodrigo et al., 2007). Insérer en cette position un fluorophore par exemple devrait donc ne pas trop altérer les propriétés de liaison de cet analogue. Il est donc possible de générer à partir de ce peptide sélectif une sonde fluorescente marquant les récepteurs V_{1A} .

Ce peptide stimulant *in vivo* la prolifération cellulaire, il serait intéressant de vérifier si c'est aussi un agoniste de la voie des MAP kinases comme c'est le cas pour la vasopressine qui agit au niveau du tubule rénal via le récepteur V_2 (Oligny-Longpré et al., 2012). Dans l'affirmative le FE201874 pourrait être utilisé sur coupe fraîche de tissus pour révéler la présence de récepteur V_{1A} fonctionnel et constituer une nouvelle façon de cartographier le récepteur V_{1A} tout en étudiant sa fonction (Refojo et al., 2005).

Chapitre 2 : Caractérisation d'agonistes fluorescents sélectifs en vue de la cartographie du récepteur V_{1B} chez le rat

Ce chapitre constitue la seconde partie abordée lors de mon travail de thèse. Il concerne la caractérisation pharmacologique chez le rat de ligands fluorescents dérivés de la d[Leu⁴,Lys⁸]VP, le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1B} de la vasopressine.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr Maurice Manning (Université de Toledo, en Ohio, USA) ainsi que le Dr Csaba Tomboly (Biological Research Center, Académie des Sciences de Hongrie, Szeged), qui ont réalisé la synthèse des peptides fluorescents.

Dans cette étude, j'ai effectué l'ensemble des expériences pharmacologiques de liaison et de couplage ainsi que les premières validations des ligands fluorescents sur système hétérologue de culture cellulaire.

Les expériences de marquage de récepteur V_{1B} sur tranches de cerveau de rat au moyen des ligands fluorescents caractérisés dans cette étude ont été réalisées sous la direction du Dr Maïthé Corbani.

1. Problématique

La vasopressine et l'ocytocine sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques tant périphériques que centrales. Ces fonctions sont régulées par les récepteurs V_{1A} , V_{1B} , V_2 ainsi que le récepteur OT. Les récepteurs V_{1B} connus pour être exprimés et fonctionnellement actifs au niveau hypophysaire, médullo-surrénalien et pancréatique (Koshimizu et al., 2012) sont aussi présents au niveau central et soupçonnés aussi de participer activement à la régulation de nombreuses fonctions cognitives et comportementales impliquées dans les systèmes de récompense, de mémoire, de la sociabilité (avec V_{1A} et OT-R) et surtout dans les processus de stress et de la dépression.

Connaître la distribution centrale du récepteur V_{1B} permettrait de mieux appréhender le mode d'action de la vasopressine par ce récepteur dans les régions centrales connues pour être responsables de la régulation des processus comportementaux.

Le développement de ligand tritiés et radiomarqués sélectifs des récepteurs V_{1A} , V_2 et OT (pour revue Manning et al., 2008, 2012; Neumann and Landgraf, 2012) a permis leurs localisation tant au niveau rénal pour le récepteur V_2 , qu'au niveau périphérique et central pour les récepteurs V_{1A} et OT. Ces données ont été confirmées ensuite par différentes techniques de biologie moléculaire (RT-PCR ou hybridation *in situ* d'ARN messagers codant pour ces récepteurs) (Lolait et al., 1995; Saito et al., 1995; Hurbin et al., 1998, 2002; Vaccari et al., 1998; Young et al., 2006).

Cependant les premières sondes moléculaires utilisées n'étaient pas toujours strictement sélectives et certains résultats restent encore sujets à caution.

En ce qui concerne les récepteurs V_{1B} , leurs présences au niveau hypophysaire a pu être démontrés à l'aide d'AVP tritiée par des expériences de liaison sur membranes hypophysaires avec des ligands sélectifs V_{1B} (Gaillard et al., 1984) et par autoradiographie sur des glandes hypophysaires de bœuf exprimant spécifiquement d'assez grandes quantités de cette isoforme (Andrés et al., 2004). Leur présence au niveau central a été validée par différentes approches expérimentales :

- La caractérisation de messagers codant pour ce récepteur dans différentes zones du cerveau (Koshimizu et al., 2012).
- Des expériences d'immunocytochimie avec un anticorps polyclonal dirigé contre l'isoforme V_{1B} (Hernando et al., 2001).

- Des expériences d'électrophysiologie montrant dans l'hippocampe des modulations de LTP dans certains neurones de la zone CA2 sous stimulation avec un agoniste sélectif du récepteur V_{1B} (Chafai et al., 2012 et résultats non publiés)

Cependant, elles restent à confirmer. En effet, il n'a jamais été possible de détecter les sites V_{1B} par autoradiographie (Guillon G. Tribolet E. données non publiées). Cela est dû probablement à la faible densité de récepteur V_{1B} dans le cerveau de rongeur, à l'incapacité de générer des ligands sélectifs du récepteur V_{1B} radiomarqués à [¹²⁵I] puisqu'ils perdent toute activité de liaison et enfin à l'incapacité de générer, comme l'ont fait Hernando et ses collaborateurs en 2001, un anticorps polyclonal anti-V_{1B} sélectif, et ceci malgré de nombreux essais infructueux (Guillon G. données non publiées).

De nombreux outils fluorescents ont été synthétisés et utilisés pour localiser des récepteurs hormonaux y compris ceux de la vasopressine (Mouillac et al., 2008). Nous avons donc décidé de développer cette approche pour les récepteurs V_{1B}.

Des résultats antérieurs publiés pour le récepteur V_{1B} humain (Corbani et al., 2011) montrent qu'il est possible de fixer des fluorophores de type Alexa sur la lysine en position 8 de la d[Leu⁴,Lys⁸]VP, le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1B} (Pena et al., 2007). Ces molécules, bien que moins affines pour le récepteur V_{1B} humain, restent cependant sélectives et permettent un marquage des récepteurs exprimés à la surface de cellules CHO transfectées de façon stable avec l'ADNc du récepteur V_{1B} humain.

L'objectif du travail présenté ici a consisté à :

- Valider pharmacologiquement ces différents ligands fluorescents V_{1B} pour la famille des récepteurs VP/OT de rat. Les données antérieurement publiées ne concernent en effet que les récepteurs humains et l'existence de variabilités pharmacologiques inter-espèces ne sont que trop bien connues (Manning et al., 2012).
- Vérifier que ces outils sont capables de révéler la présence de récepteurs V_{1B} au niveau de tissus connus pour exprimer naturellement ce récepteur (hypophyse) et au niveau de structures cérébrales supposées exprimer cette isoforme du récepteur de la vasopressine.

Pour réaliser ce programme, parmi les ligands fluorescents dérivés de la d[Leu⁴,Lys⁸]VP décrits récemment (Corbani et al., 2011), nous avons sélectionné les trois analogues les plus prometteurs, connus pour marquer les récepteurs V_{1B} humains, la d[Leu⁴,Lys(Alexa488)⁸]VP, la d[Leu⁴,Lys(Alexa647)⁸]VP et la d[Leu⁴,Lys(Aud-Alexa647)⁸]VP (cf Annexes A figure S1). Ils seront nommés par la suite, pour plus de simplicité : Analogue 2, Analogue 3 et Analogue 9 respectivement, reprenant ainsi la nomenclature de l'article où ils ont été décrits la première fois (Corbani et al., 2011)

to you. There will also be some delays to online publishing between 25 to 28 September

Wiley Online Library for the inconvenience and appreciate your patience. Thank you for using Wiley Online Library!

ADVANCED SEARCH over 6 million articles

Show messages

Journals | Books | Databases | Lab Protocols

All
 Authors
 Keywords
 References
 Funding Agencies

RESEARCH PAPER

Pharmacological characterization of FE 201874, the first selective high affinity rat V_{1A} vasopressin receptor agonist

1. Rafik Marir^{1,2,3,4},
2. Anne Virsolvy⁵,
3. Kazimierz Wisniewski⁶,
4. Julie Mion^{1,2,3},
5. Dominique Haddou^{1,2,3},
6. Evelyne Galibert^{1,2,3},
7. Zahia Meraihi⁴,
8. Michel G Desarménien^{1,2,3},
9. Gilles Guillon^{1,2,3,*}

Article first published online: 27 AUG 2013

DOI: 10.1111/bph.12249

© 2013 The British Pharmacological Society

Issue



British Journal of Pharmacology

Volume 170, Issue 2, ([/doi/10.1111/bph.2013.170.issue-2/issuetoc](https://doi.org/10.1111/bph.2013.170.issue-2/issuetoc)) pages 278–292, September 2013

Additional Information

How to Cite

Marir, R., Virsory, A., Wisniewski, R., Marir, R., Haddou, D., Gaubert, E., Meram, Z., Desarménien, M. C. and Guillon, C. (2013) Pharmacological characterization of FE 201874, the first selective high affinity rat V_{1A} vasopressin receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*, 170: 278–292. doi: 10.1111/bph.12249

[Show messages](#)

Author Information

- 1 CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France
- 2 INSERM, U661, Montpellier, France
- 3 Universités de Montpellier 1 & 2, UMR-5203, Montpellier, France
- 4 Université Constantine 1, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, Algérie
- 5 INSERM U1046, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, Montpellier, France
- 6 Ferring Research Institute Inc, San Diego, CA, USA

* Correspondence

Dr Gilles Guillon, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 05, France. E-mail: gilles.guillon@igf.cnrs.fr (<mailto:gilles.guillon@igf.cnrs.fr>)

R. Marir was supported by the Averoes program.

Publication History

1. Issue published online: 27 AUG 2013
2. Article first published online: 27 AUG 2013
3. Accepted manuscript online: 31 MAY 2013 07:37AM EST
4. Manuscript Accepted: 20 MAY 2013
5. Manuscript Revised: 3 MAY 2013
6. Manuscript Received: 18 DEC 2012

Funded by

- CNRS
- INSERM
- Averoes program
- Agence Nationale de la Recherche. Grant Number: ANR-09-MNPS-031-01
- [Abstract](#)
- [Article \(/doi/10.1111/bph.12249/full\)](#)
- [References \(/doi/10.1111/bph.12249/references\)](#)
- [Supporting Information \(/doi/10.1111/bph.12249/supinfo\)](#)
- [Cited By \(/doi/10.1111/bph.12249/citedby\)](#)

[View Full Article with Supporting Information \(HTML\) \(/doi/10.1111/bph.12249/full\)](#) [Get PDF \(1085K\) \(/doi/10.1111/bph.12249/pdf\)](#)

Keywords:

FE 201874; Vasopressin agonist; V_{1A} receptor; glomerulosa cell proliferation; aorta contrac

to you. There will also be some delays to online publishing between 25 to 28 September 2013. We apologize for the inconvenience and appreciate your patience. Thank you for using Wiley Online Library!

Background and Purpose

Distinct vasopressin receptors are involved in different physiological and behavioural functions. [Show messages](#)

Presently, no selective agonist is available to specifically elucidate the functional roles of the V_{1A} receptor in the rat, one of the most widely used animal models. FE 201874 is a new derivative of the human selective V_{1A} receptor agonist F180. In this study, we performed a multi-approach pharmacological and functional characterization of FE 201874 to determine whether it is selective for V_{1A} receptors.

Experimental Approach

We modified an available human selective V_{1A} receptor agonist (F180) and determined its pharmacological properties in cell lines expressing vasopressin/oxytocin receptors (affinity and coupling to second messenger cascades), in an *ex vivo* model (aorta ring contraction) and *in vivo* in rats (proliferation of adrenal cortex glomerulosa cells and lactation).

Key Results

FE 201874 exhibited nanomolar affinity for the rat V_{1A} receptor; it was highly selective towards the rat V_{1B} and V_2 vasopressin receptors and behaved as a full V_{1A} agonist in all the pharmacological tests performed. FE 201874 bound to the oxytocin receptor, but with moderate affinity, and behaved as an oxytocin antagonist *in vitro*, but not *in vivo*.

Conclusions and Implications

On functional grounds, all the data demonstrate that FE 201874 is the first selective agonist of the rat V_{1A} receptor isoform available. Hence, FE 201874 may have potential as a treatment for the vasodilator-induced hypotension occurring in conditions such as septic shock and could be the most suitable compound for discriminating between the behavioural effects of arginine vasopressin and oxytocin.

[View Full Article with Supporting Information \(HTML\) \(/doi/10.1111/bph.12249/full\)](#) [Get PDF \(1085K\) \(/doi/10.1111/bph.12249/pdf\)](#)

More content like this

Find more content:

- [like this article \(/advanced/search/results?articleDoi=10.1111/bph.12249&scope=allContent&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

Find more content written by:

- [Rafik Marir \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Rafik Marir"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)
- [Anne Virsolvy \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Anne](#)

to you. There will also be some delays to online publishing between 25 to 28 September 2013. We apologize for the inconvenience and appreciate your patience. Thank you for

using Wiley Online Library!

[Results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Kazimierz](#)

[Wisniewski"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

Show messages

• [Julie Mion \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Julie](#)

[Mion"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [Dominique Haddou \(/advanced/search](#)

[/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Dominique](#)

[Haddou"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [Evelyne Galibert \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Evelyne](#)

[Galibert"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [Zahia Meraihi \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Zahia](#)

[Meraihi"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [Michel G Desarménien \(/advanced/search](#)

[/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Michel G Desarm](#)

[%C3%A9nien"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [Gilles Guillon \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Gilles](#)

[Guillon"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

• [All Authors \(/advanced/search/results?searchRowCriteria\[0\].queryString="Rafik Marir"](#)

["Anne Virsolvy" "Kazimierz Wisniewski" "Julie Mion" "Dominique Haddou" "Evelyne](#)

[Galibert" "Zahia Meraihi" "Michel G Desarm%C3%A9nien" "Gilles](#)

[Guillon"&searchRowCriteria\[0\].fieldName=author&start=1&resultsPerPage=20\)](#)

3. Discussion

Nous avons caractérisé au cours de cette étude plusieurs ligands fluorescents capables de marquer de façon spécifique les récepteurs V_{1B} permettant ainsi leur localisation tissulaire sur des coupes de tissus natifs. Plusieurs aspects de ce travail méritent une attention particulière.

Tout d'abord, grâce à cette étude réalisée sur des récepteurs de rat et celle réalisée antérieurement avec les mêmes molécules sur des récepteurs VP/OT humains (Corbani et al., 2011), il est possible de mieux comprendre les conséquences d'un greffage de fluorophore sur les propriétés pharmacologiques des ligands étudiés. Ainsi, pour les récepteurs de rat ou d'origine humaine, l'ajout d'un fluorophore sur la Lys^8 de la $d[Leu^4,Lys^8]VP$ induit une baisse de l'affinité des molécules ainsi produite vis à vis du récepteur V_{1B} . Cet effet est d'autant plus prononcé que la taille du fluorophore est grande : l'Alexa 647 d'un poids moléculaire d'environ 1250 Da perturbe beaucoup plus la liaison au récepteur V_{1B} que l'Alexa 488 d'un poids moléculaire de 643 Da, comparé à la liaison du peptide sans fluorophore (Table 7). De même, le rajout d'un espaceur, entre le ligand et le fluorophore (le 11-aminoundécanoate de l'analogue 9), réduit cette perte d'affinité (l'effet étant lié à la taille de l'espaceur (Corbani et al., 2011)). L'ensemble de ces données montrent que, bien que la Lys^8 du ligand V_{1B} utilisée pour synthétiser nos peptide fluorescents soit en dehors de la poche de liaison du récepteur (Rodrigo et al., 2007), l'ajout d'une molécule de poids moléculaire voisin de celui du peptide perturbe beaucoup son affinité. Si l'on s'intéresse maintenant au côté sélectivité, nous observons que l'ajout d'un fluorophore, quel qu'il soit avec ou sans espaceur, contribue à réduire la sélectivité OT/V_{1B} et V_{1A}/V_{1B} (Table 7). La sélectivité V_2/V_{1B} quant à elle, fluctue selon le fluorophore ajouté, mais elle reste globalement bonne. Ces expériences indiquent clairement qu'il faut systématiquement vérifier l'affinité d'un peptide une fois qu'on lui a greffé un fluorophore.

Concernant l'affinité des ligands étudiés, la spécificité inter-espèce des ligands vis à vis des récepteurs de la famille VP/OT reste aussi un sujet d'actualité. Quel que soit le fluorophore ajouté on n'observe pas de différence inter-espèce prononcée (Table 7, Figure 36 et Corbani et al., 2011). Cependant en ce qui concerne les analogues 2, 9 et A ($d[Leu^4,Lys^8]VP$), leurs sélectivités V_{1A}/V_{1B} est plus marquées pour les récepteurs de rat comparés à ceux d'origine humaine. A l'inverse, la sélectivité V_2/V_{1B} est nettement plus importante pour les récepteurs humains. La sélectivité OT/V_{1B} quant à elle fluctue selon l'analogue considéré. L'ensemble de ces données démontre, une fois de plus, qu'il faut valider chaque ligand à la fois en termes

d'affinité et de sélectivité sur la famille de récepteur étudiée. Il n'est pas possible de généraliser les données obtenues sur une espèce à une autre (Manning et al., 2012).

Hormis les propriétés pharmacologiques classiques, nous nous sommes aussi intéressés aux propriétés physiques des fluorophores. Les rendements quantiques très élevés des Alexa 647 et 488 permettent d'obtenir des ligands à forte brillance, capables de détecter de faibles niveaux de récepteur. Ainsi comme nous le montrons dans cette étude, il est possible de détecter la présence de récepteur V_{1B} au niveau de l'hippocampe de rat, bien que le niveau d'expression soit très faible (inférieure à quelques femtomoles de $d[\text{Leu}^4, \text{Lys}^8]\text{VP}-[{}^3\text{H}]$ fixée spécifiquement par mg de protéine membranaire (G. Guillon, données non publiées).

Le choix du fluorophore est lui aussi déterminant. Ainsi l'utilisation d'une Alexa 488, par exemple, émet à 509 nm. Un filtre à bande passante entre 505-530 nm permettra de récolter ce signal émis mais laissera passer également beaucoup d'autofluorescence tissulaire naturelle. De ce fait si ce marquage est net, un bruit de fond non négligeable est observé sur coupe de tissus, rendant ainsi l'analyse de faibles quantités de récepteurs exprimés assez difficile. A l'inverse, l'Alexa 647 émet à une longueur d'onde de 668 nm (proche de l'infrarouge). De ce fait, aucune autofluorescence tissulaire naturelle ne peut être détectée à cette longueur d'onde, préservant les images obtenues de toute autofluorescence (cf Annexes A figure S2). Ce dernier fluorophore sera donc privilégié pour l'étude de la cartographie des récepteurs V_{1B} centraux. Les expériences de marquages réalisées au niveau des cultures cellulaires hétérologues ont été effectuées de ce fait avec les analogues 3 et 9. Ces deux analogues se sont avérés être de bons outils pour réaliser des études de localisation des récepteurs centraux. L'analogue 9 pourrait être privilégié pour ces études car il possède une meilleure sélectivité OT/ V_{1B} . Cependant, nous avons noté que celui-ci présentait une brillance légèrement réduite en comparaison avec l'analogue 3. Cette différence pourrait être liée à la position du fluorophore dans le récepteur, éloigné de celui-ci par l'espaceur, la constante diélectrique du milieu proche du fluorophore, peut varier et affecter sa brillance. Ceci nous a poussé à privilégier l'analogue 3 dans la suite de l'étude. Sa sélectivité OT/ V_{1B} plus faible ne représente cependant pas un problème particulier puisque l'utilisation de cet analogue est toujours réalisé en présence d'un excès d'antagoniste OT sélectif (SR126768A) pour être sûr de ne marquer que les récepteurs V_{1B} .

Il nous reste maintenant avec ces outils à continuer l'exploration des diverses zones du cerveau susceptibles d'exprimer le récepteur V_{1B} . D'ores et déjà les données obtenues sont cohérentes avec certaines études de localisation des récepteurs V_{1B} par RT-PCR (Lolait et al., 1995; Saito et al., 1995) ou hybridation *in situ* (Lolait et al., 1995; Hurbin et al., 1998, 2002;

Vaccari et al., 1998; Young et al., 2006). Bien que les données obtenues par immunochimie par Hernando et al (2001) n'aient jamais pu être reproduites car aucun anticorps réellement sélectif du récepteur V_{1B} n'a pu être de nouveau produit, notre étude montre une bonne coïncidence avec ces résultats. Ceci n'est pas toujours le cas si l'on compare nos résultats avec ceux obtenus par hybridation *in situ*, confirmant que le pool d'ARN messagers et la quantité de protéine réceptrice exprimée ne sont pas toujours parallèles. Ceci est d'autant plus vrai que l'on sait que l'expression du récepteur V_{1B} est soumise à des régulations à la fois transcriptionnelle et traductionnelle grâce à l'existence d'une séquence ouverte de lecture (ORF) codant pour un peptide régulateur de l'activité traductionnelle ribosomale du récepteur (Rabadan-Diehl et al., 2007). Enfin, un avantage de notre technique est qu'elle permet l'acquisition de détails particulièrement intéressants sur la morphologie ou le type de cellules marquées si on utilise en plus un co-marquage immunocytochimique avec des déterminants supplémentaires (marquage astrocytaires et neuronaux permettant d'établir le type de neurone porteur des récepteurs V_{1B}). C'est ce qui nous a permis de vérifier que les cellules marquées de la région CA2 de l'hippocampe étaient bien des neurones (pas de marquage V_{1B} sur les astrocytes détectés par l'anticorps anti-GFAP et noyaux positifs à un anticorps anti-NeuN) et de nature glutamatergique (positives à l'anticorps CaMK2) (résultats non illustrés, article en préparation).

Un des autres avantages associé à ces deux molécules réside dans leurs caractère agoniste complet pour le récepteur V_{1B} et agoniste partiel pour le récepteur OT. Cette différence de propriété renforce quelque peu la sélectivité des analogues fluorescents surtout si l'on utilise la molécule 9 pour une approche fonctionnelle. Comme nous le montrons dans cette étude, l'ajout de l'analogue 3 sur une coupe de cerveau de rat permet à la fois le marquage des cellules exprimant le V_{1B} et la révélation des cellules dont l'activité MAP kinases est stimulée. La concordance entre les 2 marqueurs est très bonne. Ce contrôle ouvre de nouvelles pistes pour réaliser la localisation des récepteurs V_{1B} dans le cerveau : la cartographie fonctionnelle basée sur l'activation spécifique par des ligands V_{1B} des MAP kinases. Cette technique a d'ailleurs déjà été utilisée par d'autres équipes au niveau cérébral pour déterminer le site d'action de la corticolibérine (Refojo et al., 2005) mais aussi de l'ocytocine (Guzmán et al., 2013). Il est aussi possible de valider ce contrôle par des techniques électrophysiologiques. Dans notre équipe, M. Chafai a pu montrer que des neurones hippocampiques de la région CA2 marqué avec un ligand V_{1B} était capable de moduler son activité électrique (Chafai et al., 2012).

Cependant, il ne serait pas raisonnable d'utiliser cette technique pour réaliser la cartographie fonctionnelle des récepteurs V_{1B} dans le cerveau, l'approche fonctionnelle d'activation des MAP kinases étant plus adaptée.

Le fait que l'analogue 3 possède une affinité pour le récepteur OT similaire à celle du récepteur V_{1B} , suggère qu'il pourrait aussi être employé comme marqueur des cellules exprimant cette isoforme. Bien entendu, cette approche ne peut être réalisée que si l'on combine pour le marquage, l'analogue 3 et une molécule sélective du récepteur V_{1B} bloquant toute interaction possible du fluorophore sur ce récepteur, permettant ainsi, un marquage sélectif du récepteur OT. Cette approche est en cours de développement au laboratoire mais s'avère très délicate. Nous envisageons donc plutôt d'essayer de développer une sonde spécifique OT marquée avec un fluorophore différent de l'Alexa 647 pour pouvoir tenter d'obtenir, sur une même coupe de tissu, le marquage sélectif V_{1B} et OT à la fois.

Globalement, le développement de ces nouveaux outils pharmacologiques devrait permettre aux physiologistes comportementalistes notamment, de mieux comprendre où et comment la vasopressine agit pour réguler le comportement.

Discussions générales et perspectives

L'objectif de cette thèse a consisté principalement à caractériser de nouveaux ligands sélectifs pour l'étude des récepteurs V_{1A} et V_{1B} , tous deux impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions globales visant à assurer l'homéostasie de l'individu mais aussi dans de nombreux processus cognitifs et comportementaux (voir pour revue (Koshimizu et al., 2012).

La recherche de nouveaux analogues sélectifs des récepteurs VP/OT :
Une chance pour mieux étudier leurs rôles centraux de façon spécifique

Ce travail de thèse a permis de réduire, ne serait-ce qu'en partie, le manque d'outils pharmacologique disponibles pour l'étude des récepteurs de la vasopressine chez le rat. Du point de vue pharmacologique, la caractérisation du premier agoniste du récepteur V_{1A} sélectif *in vivo* représente une grande avancée.

La méthode de choix pour valider l'implication d'un récepteur V_{1A} dans une fonction donnée consistait antérieurement à utiliser des antagonistes sélectifs. Le composé Manning « Manning Compound » par exemple, a été utilisé dans de nombreux tests cognitifs et/ou comportementaux (Engelmann et al., 1992; Caruso et al., 1993). Cependant il s'est avéré plus tard que ce composé bloquait aussi les réponses à l'ocytocine (Manning et al., 2008). Plus récemment l'emploi du SR49059, très sélectif de l'isoforme V_{1A} chez le rat et l'homme a permis de tirer des conclusions moins ambiguës. Cependant, en plus d'être non sélectif chez la souris, celui-ci est un antagoniste non peptidique peu soluble et d'emploi plus délicat qu'un peptide. De nombreuses études comportementales ont également été réalisées avec l'Atosiban (antagoniste OT et V_{1A}) (Matthews et al., 2005; Mak et al., 2012) qui n'ont pas permis de conclure de façon simple et définitive à l'implication d'une isoforme de récepteur VP/OT dans une fonction donnée.

La caractérisation pharmacologique du FE 201874 complète avantageusement la panoplie d'outils pharmacologiques disponibles pour l'étude des récepteurs V_{1A} avec ce premier agoniste sélectif chez le rat (Figure 43). D'un usage plus simple qu'un antagoniste et présentant une bonne sélectivité autant *in vitro* qu'*in vivo*, il devrait s'imposer rapidement pour toutes les études comportementales visant à déterminer la nature des récepteurs de la vasopressine impliqués. En effet, ce composé ayant une affinité non négligeable pour le récepteur OT, son caractère agoniste V_{1A} et antagoniste OT lui confère une sélectivité complète V_{1A} pour toute approche fonctionnelle.

Puisque les récepteurs V_{1A} et V_{1B} d'une part, et OT d'autre part, en plus d'être souvent exprimés dans les mêmes tissus et/ou même cellules, ont souvent des effets opposés sur de nombreuses fonctions cognitives ou comportementales (Legros, 2001; Neumann and Landgraf, 2012), il est nécessaire d'utiliser des molécules sélectives de chaque sous-type. Cette exigence est fondamentale notamment si l'on veut aborder ensuite un aspect plus thérapeutique conduisant à réguler l'action de certains récepteurs via des antagonistes très sélectifs pour traiter certaines pathologies.

D'un point de vue thérapeutique, le FE 201874 agissant comme agoniste du récepteur V_{1A} présente un potentiel thérapeutique envisageable, principalement dans le traitement des hypotensions vasculaires tel que le choc septique. De plus, le FE 201874 peut être administré à l'animal vigile. Sa nature peptidique est un avantage : le FE 201874 se dissout facilement dans l'eau et peut donc être utilisé *in vivo*. Par exemple, il serait intéressant d'injecter le FE 201874 au niveau central et d'évaluer les modifications comportementales générées.












Agonistes sélectifs	Sous-type de récepteur	Antagonistes sélectifs
Andrés et al, 2002 F-180	  	 SR49059 $d(CH_2)_5[D-Ile^2, Ile^4, Tyr^9-NH_2]AVP$
Marir et al, 2013 FE 201874	 	 SR49049 $d(CH_2)_5[Tyr(Me)^2]AVP$
Busnelli et al, 2013 A tester		Aucun antagoniste sélectif
 Humain	 Rat	 Souris

Figure 43 : Ligands hautement sélectifs pour le récepteur V_{1A} (modifiée à partir de (Chini et al., 2008b))

Ne sont répertoriés dans ce tableau que les ligands : 1) ayant été testés sur l'ensemble des sous-types de récepteur AVP/OT présents pour une seule espèce ; b) possédant une affinité nanomolaire pour le récepteur d'intérêt ; présentant une constante d'affinité au moins 100 fois plus importante pour le récepteur d'intérêt par rapport aux trois autres isoformes.

Globalement pour compléter cette panoplie, il reste encore à trouver un agoniste sélectif pour les récepteurs V_2 humains, la desmopressine (dDAVP) présentant un profil d'agoniste V_{1B}/V_2 chez l'homme. De même le SR149415 décrit comme V_{1B} sélectif chez toutes les espèces étudiées s'avère être un antagoniste V_{1B}/OT , son emploi est donc maintenant controversé (Griffante et al., 2005; Manning et al., 2012).

Le SR49059, le seul antagoniste sélectif du récepteur V_{1A} humain et de rat ne l'est pas pour la souris. Un antagoniste V_{1A} pour cette espèce très utilisé pour les études comportementales est donc à rechercher (Busnelli et al., 2013)

Le développement d'analogues fluorescents et la cartographie des récepteurs VP/OT centraux :

Quel récepteur pour quelles fonctions comportementales ?

En raison de l'arrivée dans les laboratoires de la microscopie confocale mono- puis bi-photonique et de la conception de nombreux fluorophores, ces dernières années ont connu un grand développement d'analogues hormonaux sélectifs fluorescents. Ainsi, les premiers analogues fluorescents de la vasopressine ont été conçus avec des fluorophores tels que la fluorescéine qui possède une fluorescence assez faible et surtout qui est extrêmement sensible au photo-blanchiment. Elle s'est montrée finalement incapable de révéler de faibles quantités de récepteurs (Guillon et al., 1992; Tran et al., 1999). De plus, ces analogues ne présentaient pas de sélectivité d'isoforme parfaite (Terrillon et al., 2002).

Le développement des Alexa a permis de lever certaines limites concernant le niveau de détection de récepteur exprimé à faible niveau. Ainsi, comme nous le montrons dans la seconde partie de nos résultats, les dérivés de la $d[\text{Leu}^4, \text{Lys}^8]\text{VP}$, auxquels l'Alexa 647 a été fixé, permettent d'obtenir une bonne localisation subcellulaire de récepteurs exprimés probablement en très faible quantité dans certaines zones du cerveau. Cette molécule associée à l'utilisation du microscope confocal à champ large nous a permis de réaliser la première cartographie des récepteurs V_{1B} dans le cerveau.

Ces outils seront également très appréciés pour mesurer l'influence du stress sur leur localisation et/ou leur densité ce qui constitue le principal sujet d'intérêt de notre équipe. En effet, la cartographie des sites V_{1B} extrahypophysaires impliqués dans les mécanismes de stress et d'anxiété représente un enjeu majeur dans l'étude de ces processus, principalement dans les états de stress chronique. Des lignées de rats « Roman High- (RHA) et Low- (RLA) Avoidance » connus pour présenter des profils émotionnels différents ont été au centre de plusieurs études liées au stress, à l'anxiété et la dépression (Steimer and Driscoll, 2003). Effectuer une étude de cartographie générale et spécifique comparative des profils d'expression des récepteurs V_{1B} chez ces rats permettrait d'étudier les modulations possibles durant ces perturbations du comportement lié au stress.

L'association de sonde fluorescente à forte brillance, telle que l'Alexa 647, à des ligands sélectif des différents récepteurs de la famille VP/OT permet, comme nous l'avons montré pour le récepteur V_{1B} , la détection de récepteur même exprimé à bas niveau. Cette stratégie permettra peut être de révéler de nouvelles cibles tissulaire exprimant les récepteurs V_{1A} et OT cependant déjà bien étudiés grâce aux ligand sélectifs iodés disponibles. En tout cas, la précision du marquage obtenu permettra une localisation subcellulaire de ces isoformes ce qui n'est pas possible actuellement.

Le FE 201874 possédant une ornithine en position 8, possède un NH_2 latéral libre capable d'être utilisé pour greffer une Alexa par exemple. L'ajout d'un radical fluorescent sur le FE 201874 peut permettre de générer un peptide fluorescent utilisable pour localiser les récepteurs V_{1A} . Il est probable que cette modification affecte la spécificité et/ou la sélectivité de ce FE 201874 fluorescent, seul sa caractérisation pharmacologique nous le confirmera. La synthèse d'un tel ligand est en cours de réalisation dans le laboratoire du Dr Csaba Tomboly.

De même, un ligand fluorescent spécifique au récepteur OT serait d'une grande importance. Le fait que l'analogue 3 possède une affinité pour le récepteur OT similaire à celle du récepteur V_{1B} , suggère qu'il pourrait aussi être employé comme marqueur des cellules exprimant cette isoforme. Bien entendu, cette approche ne peut être réalisé que si l'on combine pour le marquage, l'analogue 3 et une molécule sélective du récepteur V_{1B} bloquant toute interaction possible du fluorophore sur ce récepteur, permettant ainsi, un marquage sélectif du récepteur OT. Cette approche en cours de développement dans notre équipe s'avère très délicate. Il est donc plus envisageable d'essayer de développer de nouvelles sonde spécifique OT marquée avec un fluorophore de type Alexa, là encore de nouvelles molécules sont en cours de caractérisation au laboratoire.

L'ensemble de ces 3 composés fluorescents dirigés contre les trois récepteurs centraux de la famille VP/OT (V_{1A} , V_{1B} et OT), avec des fluorophores distincts, permettrons dans un avenir proche de les imager au niveau central et sur une seule et même coupe.

Au niveau périphérique, l'obtention d'une sonde fluorescente spécifique du récepteur V_2 pourrait aussi permettre la localisation tissulaire du récepteur V_2 extra rénal supposé être exprimé au niveau de l'endothélium de certaines vaisseaux sanguins responsable d'un effet vasodilatateur mal étudié bien que physiologiquement important (Kaufmann et al., 2003). Cela permettrait aussi de localiser les récepteurs V_2 responsables de la synthèse facteur

VIII impliqués dans la coagulation sanguine et expliquant le rôle de la dDAVP dans le traitement de certaines formes d'hémophilie et du syndrome de Von Villebrand (Vilhardt et al., 1993). Enfin la présence de récepteurs V_{1B} au niveau du tractus gastrointestinal impliqué dans les phénomènes d'inflammation colique (syndrome de Crohn) à été aussi suggéré (Ferrier et al., 2010). Cependant sa localisation reste à préciser avec des outils plus fiables que ceux utilisés.

Ces nouvelles molécules fluorescentes capables de marquer sélectivement les différents récepteurs de l'AVP et de l'OT constituent donc des outils de choix pour les physiologistes et les endocrinologistes pour comprendre des actions encore méconnues de ces 2 hormones.

Références bibliographiques

- Abu-Basha, E.A., Yibchok-Anun, S., and Hsu, W.H. (2002). Glucose dependency of arginine vasopressin-induced insulin and glucagon release from the perfused rat pancreas. *Metab. Clin. Exp.* *51*: 1184–1190.
- Acher, R., and Chauvet, J. (1953). [The structure of bovine vasopressin]. *Biochim. Biophys. Acta* *12*: 487–488.
- ACHER, R., and CHAUVET, J. (1953). [The structure of bovine vasopressin]. *Biochim. Biophys. Acta* *12*: 487–488.
- Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* *15*: 321–350.
- Aguilera, G. (1998). Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol. Metab.* *9*: 329–336.
- Aguilera, G., Harwood, J.P., Wilson, J.X., Morell, J., Brown, J.H., and Catt, K.J. (1983). Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* *258*: 8039–8045.
- Aguilera, G., and Rabadan-Diehl, C. (2000). Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul. Pept.* *96*: 23–29.
- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., and Chen, J. (2008). The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog. Brain Res.* *170*: 29–39.
- Albers, H.E., Dean, A., Karom, M.C., Smith, D., and Huhman, K.L. (2006). Role of V1a vasopressin receptors in the control of aggression in Syrian hamsters. *Brain Res.* *1073-1074*: 425–430.
- Albizu, L., Teppaz, G., Seyer, R., Bazin, H., Ansanay, H., Manning, M., et al. (2007). Toward efficient drug screening by homogeneous assays based on the development of new fluorescent vasopressin and oxytocin receptor ligands. *J. Med. Chem.* *50*: 4976–4985.
- Alexander, S.L., Roud, H.K., and Irvine, C.H. (1997). Effect of insulin-induced hypoglycaemia on secretion patterns and rates of corticotrophin-releasing hormone, arginine vasopressin and adrenocorticotrophin in horses. *J. Endocrinol.* *153*: 401–409.
- Alonso, G. (2009). [Vasopressin and angiogenesis]. *J. Soc. Biol.* *203*: 39–47.
- Alonso, G., Galibert, E., Boulay, V., Guillou, A., Jean, A., Compan, V., et al. (2009). Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors. *Endocrinology* *150*: 239–250.
- Altemus, M., Cizza, G., and Gold, P.W. (1992). Chronic fluoxetine treatment reduces hypothalamic vasopressin secretion in vitro. *Brain Res.* *593*: 311–313.
- Amico, J.A., Finn, F.M., and Haldar, J. (1988). Oxytocin and vasopressin are present in human and rat pancreas. *Am. J. Med. Sci.* *296*: 303–307.
- Ando, Y., Tabei, K., and Asano, Y. (1991). Luminal vasopressin modulates transport in the rabbit cortical collecting duct. *J. Clin. Invest.* *88*: 952–959.

- Andrés, M., Peña, A., Derick, S., Raufaste, D., Trojnar, J., Wisniewski, K., et al. (2004). Comparative pharmacology of bovine, human and rat vasopressin receptor isoforms. *Eur. J. Pharmacol.* *501*: 59–69.
- Antoni, F.A. (1993). Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* *14*: 76–122.
- Antoni, F.A., Holmes, M.C., and Jones, M.T. (1983). Oxytocin as well as vasopressin potentiate ovine CRF in vitro. *Peptides* *4*: 411–415.
- Aoyagi, T., Kusakawa, S., Sanbe, A., Hiroyama, M., Fujiwara, Y., Yamauchi, J., et al. (2009). Enhanced effect of neuropeptide Y on food intake caused by blockade of the V(1A) vasopressin receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *622*: 32–36.
- Arban, R. (2007). V1b receptors: new probes for therapy. *Endocrinology* *148*: 4133–4135.
- Argiolas, A., and Melis, M.R. (2004). The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals. *Physiol. Behav.* *83*: 309–317.
- Augustin, S., González, A., and Genescà, J. (2010). Acute esophageal variceal bleeding: Current strategies and new perspectives. *World J Hepatol* *2*: 261–274.
- Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., et al. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*: 11406–11411.
- Baertschi, A.J., and Friedli, M. (1985). A novel type of vasopressin receptor on anterior pituitary corticotrophs? *Endocrinology* *116*: 499–502.
- Baertschi, A.J., Vallet, P., Baumann, J.B., and Girard, J. (1980). Neural lobe of pituitary modulates corticotropin release in the rat. *Endocrinology* *106*: 878–882.
- Bai, Y., Zhang, S., Kim, K.S., Lee, J.K., and Kim, K.H. (1996). Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J. Biol. Chem.* *271*: 13939–13942.
- Baldwin, J.M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* *12*: 1693–1703.
- Ballesteros, J.A., Shi, L., and Javitch, J.A. (2001). Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol. Pharmacol.* *60*: 1–19.
- Bankir, L., Fernandes, S., Bardoux, P., Bouby, N., and Bichet, D.G. (2005). Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*: 1920–1928.
- Barberis, C., Audigier, S., Durroux, T., Elands, J., Schmidt, A., and Jard, S. (1992). Pharmacology of oxytocin and vasopressin receptors in the central and peripheral nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *652*: 39–45.
- Barberis, C., and Tribollet, E. (1996). Vasopressin and oxytocin receptors in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* *10*: 119–154.

- Berde, B., Boissonnas, R.A., Huguenin, R.L., and Stürmer, E. (1964). Vasopressin analogues with selective pressor activity. *Experientia* 20: 42–43.
- BERGEN, S.S., Jr, SULLIVAN, R., HILTON, J.G., WILLIS, S.W., Jr, and ITALLIE, T.B. VAN (1960). Glycogenolytic effect of vasopressin in the canine liver. *Am. J. Physiol.* 199: 136–138.
- Berkenbosch, F., Goeij, D.C. De, and Tilders, F.J. (1989). Hypoglycemia enhances turnover of corticotropin-releasing factor and of vasopressin in the zona externa of the rat median eminence. *Endocrinology* 125: 28–34.
- Berlier, J.E., Rothe, A., Buller, G., Bradford, J., Gray, D.R., Filanoski, B.J., et al. (2003). Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 1699–1712.
- Bernadich, C., Bandi, J.C., Melin, P., and Bosch, J. (1998). Effects of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide, compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in a rat model of portal hypertension. *Hepatology* 27: 351–356.
- Bernier, V., Lagacé, M., Lonergan, M., Arthus, M.-F., Bichet, D.G., and Bouvier, M. (2004). Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol. Endocrinol.* 18: 2074–2084.
- Bernier, V., Morello, J.-P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., et al. (2006). Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 232–243.
- Bhora, F.Y., Kothary, P.C., Imanishi, H., Eckhauser, F.E., and Raper, S.E. (1994). Vasopressin stimulates DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *J. Surg. Res.* 57: 706–710.
- Bichet, D.G. (1994). Molecular and cellular biology of vasopressin and oxytocin receptors and action in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 3: 46–53.
- Bichet, D.G. (2006). [Nephrogenic diabetes insipidus]. *Nephrol. Ther.* 2: 387–404.
- Bielsky, I.F., Hu, S.-B., Szegda, K.L., Westphal, H., and Young, L.J. (2004). Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29: 483–493.
- Birnbaumer, M. (2000). Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 406–410.
- Birnbaumer, M., Seibold, A., Gilbert, S., Ishido, M., Barberis, C., Antaramian, A., et al. (1992). Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357: 333–335.
- Birumachi, J., Hiroyama, M., Fujiwara, Y., Aoyagi, T., Sanbe, A., and Tanoue, A. (2007). Impaired arginine-vasopressin-induced aldosterone release from adrenal gland cells in mice lacking the vasopressin V1A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 566: 226–230.
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Farrokhi, C., Markham, C., Yang, M., and Blanchard, D.C. (2005). AVP V1b selective antagonist SSR149415 blocks aggressive behaviors in hamsters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80: 189–194.

- Bocckino, S.B., Blackmore, P.F., and Exton, J.H. (1985). Stimulation of 1,2-diacylglycerol accumulation in hepatocytes by vasopressin, epinephrine, and angiotensin II. *J. Biol. Chem.* *260*: 14201–14207.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* *18*: 1723–1729.
- Bohus, B., Kovács, G.L., and Wied, D. de (1978). Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Res.* *157*: 414–417.
- Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G.P., Bickel, U., and Fehm, H.L. (2002). Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat. Neurosci.* *5*: 514–516.
- Bosch, O.J., and Neumann, I.D. (2008). Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*: 17139–17144.
- Bosch, O.J., Pförtsch, J., Beiderbeck, D.I., Landgraf, R., and Neumann, I.D. (2010). Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J. Neuroendocrinol.* *22*: 420–429.
- Bourque, C.W., and Oliet, S.H. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* *59*: 601–619.
- Bourque, C.W., Voisin, D.L., and Chakfe, Y. (2002). Stretch-inactivated cation channels: cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic neurons. *Prog. Brain Res.* *139*: 85–94.
- Bree, F.M. de, Knight, D., Howell, L., and Murphy, D. (2000). Sorting of the vasopressin prohormone into the regulated secretory pathway. *FEBS Lett.* *475*: 175–180.
- Breton, C., Haenggeli, C., Barberis, C., Heitz, F., Bader, C.R., Bernheim, L., et al. (2002). Presence of functional oxytocin receptors in cultured human myoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*: 1415–1418.
- Breton, C., Scala-Guenot, D. Di, and Zingg, H.H. (2001). Oxytocin receptor gene expression in rat mammary gland: structural characterization and regulation. *J. Mol. Endocrinol.* *27*: 175–189.
- Brown, D., and Moos, F. (1997). Onset of bursting in oxytocin cells in suckled rats. *J. Physiol. (Lond.)* *503 (Pt 3)*: 625–634.
- Buckingham, J.C. (1981). The influence of vasopressin on hypothalamic corticotrophin releasing activity in rats with inherited diabetes insipidus. *J. Physiol. (Lond.)* *312*: 9–16.
- Buckingham, J.C. (1982). Effects of adrenocortical and gonadal steroids on the secretion in vitro of corticotrophin and its hypothalamic releasing factor. *J. Endocrinol.* *93*: 123–132.
- Burnier, M., Fricker, A.F., Hayoz, D., Nussberger, J., and Brunner, H.R. (1999). Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of YM087, a combined V1/V2 vasopressin receptor antagonist in normal subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *55*: 633–637.
- Busnelli, M., Bulgheroni, E., Manning, M., Kleinau, G., and Chini, B. (2013). Selective and potent agonists and antagonists for investigating the role of mouse oxytocin receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *346*: 318–327.

- Busnelli, M., Rimoldi, V., Viganò, P., Persani, L., Blasio, A.M. Di, and Chini, B. (2010). Oxytocin-induced cell growth proliferation in human myometrial cells and leiomyomas. *Fertil. Steril.* *94*: 1869–1874.
- Butta, N., Urcelay, E., González-Manchón, C., Parrilla, R., and Ayuso, M.S. (1993). Pertussis toxin inhibition of alpha 1-adrenergic or vasopressin-induced Ca²⁺ fluxes in rat liver. Selective inhibition of the alpha 1-adrenergic receptor-coupled metabolic activation. *J. Biol. Chem.* *268*: 6081–6089.
- Byron, K.L. (1996). Vasopressin stimulates Ca²⁺ spiking activity in A7r5 vascular smooth muscle cells via activation of phospholipase A2. *Circ. Res.* *78*: 813–820.
- Caldwell, H.K., and Albers, H.E. (2004). Effect of photoperiod on vasopressin-induced aggression in Syrian hamsters. *Horm Behav* *46*: 444–449.
- Caldwell, H.K., Lee, H.-J., Macbeth, A.H., and Young, W.S., 3rd (2008). Vasopressin: behavioral roles of an ‘original’ neuropeptide. *Prog. Neurobiol.* *84*: 1–24.
- Campling, B.G., Sarda, I.R., Baer, K.A., Pang, S.C., Baker, H.M., Lofters, W.S., et al. (1995). Secretion of atrial natriuretic peptide and vasopressin by small cell lung cancer. *Cancer* *75*: 2442–2451.
- Caruso, S., Agnello, C., Campo, M.G., and Nicoletti, F. (1993). Oxytocin reduces the activity of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured neurons. *J. Endocrinol. Invest.* *16*: 921–924.
- Chafai, M., Corbani, M., Guillon, G., and Desarménien, M.G. (2012). Vasopressin Inhibits LTP in the CA2 Mouse Hippocampal Area. *PLoS ONE* *7*: e49708.
- Charest, P.G., and Bouvier, M. (2003). Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* *278*: 41541–41551.
- Cheng, Y., and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* *22*: 3099–3108.
- Chevalyere, V., Dayanithi, G., Moos, F.C., and Desarmenien, M.G. (2000). Developmental regulation of a local positive autocontrol of supraoptic neurons. *J. Neurosci.* *20*: 5813–5819.
- Chini, B., Manning, M., and Guillon, G. (2008a). Affinity and efficacy of selective agonists and antagonists for vasopressin and oxytocin receptors: an ‘easy guide’ to receptor pharmacology. *Prog. Brain Res.* *170*: 513–517.
- Chini, B., Manning, M., and Guillon, G. (2008b). Affinity and efficacy of selective agonists and antagonists for vasopressin and oxytocin receptors: an ‘easy guide’ to receptor pharmacology. *Prog. Brain Res.* *170*: 513–517.
- Chini, B., Mouillac, B., Balestre, M.N., Trumpp-Kallmeyer, S., Hoflack, J., Hibert, M., et al. (1996). Two aromatic residues regulate the response of the human oxytocin receptor to the partial agonist arginine vasopressin. *FEBS Lett.* *397*: 201–206.
- Clark, G.A. (1928). The origin of the glucose in the hyperglycaemia induced by pituitrin. *J. Physiol. (Lond.)* *64*: 324–330.

- Cole, W.C., and Welsh, D.G. (2011). Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch. Biochem. Biophys.* *510*: 160–173.
- Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., and Janovick, J.A. (2007). G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol. Rev.* *59*: 225–250.
- Copland, J.A., Ives, K.L., Simmons, D.J., and Soloff, M.S. (1999). Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. *Endocrinology* *140*: 4371–4374.
- Corbani, M., Gonindard, C., and Meunier, J.-C. (2004). Ligand-regulated internalization of the opioid receptor-like 1: a confocal study. *Endocrinology* *145*: 2876–2885.
- Corbani, M., Trueba, M., Stoev, S., Murat, B., Mion, J., Boulay, V., et al. (2011). Design, synthesis, and pharmacological characterization of fluorescent peptides for imaging human V1b vasopressin or oxytocin receptors. *J. Med. Chem.* *54*: 2864–2877.
- Cotte, N., Balestre, M.N., Phalipou, S., Hibert, M., Manning, M., Barberis, C., et al. (1998). Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* *273*: 29462–29468.
- Dale, H.H. (1906). On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. (Lond.)* *34*: 163–206.
- Dantzer, R., Bluthé, R.M., Koob, G.F., and Moal, M. Le (1987). Modulation of social memory in male rats by neurohypophysial peptides. *Psychopharmacology (Berl.)* *91*: 363–368.
- Dempster, E.L., Burcescu, I., Wigg, K., Kiss, E., Baji, I., Gadoros, J., et al. (2007). Evidence of an association between the vasopressin V1b receptor gene (AVPR1B) and childhood-onset mood disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* *64*: 1189–1195.
- Derick, S., Cheng, L.L., Voirol, M.J., Stoev, S., Giacomini, M., Wo, N.C., et al. (2002). [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* *143*: 4655–4664.
- Derick, S., Pena, A., Durroux, T., Wagnon, J., Serradeil-Le Gal, C., Hibert, M., et al. (2004). Key amino acids located within the transmembrane domains 5 and 7 account for the pharmacological specificity of the human V1b vasopressin receptor. *Mol. Endocrinol.* *18*: 2777–2789.
- DeVito, L.M., Konigsberg, R., Lykken, C., Sauvage, M., Young, W.S., 3rd, and Eichenbaum, H. (2009). Vasopressin 1b receptor knock-out impairs memory for temporal order. *J. Neurosci.* *29*: 2676–2683.
- Devost, D., Wrzal, P., and Zingg, H.H. (2008). Oxytocin receptor signalling. *Prog. Brain Res.* *170*: 167–176.
- Dinan, T.G., Lavelle, E., Scott, L.V., Newell-Price, J., Medbak, S., and Grossman, A.B. (1999). Desmopressin normalizes the blunted adrenocorticotropin response to corticotropin-releasing hormone in melancholic depression: evidence of enhanced vasopressinergic responsivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*: 2238–2240.

- Drew, P.J., Monson, J.P., Metcalfe, H.K., Evans, S.J., Iles, R.A., and Cohen, R.D. (1985). The effect of arginine vasopressin on ureagenesis in isolated rat hepatocytes. *Clin. Sci.* 69: 231–233.
- Dunning, B.E., Moltz, J.H., and Fawcett, C.P. (1984). Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release. *Am. J. Physiol.* 246: E108–114.
- Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Oishi, R., and Fujiwara, M. (2009). New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: role of the vasopressin receptor in psychological and cognitive functions. *J. Pharmacol. Sci.* 109: 44–49.
- Egashira, N., Tanoue, A., Higashihara, F., Mishima, K., Fukue, Y., Takano, Y., et al. (2004). V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci. Lett.* 356: 195–198.
- Egashira, N., Tanoue, A., Matsuda, T., Koushi, E., Harada, S., Takano, Y., et al. (2007). Impaired social interaction and reduced anxiety-related behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Behav. Brain Res.* 178: 123–127.
- Elands, J., Barberis, C., and Jard, S. (1988). [3H]-[Thr4,Gly7]OT: a highly selective ligand for central and peripheral OT receptors. *Am. J. Physiol.* 254: E31–38.
- Elands, J., Resink, A., and Kloet, E.R. De (1990). Neurohypophyseal hormone receptors in the rat thymus, spleen, and lymphocytes. *Endocrinology* 126: 2703–2710.
- Engelmann, M., and Landgraf, R. (1994). Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiol. Behav.* 55: 145–149.
- Engelmann, M., Ludwig, M., and Landgraf, R. (1992). Microdialysis administration of vasopressin and vasopressin antagonists into the septum during pole-jumping behavior in rats. *Behav. Neural Biol.* 58: 51–57.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4: 1313–1317.
- Exton, J.H. (1988). Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. *Hepatology* 8: 152–166.
- Feifel, D., Mexal, S., Melendez, G., Liu, P.Y.T., Goldenberg, J.R., and Shilling, P.D. (2009). The brattleboro rat displays a natural deficit in social discrimination that is restored by clozapine and a neurotensin analog. *Neuropsychopharmacology* 34: 2011–2018.
- Ferrier, L., Serradeil-Le Gal, C., Schulte, A.M., Vasina, V., Gaultier, E., Schroedel, S., et al. (2010). Proinflammatory role of vasopressin through V1b receptors in hapten-induced experimental colitis in rodents: implication in IBD. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299: G1298–1307.
- Ferris, C.F., Lu, S.-F., Messenger, T., Guillon, C.D., Heindel, N., Miller, M., et al. (2006). Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83: 169–174.
- Ferris, C.F., Melloni, R.H., Jr, Koppel, G., Perry, K.W., Fuller, R.W., and Delville, Y. (1997). Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J. Neurosci.* 17: 4331–4340.

- Ferris, C.F., and Potegal, M. (1988). Vasopressin receptor blockade in the anterior hypothalamus suppresses aggression in hamsters. *Physiol. Behav.* *44*: 235–239.
- Fleischer, N., Zimmerman, G., Schindler, W., and Hutchins, M. (1972). Stimulation of adrenocorticotropin (ACTH) and growth hormone (GH) release by ouabain: relationship to calcium. *Endocrinology* *91*: 1436–1441.
- Foletta, V.C., Brown, F.D., and Young, W.S., 3rd (2002). Cloning of rat ARHGAP4/C1, a RhoGAP family member expressed in the nervous system that colocalizes with the Golgi complex and microtubules. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *107*: 65–79.
- Fong, C.T., Silver, L., Christman, D.R., and Schwartz, I.L. (1960). ON THE MECHANISM OF ACTION OF THE ANTIDIURETIC HORMONE (VASOPRESSIN). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *46*: 1273–1277.
- Foo, N.C., Carter, D., Murphy, D., and Ivell, R. (1991). Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testis. *Endocrinology* *128*: 2118–2128.
- Foo, N.C., Funkhouser, J.M., Carter, D.A., and Murphy, D. (1994). A testis-specific promoter in the rat vasopressin gene. *J. Biol. Chem.* *269*: 659–667.
- Foreman, J.C., Johansen, T., and Gibb, A.J. (2011). *Textbook of Receptor Pharmacology*, Third Edition (CRC Press).
- Frank, E., and Landgraf, R. (2008). The vasopressin system--from antidiuresis to psychopathology. *Eur. J. Pharmacol.* *583*: 226–242.
- Fujimaki, T., Matsutani, M., Nakamura, O., Asai, A., Funada, N., Koike, M., et al. (1991). Correlation between bromodeoxyuridine-labeling indices and patient prognosis in cerebral astrocytic tumors of adults. *Cancer* *67*: 1629–1634.
- Fujiwara, Y., Hiroyama, M., Sanbe, A., Yamauchi, J., Tsujimoto, G., and Tanoue, A. (2007). Mutual regulation of vasopressin- and oxytocin-induced glucagon secretion in V1b vasopressin receptor knockout mice. *J. Endocrinol.* *192*: 361–369.
- Furler, R.L., and Uittenbogaart, C.H. (2010). Signaling through the P38 and ERK pathways: a common link between HIV replication and the immune response. *Immunol. Res.* *48*: 99–109.
- Gaillard, R.C., Schoenenberg, P., Favrod-Coune, C.A., Muller, A.F., Marie, J., Bockaert, J., et al. (1984). Properties of rat anterior pituitary vasopressin receptors: relation to adenylate cyclase and the effect of corticotropin-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*: 2907–2911.
- Gallo-Payet, N., Chouinard, L., Balestre, M.N., and Guillon, G. (1991). Involvement of protein kinase C in the coupling between the V1 vasopressin receptor and phospholipase C in rat glomerulosa cells: effects on aldosterone secretion. *Endocrinology* *129*: 623–634.
- Geenen, V., Adam, F., Baro, V., Mantanus, H., Anseau, M., Timsit-Berthier, M., et al. (1988). Inhibitory influence of oxytocin infusion on contingent negative variation and some memory tasks in normal men. *Psychoneuroendocrinology* *13*: 367–375.
- Geenen, V., Kecha, O., and Martens, H. (1998). Thymic expression of neuroendocrine self-peptide precursors: role in T cell survival and self-tolerance. *J. Neuroendocrinol.* *10*: 811–822.

- Geisterfer, A.A., and Owens, G.K. (1989). Arginine vasopressin-induced hypertrophy of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 14: 413–420.
- Ghosh, P.M., Mikhailova, M., Bedolla, R., and Kreisberg, J.I. (2001). Arginine vasopressin stimulates mesangial cell proliferation by activating the epidermal growth factor receptor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F972–979.
- Gillies, G.E., Linton, E.A., and Lowry, P.J. (1982). Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299: 355–357.
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81: 629–683.
- Goeij, D.C. de, Kvetnansky, R., Whitnall, M.H., Jezova, D., Berkenbosch, F., and Tilders, F.J. (1991). Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 53: 150–159.
- Goodson, J.L., and Thompson, R.R. (2010). Nonapeptide mechanisms of social cognition, behavior and species-specific social systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20: 784–794.
- Gorbulev, V., Büchner, H., Akhundova, A., and Fahrenholz, F. (1993). Molecular cloning and functional characterization of V2 [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line. *Eur. J. Biochem.* 215: 1–7.
- Grazzini, E., Boccara, G., Joubert, D., Trueba, M., Durroux, T., Guillon, G., et al. (1998). Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449: 325–334.
- Grazzini, E., Breton, C., Derick, S., Andres, M., Raufaste, D., Rickwaert, F., et al. (1999). Vasopressin receptors in human adrenal medulla and pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 2195–2203.
- Grazzini, E., Lodboerer, A.M., Perez-Martin, A., Joubert, D., and Guillon, G. (1996). Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology* 137: 3906–3914.
- Griffante, C., Green, A., Curcuruto, O., Haslam, C.P., Dickinson, B.A., and Arban, R. (2005). Selectivity of d[Cha⁴]AVP and SSR149415 at human vasopressin and oxytocin receptors: evidence that SSR149415 is a mixed vasopressin V1b/oxytocin receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 146: 744–751.
- Guérineau, N.C., and Desarménien, M.G. (2010). Developmental and stress-induced remodeling of cell–cell communication in the adrenal medullary tissue. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30: 1425–1431.
- Guillon, G., Barbeau, D., Neugebauer, W., Guay, S., Bilodeau, L., Balestre, M.N., et al. (1992). Fluorescent peptide hormones: development of high affinity vasopressin analogues. *Peptides* 13: 7–11.
- Guillon, G., Grazzini, E., Andres, M., Breton, C., Trueba, M., Serradeil-LeGal, C., et al. (1998). Vasopressin: a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr. Res.* 24: 703–710.

- Guillon, G., Mouillac, B., Berrada, R., Balestre, M.N., and Lombard, C. (1989). Properties of membranous phospholipase C from WRK1 cell: sensitivity to guanylnucleotides and bacterial toxins. *Cell. Signal.* *1*: 541–552.
- Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H.H., and McCann, S.M. (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*: 11704–11709.
- Gutzler, S.J., Karom, M., Erwin, W.D., and Albers, H.E. (2010). Arginine-vasopressin and the regulation of aggression in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Eur. J. Neurosci.* *31*: 1655–1663.
- Guzmán, Y.F., Tronson, N.C., Jovasevic, V., Sato, K., Guedea, A.L., Mizukami, H., et al. (2013). Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. *Nat. Neurosci.*
- Hammock, E.A.D., Lim, M.M., Nair, H.P., and Young, L.J. (2005). Association of vasopressin 1a receptor levels with a regulatory microsatellite and behavior. *Genes Brain Behav.* *4*: 289–301.
- Hawtin, S.R., Davies, A.R., Matthews, G., and Wheatley, M. (2001a). Identification of the glycosylation sites utilized on the V1a vasopressin receptor and assessment of their role in receptor signalling and expression. *Biochem. J.* *357*: 73–81.
- Hawtin, S.R., Howard, H.C., and Wheatley, M. (2001b). Identification of an extracellular segment of the oxytocin receptor providing agonist-specific binding epitopes. *Biochem. J.* *354*: 465–472.
- Hawtin, S.R., Tobin, A.B., Patel, S., and Wheatley, M. (2001c). Palmitoylation of the vasopressin V1a receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist-induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J. Biol. Chem.* *276*: 38139–38146.
- Heinrichs, M., Meinschmidt, G., Wippich, W., Ehlert, U., and Hellhammer, D.H. (2004). Selective amnesic effects of oxytocin on human memory. *Physiol. Behav.* *83*: 31–38.
- Heinrichs, S.C., Souza, E.B. De, Schulteis, G., Lapsansky, J.L., and Grigoriadis, D.E. (2002). Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharmacology* *27*: 194–202.
- Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S.J., and Burbach, J.P. (2001). Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* *142*: 1659–1668.
- Höhle, S., Culman, J., Boser, M., Qadri, F., and Unger, T. (1996). Effect of angiotensin AT2 and muscarinic receptor blockade on osmotically induced vasopressin release. *Eur. J. Pharmacol.* *300*: 119–123.
- Holmes, C.L., Landry, D.W., and Granton, J.T. (2003). Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care* *7*: 427–434.
- Hoshino, T., Ito, S., Asai, A., Shibuya, M., Prados, M.D., Dodson, B.A., et al. (1992). Cell kinetic analysis of human brain tumors by in situ double labelling with bromodeoxyuridine and iododeoxyuridine. *Int. J. Cancer* *50*: 1–5.

- Hu, S.-B., Zhao, Z.-S., Yhap, C., Grinberg, A., Huang, S.-P., Westphal, H., et al. (2003). Vasopressin receptor 1a-mediated negative regulation of B cell receptor signaling. *J. Neuroimmunol.* *135*: 72–81.
- Hupf, H., Grimm, D., Riegger, G.A., and Schunkert, H. (1999). Evidence for a vasopressin system in the rat heart. *Circ. Res.* *84*: 365–370.
- Hurbin, A., Boissin-Agasse, L., Orcel, H., Rabié, A., Joux, N., Desarménien, M.G., et al. (1998). The V1a and V1b, but not V2, vasopressin receptor genes are expressed in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus, and the transcripts are essentially colocalized in the vasopressinergic magnocellular neurons. *Endocrinology* *139*: 4701–4707.
- Hurbin, A., Orcel, H., Alonso, G., Moos, F., and Rabié, A. (2002). The vasopressin receptors colocalize with vasopressin in the magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus and are modulated by water balance. *Endocrinology* *143*: 456–466.
- Hutchins, A.M., Phillips, P.A., Venter, D.J., Burrell, L.M., and Johnston, C.I. (1995). Molecular cloning and sequencing of the gene encoding a sheep arginine vasopressin type 1a receptor. *Biochim. Biophys. Acta* *1263*: 266–270.
- Inoue, T., Nonoguchi, H., and Tomita, K. (2001). Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc. Res.* *51*: 470–480.
- Israel, S., Lerer, E., Shaley, I., Uzefovsky, F., Reibold, M., Bachner-Melman, R., et al. (2008). Molecular genetic studies of the arginine vasopressin 1a receptor (AVPR1a) and the oxytocin receptor (OXTR) in human behaviour: from autism to altruism with some notes in between. *Prog. Brain Res.* *170*: 435–449.
- Ivell, R., and Burbach, J.P. (1991). The molecular biology of vasopressin and oxytocin genes. *J. Neuroendocrinol.* *3*: 583–585.
- Ivell, R., and Richter, D. (1984). Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*: 2006–2010.
- Jard, S. (1981). [Vasopressin isoreceptors in the liver and kidney: relationship between hormone binding and biological response]. *J. Physiol. (Paris)* *77*: 621–628.
- Johnson, A.E., Audigier, S., Rossi, F., Jard, S., Tribollet, E., and Barberis, C. (1993). Localization and characterization of vasopressin binding sites in the rat brain using an iodinated linear AVP antagonist. *Brain Res.* *622*: 9–16.
- Johnston, C.I. (1985). Vasopressin in circulatory control and hypertension. *J. Hypertens.* *3*: 557–569.
- Kaneto, A., Kosaka, K., and Nakao, K. (1967). Effects of the neurohypophysial hormones on insulin secretion. *Endocrinology* *81*: 783–790.
- Kaufmann, J.E., Iezzi, M., and Vischer, U.M. (2003). Desmopressin (DDAVP) induces NO production in human endothelial cells via V2 receptor- and cAMP-mediated signaling. *J. Thromb. Haemost.* *1*: 821–828.

- Keck, M.E., Kern, N., Erhardt, A., Unschuld, P.G., Ising, M., Salyakina, D., et al. (2008). Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* *147B*: 1196–1204.
- Kelly, J.M., Abrahams, J.M., Phillips, P.A., Mendelsohn, F.A., Grzonka, Z., and Johnston, C.I. (1989). [125I]-[d(CH₂)₅, Sar⁷]AVP: a selective radioligand for V1 vasopressin receptors. *J. Recept. Res.* *9*: 27–41.
- Keyzer, Y. de, Auzan, C., Lenne, F., Beldjord, C., Thibonnier, M., Bertagna, X., et al. (1994). Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett.* *356*: 215–220.
- Keyzer, Y. de, René, P., Beldjord, C., Lenne, F., and Bertagna, X. (1998). Overexpression of vasopressin (V3) and corticotrophin-releasing hormone receptor genes in corticotroph tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *49*: 475–482.
- Kim, S.-J., Young, L.J., Gonen, D., Veenstra-VanderWeele, J., Courchesne, R., Courchesne, E., et al. (2002). Transmission disequilibrium testing of arginine vasopressin receptor 1A (AVPR1A) polymorphisms in autism. *Mol. Psychiatry* *7*: 503–507.
- Koshimizu, T.-A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., and Tanoue, A. (2012). Vasopressin v1a and v1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* *92*: 1813–1864.
- Kovács, K.J., and Sawchenko, P.E. (1996). Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci.* *16*: 262–273.
- Kozorovitskiy, Y., Hughes, M., Lee, K., and Gould, E. (2006). Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex. *Nat. Neurosci.* *9*: 1094–1095.
- Kruszynski, M., Lammek, B., Manning, M., Seto, J., Haldar, J., and Sawyer, W.H. (1980). [1-beta-Mercapto-beta,beta-cyclopentamethylenepropionic acid],2-(O-methyl)tyrosine]arginine-vasopressin and [1-beta-mercapto-beta,beta-cyclopentamethylenepropionic acid]arginine-vasopressine, two highly potent antagonists of the vasopressor response to arginine-vasopressin. *J. Med. Chem.* *23*: 364–368.
- Kumamoto, K., Matsuura, T., Amagai, T., and Kawata, M. (1995). Oxytocin-producing and vasopressin-producing eosinophils in the mouse spleen: immunohistochemical, immunoelectron-microscopic and in situ hybridization studies. *Cell Tissue Res.* *281*: 1–10.
- Landgraf, R., Frank, E., Aldag, J.M., Neumann, I.D., Sharer, C.A., Ren, X., et al. (2003). Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. *Eur. J. Neurosci.* *18*: 403–411.
- Laporte, R., Kohan, A., Heitzmann, J., Wisniewska, H., Toy, J., La, E., et al. (2011). Pharmacological characterization of FE 202158, a novel, potent, selective, and short-acting peptidic vasopressin V1a receptor full agonist for the treatment of vasodilatory hypotension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *337*: 786–796.
- Lee, B., Yang, C., Chen, T.H., al-Azawi, N., and Hsu, W.H. (1995). Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am. J. Physiol.* *269*: E1095–1100.

- Lefebvre, D.L., Giaid, A., Bennett, H., Larivière, R., and Zingg, H.H. (1992). Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 256: 1553–1555.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308: 512–517.
- Legros, J.-J. (2001). Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying–yang neurohormones? *Psychoneuroendocrinology* 26: 649–655.
- Legros, J.J., Gilot, P., Seron, X., Claessens, J., Adam, A., Moeglen, J.M., et al. (1978). Influence of vasopressin on learning and memory. *Lancet* 1: 41–42.
- Liard, J.F. (1984). Vasopressin in cardiovascular control: role of circulating vasopressin. *Clin. Sci.* 67: 473–481.
- Lim, A.T., Lolait, S.J., Barlow, J.W., Autelitano, D.J., Toh, B.H., Boublik, J., et al. (1984). Immunoreactive arginine-vasopressin in Brattleboro rat ovary. *Nature* 310: 61–64.
- Lim, M.M., Wang, Z., Olazábal, D.E., Ren, X., Terwilliger, E.F., and Young, L.J. (2004). Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature* 429: 754–757.
- Lincoln, J., Loesch, A., and Burnstock, G. (1990). Localization of vasopressin, serotonin and angiotensin II in endothelial cells of the renal and mesenteric arteries of the rat. *Cell Tissue Res.* 259: 341–344.
- Liu, J.P., Engler, D., Funder, J.W., and Robinson, P.J. (1992). Evidence that the stimulation by arginine vasopressin of the release of adrenocorticotropin from the ovine anterior pituitary involves the activation of protein kinase C. *Mol. Cell. Endocrinol.* 87: 35–47.
- Livett, B.G., and Parry, H.B. (1973). The distribution of vasopressin and neurophysin in the hypothalamo-distal-neurohypophysial and hypothalamo-infundibular neurosecretory systems of normal and scrapie-affected sheep. *J. Physiol. (Lond.)* 230: 20P–22P.
- Loesch, A., Tomlinson, A., and Burnstock, G. (1991). Localization of arginine-vasopressin in endothelial cells of rat pulmonary artery. *Anat. Embryol.* 183: 129–134.
- Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., Mahan, L.C., Felder, C.C., Button, D.C., Young, W.S., 3rd, et al. (1995). Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 6783–6787.
- Londen, L. van, Goekoop, J.G., Kempen, G.M. van, Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., Wiegant, V.M., Velde, E.A. van der, et al. (1997). Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology* 17: 284–292.
- Londen, L. van, Kerkhof, G.A., Berg, F. van den, Goekoop, J.G., Zwinderman, K.H., Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., et al. (1998). Plasma arginine vasopressin and motor activity in major depression. *Biol. Psychiatry* 43: 196–204.
- Ma, P., and Zimmel, R. (2002). Value of novelty? *Nat Rev Drug Discov* 1: 571–572.

- Mak, P., Broussard, C., Vacy, K., and Broadbear, J.H. (2012). Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* *26*: 532–542.
- Manning, M., Misicka, A., Olma, A., Bankowski, K., Stoev, S., Chini, B., et al. (2012). Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J. Neuroendocrinol.* *24*: 609–628.
- Manning, M., Stoev, S., Chini, B., Durroux, T., Mouillac, B., and Guillon, G. (2008). Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Prog. Brain Res.* *170*: 473–512.
- Marazziti, D., and Catena Dell'osso, M. (2008). The role of oxytocin in neuropsychiatric disorders. *Curr. Med. Chem.* *15*: 698–704.
- Marir, R., Virsolvy, A., Wisniewski, K., Mion, J., Haddou, D., Galibert, E., et al. (2013). Pharmacological characterization of FE 201874, the first selective high affinity rat V1A vasopressin receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.*
- Masaki, H., Imaizumi, T., Harada, S., Momohara, M., Hirooka, Y., and Takeshita, A. (1993). Effects of a novel orally effective V1-receptor antagonist, OPC-21268, on AVP-induced sympathoinhibition. *Am. J. Physiol.* *264*: R1089–1094.
- Mathiasen, J.R., Larson, E.R., Ariano, M.A., and Sladek, C.D. (1996). Neurophysin expression is stimulated by dopamine D1 agonist in dispersed hypothalamic cultures. *Am. J. Physiol.* *270*: R404–412.
- Matthews, T.J., Abdelbaky, P., and Pfaff, D.W. (2005). Social and sexual motivation in the mouse. *Behav. Neurosci.* *119*: 1628–1639.
- Mazzocchi, G., Gottardo, G., and Nussdorfer, G.G. (1997). Catecholamines stimulate steroid secretion of dispersed fowl adrenocortical cells, acting through the beta-receptor subtype. *Horm. Metab. Res.* *29*: 190–192.
- Mazzocchi, G., Markowska, A., Malendowicz, L.K., Musajo, F., Meneghelli, V., and Nussdorfer, G.G. (1993). Evidence that endogenous arginine-vasopressin (AVP) is involved in the maintenance of the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *45*: 251–256.
- McEwen, B.B. (2004). General introduction to vasopressin and oxytocin: structure/metabolism, evolutionary aspects, neural pathway/receptor distribution, and functional aspects relevant to memory processing. *Adv. Pharmacol.* *50*: 1–50, 655–708.
- McKinley, M.J., Mathai, M.L., McAllen, R.M., McClear, R.C., Miselis, R.R., Pennington, G.L., et al. (2004). Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J. Neuroendocrinol.* *16*: 340–347.
- Meynen, G., Unmehopa, U.A., Heerikhuizen, J.J. van, Hofman, M.A., Swaab, D.F., and Hoogendijk, W.J.G. (2006). Increased arginine vasopressin mRNA expression in the human hypothalamus in depression: A preliminary report. *Biol. Psychiatry* *60*: 892–895.

- Meynen, G., Unmehopa, U.A., Hofman, M.A., Swaab, D.F., and Hoogendijk, W.J.G. (2009). Hypothalamic vasopressin and oxytocin mRNA expression in relation to depressive state in Alzheimer's disease: a difference with major depressive disorder. *J. Neuroendocrinol.* *21*: 722–729.
- Mezzacappa, E.S., and Katlin, E.S. (2002). Breast-feeding is associated with reduced perceived stress and negative mood in mothers. *Health Psychol* *21*: 187–193.
- Michell, R.H., Kirk, C.J., and Billah, M.M. (1979). Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochem. Soc. Trans.* *7*: 861–865.
- Moll, U.M., Lane, B.L., Robert, F., Geenen, V., and Legros, J.J. (1988). The neuroendocrine thymus. Abundant occurrence of oxytocin-, vasopressin-, and neurophysin-like peptides in epithelial cells. *Histochemistry* *89*: 385–390.
- Morel, A., Lolait, S.J., and Brownstein, M.J. (1993). Molecular cloning and expression of rat V1a and V2 arginine vasopressin receptors. *Regul. Pept.* *45*: 53–59.
- Morel, A., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., and Lolait, S.J. (1992). Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature* *356*: 523–526.
- Morello, J.P., Salahpour, A., Laperrière, A., Bernier, V., Arthus, M.F., Lonergan, M., et al. (2000). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* *105*: 887–895.
- Mouillac, B., Manning, M., and Durroux, T. (2008). Fluorescent agonists and antagonists for vasopressin/oxytocin G protein-coupled receptors: usefulness in ligand screening assays and receptor studies. *Mini Rev Med Chem* *8*: 996–1005.
- Nakamura, K., Fujiwara, Y., Mizutani, R., Sanbe, A., Miyauchi, N., Hiroyama, M., et al. (2008). Effects of vasopressin V1b receptor deficiency on adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells in response to oxytocin stimulation. *Endocrinology* *149*: 4883–4891.
- Nakano, J. (1973). Cardiovascular actions of vasopressin. *Jpn. Circ. J.* *37*: 363–381.
- Nathanson, M.H., Gautam, A., Bruck, R., Isales, C.M., and Boyer, J.L. (1992). Effects of Ca²⁺ agonists on cytosolic Ca²⁺ in isolated hepatocytes and on bile secretion in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* *15*: 107–116.
- Nephew, B.C., and Bridges, R.S. (2008). Central actions of arginine vasopressin and a V1a receptor antagonist on maternal aggression, maternal behavior, and grooming in lactating rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *91*: 77–83.
- Neumann, I.D., and Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences* *35*: 649–659.
- Nicou, A., Serrière, V., Prigent, S., Boucherie, S., Combettes, L., Guillon, G., et al. (2003). Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte Ca²⁺ signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow. *FASEB J.* *17*: 1901–1903.
- Nielsen, S., and Agre, P. (1995). The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* *48*: 1057–1068.

- Nishimori, K., Takayanagi, Y., Yoshida, M., Kasahara, Y., Young, L.J., and Kawamata, M. (2008). New aspects of oxytocin receptor function revealed by knockout mice: sociosexual behaviour and control of energy balance. *Prog. Brain Res.* *170*: 79–90.
- Nishimori, K., Young, L.J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T.R., and Matzuk, M.M. (1996). Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*: 11699–11704.
- Northup, J.K., Smigel, M.D., and Gilman, A.G. (1982). The guanine nucleotide activating site of the regulatory component of adenylate cyclase. Identification by ligand binding. *J. Biol. Chem.* *257*: 11416–11423.
- Oigny-Longpré, G., Corbani, M., Zhou, J., Hogue, M., Guillon, G., and Bouvier, M. (2012). Engagement of β -arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*: E1028–1037.
- Ophir, A.G., Wolff, J.O., and Phelps, S.M. (2008). Variation in neural V1aR predicts sexual fidelity and space use among male prairie voles in semi-natural settings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*: 1249–1254.
- Oshikawa, S., Tanoue, A., Koshimizu, T., Kitagawa, Y., and Tsujimoto, G. (2004). Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol. Pharmacol.* *65*: 623–629.
- Ostrowski, N.L., Lolait, S.J., and Young, W.S., 3rd (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* *135*: 1511–1528.
- Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R.P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M.K., Millard, P.J., Mao, F., et al. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* *47*: 1179–1188.
- Payet, N., Déziel, Y., and Lehoux, J.G. (1984). Vasopressin: a potent growth factor in adrenal glomerulosa cells in culture. *J. Steroid Biochem.* *20*: 449–454.
- Payet, N., and Isler, H. (1976). Adrenal glomerulosa mitotic stimulation by posterior pituitary hormones. *Cell Tissue Res.* *172*: 93–101.
- Pena, A., Murat, B., Trueba, M., Ventura, M.A., Bertrand, G., Cheng, L.L., et al. (2007). Pharmacological and physiological characterization of d[Leu4, Lys8]vasopressin, the first V1b-selective agonist for rat vasopressin/oxytocin receptors. *Endocrinology* *148*: 4136–4146.
- Plotsky, P.M. (1988). Hypophysiotropic regulation of stress-induced ACTH secretion. *Adv. Exp. Med. Biol.* *245*: 65–81.
- Poláček, I., Krejčí, I., and Rudinger, J. (1967). The action of oxytocin and synthetic analogues on the isolated mammary-gland myoepithelium of the lactating rat; effect of some ions. *J. Endocrinol.* *38*: 13–24.
- Popik, P., and Vetulani, J. (1991). Opposite action of oxytocin and its peptide antagonists on social memory in rats. *Neuropeptides* *18*: 23–27.

- Postina, R., Kojro, E., and Fahrenholz, F. (1996). Separate agonist and peptide antagonist binding sites of the oxytocin receptor defined by their transfer into the V2 vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* *271*: 31593–31601.
- Purba, J.S., Hoogendijk, W.J., Hofman, M.A., and Swaab, D.F. (1996). Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch. Gen. Psychiatry* *53*: 137–143.
- Rabadan-Diehl, C., Martínez, A., Volpi, S., Subburaju, S., and Aguilera, G. (2007). Inhibition of vasopressin V1b receptor translation by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region. *J. Neuroendocrinol.* *19*: 309–319.
- Refojo, D., Echenique, C., Müller, M.B., Reul, J.M.H.M., Deussing, J.M., Wurst, W., et al. (2005). Corticotropin-releasing hormone activates ERK1/2 MAPK in specific brain areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*: 6183–6188.
- Richardson, S.B., Eyler, N., Twente, S., Monaco, M., Altszuler, N., and Gibson, M. (1990). Effects of vasopressin on insulin secretion and inositol phosphate production in a hamster beta cell line (HIT). *Endocrinology* *126*: 1047–1052.
- Rimoldi, V., Reversi, A., Taverna, E., Rosa, P., Francolini, M., Cassoni, P., et al. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* *22*: 6054–6060.
- Robert, J., Auzan, C., Ventura, M.A., and Clauser, E. (2005). Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone. *J. Biol. Chem.* *280*: 42198–42206.
- Rodrigo, J., Pena, A., Murat, B., Trueba, M., Durroux, T., Guillon, G., et al. (2007). Mapping the binding site of arginine vasopressin to V1a and V1b vasopressin receptors. *Mol. Endocrinol.* *21*: 512–523.
- Rossi, N.F., and Brooks, D.P. (1996). kappa-Opioid agonist inhibition of osmotically induced AVP release: preferential action at hypothalamic sites. *Am. J. Physiol.* *270*: E367–372.
- Rozengurt, E., Legg, A., and Pettican, P. (1979). Vasopressin stimulation of mouse 3T3 cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *76*: 1284–1287.
- Ruppert, S., Scherer, G., and Schütz, G. (1984). Recent gene conversion involving bovine vasopressin and oxytocin precursor genes suggested by nucleotide sequence. *Nature* *308*: 554–557.
- Russell, J.T., Brownstein, M.J., and Gainer, H. (1980). Biosynthesis of vasopressin, oxytocin, and neurophysins: isolation and characterization of two common precursors (propressophysin and prooxyphysin). *Endocrinology* *107*: 1880–1891.
- Russell, W.E., and Bucher, N.L. (1983). Vasopressin modulates liver regeneration in the Brattleboro rat. *Am. J. Physiol.* *245*: G321–324.
- Russo, A., Gianni, L., Kinsella, T.J., Klecker, R.W., Jr, Jenkins, J., Rowland, J., et al. (1984). Pharmacological evaluation of intravenous delivery of 5-bromodeoxyuridine to patients with brain tumors. *Cancer Res.* *44*: 1702–1705.

- Ryckwaert, F., and Colson, P.H. (2005). Hypovolaemia-induced vasodilatation during angiotensin AT1 receptor blockade: role of the AT2 receptor. *Pharmacol. Res.* *51*: 37–40.
- Saito, M., Sugimoto, T., Tahara, A., and Kawashima, H. (1995). Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *212*: 751–757.
- Sawyer, W.H., Acosta, M., Balaspiri, L., Judd, J., and Manning, M. (1974). Structural changes in the arginine vasopressin molecule that enhance antidiuretic activity and specificity. *Endocrinology* *94*: 1106–1115.
- SAWYER, W.H., MUNSICK, R.A., and DYKE, H.B. VAN (1960). Antidiuretic hormones. *Circulation* *21*: 1027–1037.
- Scantamburlo, G., Hansenne, M., Fuchs, S., Pitchot, W., Pinto, E., Reggers, J., et al. (2005). AVP- and OT-neurophysins response to apomorphine and clonidine in major depression. *Psychoneuroendocrinology* *30*: 839–845.
- Schlosser, S.F., Almeida, O.F., Patchev, V.K., Yassouridis, A., and Elands, J. (1994). Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V1b type. *Endocrinology* *135*: 2058–2063.
- Schrier, R.W., and Berl, T. (1972). Mechanism of the antidiuretic effect associated with interruption of parasympathetic pathways. *J. Clin. Invest.* *51*: 2613–2620.
- Scott, L.V., Medbak, S., and Dinan, T.G. (1999). ACTH and cortisol release following intravenous desmopressin: a dose-response study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *51*: 653–658.
- Serradeil-Le Gal, C. (2001). An overview of SR121463, a selective non-peptide vasopressin V(2) receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* *19*: 201–214.
- Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Foulon, L., Germain, G., Advenier, C., Naline, E., et al. (2004). SSR126768A (4-chloro-3-[(3R)-(+)-5-chloro-1-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-N-ethyl-N-(3-pyridylmethyl)-benzamide, hydrochloride): a new selective and orally active oxytocin receptor antagonist for the prevention of preterm labor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*: 414–424.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., 3rd, Tonnerre, B., Roux, R., Garcia, G., Griebel, G., et al. (2005). An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev* *11*: 53–68.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Garcia, C., Lacour, C., Guiraudou, P., Christophe, B., et al. (1993). Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J. Clin. Invest.* *92*: 224–231.
- Serrière, V., Berthon, B., Boucherie, S., Jacquemin, E., Guillon, G., Claret, M., et al. (2001). Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow. *FASEB J.* *15*: 1484–1486.
- Share, L. (1988). Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.* *68*: 1248–1284.

- Steimer, T., and Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 6: 87–100.
- Stemmelin, J., Lukovic, L., Salome, N., and Griebel, G. (2005). Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415. *Neuropsychopharmacology* 30: 35–42.
- Struck, J., Morgenthaler, N.G., and Bergmann, A. (2005). Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides* 26: 2500–2504.
- Sugimoto, T., Saito, M., Mochizuki, S., Watanabe, Y., Hashimoto, S., and Kawashima, H. (1994). Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 27088–27092.
- Surget, A., and Belzung, C. (2008). Involvement of vasopressin in affective disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 583: 340–349.
- Swedo, S.E., Leonard, H.L., Kruesi, M.J., Rettew, D.C., Listwak, S.J., Berrettini, W., et al. (1992). Cerebrospinal fluid neurochemistry in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 49: 29–36.
- Szot, P., Bale, T.L., and Dorsa, D.M. (1994). Distribution of messenger RNA for the vasopressin V1a receptor in the CNS of male and female rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 24: 1–10.
- Tamma, R., Colaianni, G., Zhu, L., DiBenedetto, A., Greco, G., Montemurro, G., et al. (2009). Oxytocin is an anabolic bone hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 7149–7154.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J.* 23: 3950–3961.
- Terrillon, S., Cheng, L.L., Stoev, S., Mouillac, B., Barberis, C., Manning, M., et al. (2002). Synthesis and characterization of fluorescent antagonists and agonists for human oxytocin and vasopressin V(1)(a) receptors. *J. Med. Chem.* 45: 2579–2588.
- Thibonnier, M., Auzan, C., Madhun, Z., Wilkins, P., Berti-Mattera, L., and Clauser, E. (1994). Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 3304–3310.
- Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., and Shoham, M. (2001). The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 175–202.
- Thibonnier, M., Conarty, D.M., Preston, J.A., Plesnicher, C.L., Dweik, R.A., and Erzurum, S.C. (1999). Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology* 140: 1301–1309.
- Thibonnier, M., Conarty, D.M., Preston, J.A., Wilkins, P.L., Berti-Mattera, L.N., and Mattera, R. (1998). Molecular pharmacology of human vasopressin receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449: 251–276.

- Thibonnier, M., Preston, J.A., Dulin, N., Wilkins, P.L., Berti-Mattera, L.N., and Mattera, R. (1997). The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology* 138: 4109–4122.
- Thompson, R.R., George, K., Walton, J.C., Orr, S.P., and Benson, J. (2006). Sex-specific influences of vasopressin on human social communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 7889–7894.
- Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., et al. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278: 6258–6267.
- Tran, D., Durroux, T., Stelly, N., Seyer, R., Tordjmann, T., Combettes, L., et al. (1999). Visualization of cell surface vasopressin V1a receptors in rat hepatocytes with a fluorescent linear antagonist. *J. Histochem. Cytochem.* 47: 401–410.
- Trejter, M., Carraro, G., Rucinski, M., Hochol, A., Rebuffat, P., Nussdorfer, G.G., et al. (2005). Arginin-vasopressin regulates proliferative activity of the regenerating rat adrenal cortex. *Int. J. Mol. Med.* 15: 993–997.
- Tribollet, E., Arsenijevic, Y., and Barberis, C. (1998). Vasopressin binding sites in the central nervous system: distribution and regulation. *Prog. Brain Res.* 119: 45–55.
- Tribollet, E., Raufaste, D., Maffrand, J., and Serradeil-Le Gal, C. (1999). Binding of the non-peptide vasopressin V1a receptor antagonist SR-49059 in the rat brain: an in vitro and in vivo autoradiographic study. *Neuroendocrinology* 69: 113–120.
- Tsukada, J., Tahara, A., Tomura, Y., Kusayama, T., Wada, K., Ishii, N., et al. (2005). Pharmacologic properties of YM218, a novel, potent, nonpeptide vasopressin V1A receptor-selective antagonist. *Vascul. Pharmacol.* 42: 47–55.
- TUPPY, H. (1953). The amino-acid sequence in oxytocin. *Biochim. Biophys. Acta* 11: 449–450.
- Uvnäs-Moberg, K. (1990). Endocrinologic control of food intake. *Nutr. Rev.* 48: 57–63; discussion 114–131.
- Vaccari, C., Lolait, S.J., and Ostrowski, N.L. (1998). Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. *Endocrinology* 139: 5015–5033.
- Ventura, M.A., René, P., Keyzer, Y. de, Bertagna, X., and Clauser, E. (1999). Gene and cDNA cloning and characterization of the mouse V3/V1b pituitary vasopressin receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 22: 251–260.
- Viero, C., Shibuya, I., Kitamura, N., Verkhatsky, A., Fujihara, H., Katoh, A., et al. (2010). REVIEW: Oxytocin: Crossing the bridge between basic science and pharmacotherapy. *CNS Neurosci Ther* 16: e138–156.
- VIGNEAUD, V. DU (1954). Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect.* 50: 1–26.
- VIGNEAUD, V. DU, RESSLER, C., and TRIPPETT, S. (1953). The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J. Biol. Chem.* 205: 949–957.

- Vilhardt, H., Barth, T., Melin, P., and Aurell, C.J. (1993). Antidiuretic activity and release of factor VIII by vasopressin analogues. *Eur. J. Pharmacol.* *232*: 223–226.
- Volpi, S., Liu, Y., and Aguilera, G. (2006). Vasopressin increases GAGA binding activity to the V1b receptor promoter through transactivation of the MAP kinase pathway. *J. Mol. Endocrinol.* *36*: 581–590.
- Walum, H., Westberg, L., Henningsson, S., Neiderhiser, J.M., Reiss, D., Igl, W., et al. (2008). Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*: 14153–14156.
- Wang, S.-S., Kamphuis, W., Huitinga, I., Zhou, J.-N., and Swaab, D.F. (2008). Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances. *Mol. Psychiatry* *13*: 786–799, 741.
- Wange, R.L., Smrcka, A.V., Sternweis, P.C., and Exton, J.H. (1991). Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [32P]gamma-azidoanilido GTP in response to vasopressin. Immunologic identification as alpha subunits of the Gq class of G proteins. *J. Biol. Chem.* *266*: 11409–11412.
- Wardener, H.E. de (2001). The hypothalamus and hypertension. *Physiol. Rev.* *81*: 1599–1658.
- Wersinger, S.R., Caldwell, H.K., Martinez, L., Gold, P., Hu, S.-B., and Young, W.S., 3rd (2007). Vasopressin 1a receptor knockout mice have a subtle olfactory deficit but normal aggression. *Genes Brain Behav.* *6*: 540–551.
- Wersinger, S.R., Ginns, E.I., O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., and Young, W.S., 3rd (2002). Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol. Psychiatry* *7*: 975–984.
- Wesley, V.J., Hawtin, S.R., Howard, H.C., and Wheatley, M. (2002). Agonist-specific, high-affinity binding epitopes are contributed by an arginine in the N-terminus of the human oxytocin receptor. *Biochemistry* *41*: 5086–5092.
- West, D. van, Del-Favero, J., Aulchenko, Y., Oswald, P., Souery, D., Forsgren, T., et al. (2004). A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Mol. Psychiatry* *9*: 287–292.
- WIED, D. DE (1965). The influence of the posterior and intermediate lobe of the pituitary and pituitary peptides on the maintenance of a conditioned avoidance response in rats. *Int J Neuropharmacol* *4*: 157–167.
- Wied, D. de, Diamant, M., and Fodor, M. (1993). Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides. *Front Neuroendocrinol* *14*: 251–302.
- Winslow, J.T., Hastings, N., Carter, C.S., Harbaugh, C.R., and Insel, T.R. (1993). A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature* *365*: 545–548.
- Wisniewski, K., Galyean, R., Tariga, H., Alagarsamy, S., Croston, G., Heitzmann, J., et al. (2011). New, potent, selective, and short-acting peptidic V1a receptor agonists. *J. Med. Chem.* *54*: 4388–4398.

- Won, J.G., and Orth, D.N. (1994). Role of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* *135*: 1496–1503.
- Wooten, D.L., Simms, J., Massoura, A.J., Trim, J.E., and Wheatley, M. (2011). Agonist-specific requirement for a glutamate in transmembrane helix 1 of the oxytocin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* *333*: 20–27.
- Wotjak, C.T., Ganster, J., Kohl, G., Holsboer, F., Landgraf, R., and Engelmann, M. (1998). Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* *85*: 1209–1222.
- Yamamura, Y., Ogawa, H., Yamashita, H., Chihara, T., Miyamoto, H., Nakamura, S., et al. (1992). Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* *105*: 787–791.
- Yibchok-anun, S., and Hsu, W.H. (1998). Effects of arginine vasopressin and oxytocin on glucagon release from clonal alpha-cell line In-R1-G9: involvement of V1b receptors. *Life Sci.* *63*: 1871–1878.
- Yoshimura, R., Kiyama, H., Kimura, T., Araki, T., Maeno, H., Tanizawa, O., et al. (1993). Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* *133*: 1239–1246.
- Young, L.J., Nilsen, R., Waymire, K.G., MacGregor, G.R., and Insel, T.R. (1999). Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature* *400*: 766–768.
- Young, L.J., Wang, Z., Cooper, T.T., and Albers, H.E. (2000). Vasopressin (V1a) receptor binding, mRNA expression and transcriptional regulation by androgen in the Syrian hamster brain. *J. Neuroendocrinol.* *12*: 1179–1185.
- Young, W.S., Li, J., Wersinger, S.R., and Palkovits, M. (2006). The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience* *143*: 1031–1039.
- Zaninetti, M., Dubois-Dauphin, M., Lindstrom, J., and Raggenbass, M. (2000). Nicotinic acetylcholine receptors in neonatal motoneurons are regulated by axotomy: an electrophysiological and immunohistochemical study in human bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* *100*: 589–597.
- Zhao, L., and Brinton, R.D. (2002). Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in cultured cortical astrocytes. *Brain Res.* *943*: 117–131.
- Zimmerman, E.A., Stillman, M.A., Recht, L.D., Antunes, J.L., Carmel, P.W., and Goldsmith, P.C. (1977). Vasopressin and corticotropin-releasing factor: an axonal pathway to portal capillaries in the zona externa of the median eminence containing vasopressin and its interaction with adrenal corticoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *297*: 405–419.
- Zingg, H.H., and Laporte, S.A. (2003). The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* *14*: 222–227.

Annexes A

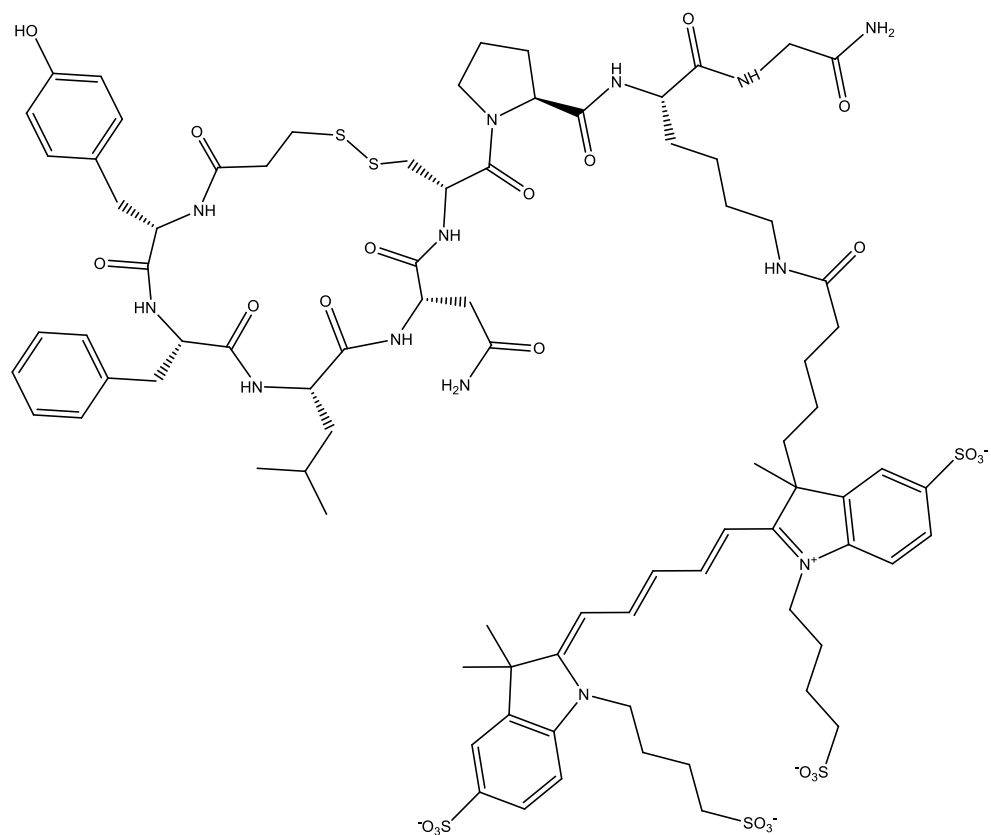
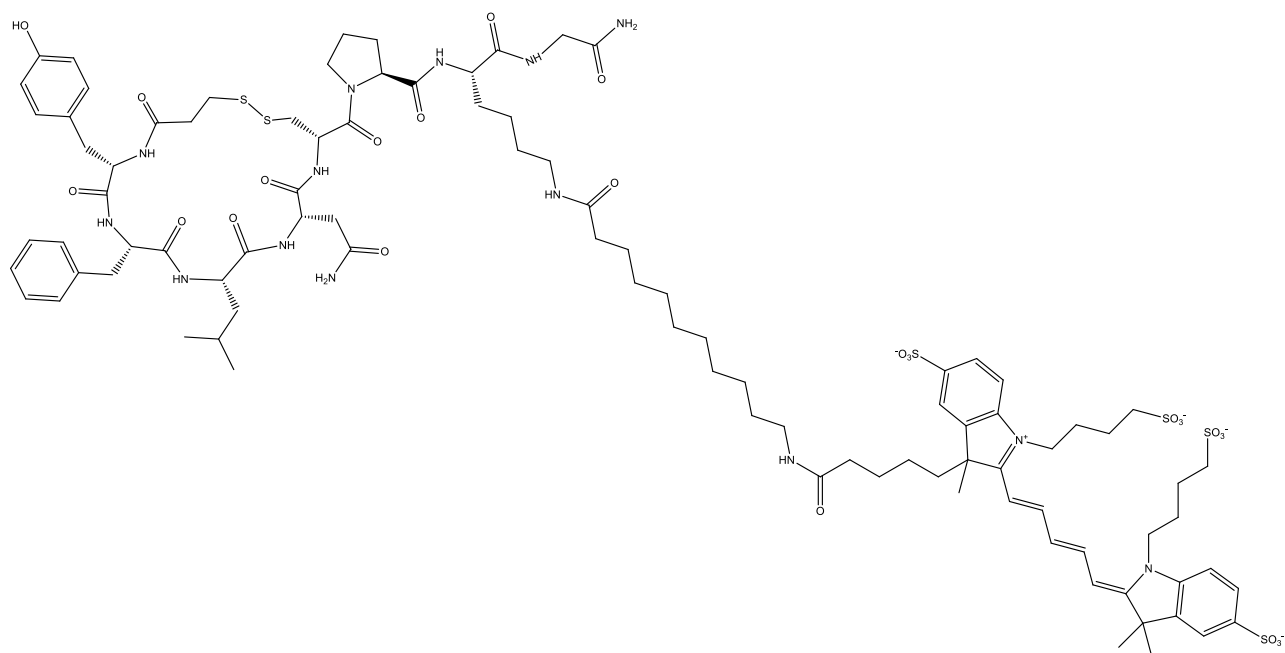
A**B**

Figure S1: Structure chimique de l'analogue 3 (A) et de l'analogue 9 (B)

العنوان : وصف أدوات فرماكولوجية لدراسة المستقبلات المركزية للفازوبريسين

دكتورة ل م د بين جامعة قسنطينة 1 و جامعة مونبوليي 1

نيوروببتيد مثل فاسوبريسين والأوكسيتوسين، إلى جانب أعمالهم الطرفية المعروفة، وتنظيم العديد من الوظائف المعرفية والسلوكية من المركزية، المزاج، التعلم وOT، V_{1A} ، V_{1B} خلال العمل المركزي. في الأونة الأخيرة، قد تبين أن فاسوبريسين ينظم، من خلال مستقبلات pharmacologiques تظل أقل دراسة، مع عدم وجود أدوات V_{1A} و V_{1B} والاضطرابات العاطفية التي تحدث في النظام. ومع ذلك فإنّ انتقائية .

حتى الآن V_{1A} إنّ الفئران تعد من بين الحيوانات الأكثر دراسة في المختبر. رغم هذا فإنه لم يتم وصف مستقبلات انتقائية ل فنحن نفتقر إلى أدوات انتقائية قد تسمح لنا بتحديد موقعها في الجهاز العصبي المركزي. V_{1B} كذلك الأمر بالنسبة لمستقبلات ومنه فإنّ تطوير جزيئات انتقائية جديدة لتلبية هذه الاحتياجات مهمّ. هذا أدى بنا، في هذا العمل من الأطروحة، التركيز على مجالين من مجالات البحوث التي تستهدف

V_{1A} مستقبلات

قد تم إختياره F-180 إنّ هذا المركب، المستمدة من FE. هذا الجزء يتعلق بوصف الخصائص الدوائية لمركب جديد، 201874 الخاص بالإنسان، مع العلم أنّ مدّة حياته قصيرة V_{1A} على أساس أنّه انتقائي بالنسبة للمستقبل عكس V_{1B}/V_{1A} و V_2/V_{1A} انتقائي جيد للمركبات ligand هو عبارة عن FE النتائج التي تم الحصول عليها تؤكّد أنّ 201874 OT. وعليه فهذا المركب غير انتقائي بالنسبة للمستقبل OT/ V_{1A} النتائج التي تم الحصول عليها من خلال التجارب التي أجريت مع بالنسبة لجميع الوظائف. تم المصادقة على V_{1A} يعطيه كامل الخصوصية ل OT antagonist و V_{1A} agoniste إنّ خاصية الإنتقائية. إذاً قد سمحت دراستنا FE 201874 agoniste التي أكدت طبيعة *in vivo* و *ex vivo* النتائج أيضا من قبل تجارب عند الفأر V_{1A} الأوّل الانتقائي للمستقبل agoniste بوصف ل هذا الببتيد الانتقائي سيكون مفيد بشكل خاص في وضع استراتيجيات علاجية جديدة أو لدراسات الدوائية التي تهدف إلى فهم أفضل للأدوار المركزية من هذه المستقبلات في الأمراض السلوكية والأمراض المرتبطة بالإجهاد

V_{1B} مستقبلات

والتعليم الإشعاعي بواسطة روابط مشعّة مستمدة من pharmacologiques هذا الجزء يخص بوصف الخصائص عند الفأر V_{1B} في إطار دراسة الموضع المركزي للمستقبلات، V_{1B} الأوّل الانتقائي للمستقبل agoniste ل d[Leu⁴,Lys⁸]VP و قليلا، أو V_2/V_{1B} و V_{1A}/V_{1B} الانتقائية بالنسبة ل agonistes النتائج التي تم الحصول عليها، أظهرت أنّ 3 روابط الجرّة هم من قدرتهم على تعليم المستقبلات في النظام في زراعة الخلايا وفي زراعة الخلايا الأولية، قد تم. OT/ V_{1B} قد تكون معدومة مع V_{1B} أيضا تقييمها وقد أثبت بأنّ هذه المركبات المشعّة تمثل أداة ممتازة للتعليم وللدراسة الموضعية لمستقبلات المركزية في مختلف V_{1B} هذه المركبات تم استخدامها أيضا على شرائح دماغية للفأر من أجل دراسة مواضع مستقبلات l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale, de l'hypothalamus le bulbe olfactif على مستوى الشرائح الدماغية قد MAP kinase وأخيرا، مع الأخذ بعين الاعتبار طبيعة الروابط المشعّة، فإنّ تنشيط مسار تمت دراسته أيضا

Last name: MARIR	Date of thesis
First name: RAFIK	September, 19 th 2013

Title: Characterisation of pharmacological tools for the study of vasopressin central receptors

Thesis doctorate jointly supervised between Constantine 1 university and Montpellier 1 university

Neuropeptides such as vasopressin and oxytocin, besides their well-known peripheral actions, regulate many cognitive and behavioral functions via a central action. Recently, it has been shown that vasopressin mediate, through V1A, V1B and OT receptor, mood, learning and emotional disorders occurring in the limbic system. However, the V1A and V1B receptor sub-types remain the least studied because of the lack of selective pharmacological tools.

In the rat, one of the most used animals in laboratory, no high affinity agonist selective for the V1A receptor has been characterized yet. Similarly for V1B, we lack radio-label ou fluorescent tools to localize selectively this receptor in the central nervous system.

This led us, in this work, to focus on two targets :

V1A receptor

This part concerns the pharmacological characterization of a new compound, the FE 201874. This compound, derived from the F-180 was first described as a short-acting selective agonist of the human V1A receptor.

Our results confirmed that FE 201874 is a good ligand and V1B/V1A, V2/V1A selective concerning binding experiments and OT/V1A unselective. FE 201874 binds to the oxytocin receptor but with a moderate affinity and behaves as an oxytocin antagonist *in vitro*, but not *in vivo*. Our study has allowed the characterization of the first selective V1A receptor agonist in rats.

This selective peptide would be particularly useful in developing new therapeutic strategies or pharmacological studies aimed at better understanding of the central roles of these receptors in behavior and pathologies.

V1B receptor

This section concerns the characterization of the labeling and pharmacological properties of fluorescent ligands derived from d [Leu⁴, Lys⁸] VP, the first selective agonist of the rat V1B receptor, to study the distribution of central V1B receptors in rats.

Our results showed that the 3 fluorescent ligands tested are good agonists, V1A/V1B and V2/V1B selective and OT/V1B unselective. Their ability to label the V1B receptors in a heterologous cell culture system and primary cell culture was also evaluated, demonstrating that these fluorescent ligands are excellent tools to label and study the V1B receptors localization. These ligands were then used on fresh rat brain slices to study the V1B receptors distribution in central regions involved in different behavioral processes. Several sites have been identified including the hippocampus, the cortex, the amygdala, the hypothalamus, the olfactory bulb. In addition, taking advantage of the agonist nature of the fluorescent ligands, the activation of the Map kinase pathway in living brain slices by the fluorescent agonists could also be evidenced using a specific anti-pERK antibody. Thus, mapping the *in situ* expression of V1b receptors in connection with their function in normal and stressed animals will become possible using these tools.

This work has been supported by the Averroès program

Keywords: vasopressin, V_{1A} et V_{1B} receptors, fluorescent ligands, Stress, pharmacology.

Nom : MARIR	Date de soutenance
Prénom : RAFIK	19 Septembre 2013

Titre : Caractérisation d'outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs centraux de la vasopressine

Co-tutelle de thèse de doctorat 3^{ème} cycle entre l'université Constantine 1 et l'université Montpellier 1

Les neuropeptides tels que la vasopressine et l'ocytocine, hormis leurs actions périphériques bien connues, régulent de nombreuses fonctions cognitives et comportementales *via* une action centrale. Récemment, il a été démontré que la vasopressine régule, par le biais des récepteurs centraux V_{1A} , V_{1B} et OT de l'ocytocine, l'humeur, l'apprentissage et les désordres affectifs évoluant dans le système limbique. Néanmoins, les isoformes V_{1A} et V_{1B} restent les moins étudiées, souffrant d'un manque d'outils pharmacologiques sélectifs.

Chez le rat, un modèle animal des plus utilisé en laboratoire, aucun agoniste de haute affinité sélectif du récepteur V_{1A} n'a été caractérisé. De la même façon pour le récepteur V_{1B} , nous manquons d'outils sélectifs permettant sa localisation dans le système nerveux central. D'où la nécessité de développer de nouvelles molécules sélectives pour répondre à ces besoins. Ceci nous a conduit, lors de ce travail de thèse, à privilégier deux axes de recherches ciblant :

Le récepteur V_{1A}

Cette partie concerne la caractérisation des propriétés pharmacologiques d'un nouveau composé, le FE 201874. Ce composé, dérivé du F-180 a été présenté comme un agoniste sélectif du récepteur V_{1A} humain à courte durée de vie.

Les résultats de cette étude ont confirmé que le FE 201874 est un très bon ligand sélectif V_{1B}/V_{1A} et V_2/V_{1A} vis à vis des expériences de liaison et peu sélectif OT/ V_{1A} , ce composé ayant une affinité non négligeable pour le récepteur OT. Son caractère, agoniste V_{1A} et antagoniste OT lui confère une sélectivité complète V_{1A} pour toute approche fonctionnelle. La validation des résultats s'est faite également par des approches *ex vivo* et *in vivo* qui ont confirmé le caractère agoniste sélectif du FE 201874. Notre étude a permis donc à la caractérisation du premier agoniste sélectif du récepteur V_{1A} chez le rat.

Ce peptide sélectif serait particulièrement utile pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ou pour les études pharmacologiques ayant pour but de mieux comprendre les rôles centraux de ces récepteurs dans les pathologies comportementales et les pathologies liées au stress.

Le récepteur V_{1B}

Cette partie concerne la caractérisation des propriétés pharmacologiques et de marquage de ligands fluorescents dérivés de la d[Leu⁴,Lys⁸]VP, le premier agoniste sélectif du récepteur V_{1B} , en vue d'étudier la distribution centrale des récepteurs V_{1B} chez le rat.

Les résultats obtenus ont montré que les 3 analogues testés sont des agonistes sélectifs V_{1A}/V_{1B} et V_2/V_{1B} et peu si ce n'est pas sélectif OT/ V_{1B} . Leur capacité à marquer les récepteurs V_{1B} en système hétérologue de culture cellulaire et en culture cellulaire primaire a également été évaluée, démontrant que ces ligands fluorescents représentent d'excellents outils pour le marquage et l'étude de la localisation des récepteurs V_{1B} . Ces ligands ont ensuite été utilisés sur coupes fraîches de cerveau de rat pour l'étude de la distribution des récepteurs V_{1B} centraux dans les régions impliquées dans les différents processus comportementaux. Plusieurs sites ont été détectés parmi lesquels l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale, de l'hypothalamus le bulbe olfactif. Enfin, en tenant compte de la nature agoniste de ces ligands fluorescents, l'activation de la voie MAP kinase au niveau des tranches cérébrale a été également mise en évidence.

Ce travail a été soutenu par le programme d'échange Averoès

Mots clés : vasopressine, récepteurs V_{1A} et V_{1B} , ligands fluorescents, Stress, pharmacologie.

Laboratoire de recherche : Institut de génomique fonctionnelle (IGF) – CNRS UMR5203 – INSERM U661 – Université Montpellier 1&2 141 rue de la Cardonille – 34090 MONTPELLIER cedex 05

Nom : MARIR	Nature du diplôme : Doctorat 3 ^{ème} cycle LMD
Prénom : RAFIK	Date de soutenance : 19 septembre 2013
Titre : Caractérisation d'outils pharmacologiques pour l'étude des récepteurs centraux de la vasopressine	
<p>Les neuropeptides tels que la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT), régulent de nombreuses fonctions cognitives et comportementales <i>via</i> une action centrale. En effet, il a été démontré que les récepteurs centraux de l'AVP et de l'OT régulaient l'humeur, l'apprentissage et les désordres affectifs évoluant dans le système limbique.</p> <p>Pour le moment aucun agoniste sélectif n'est disponible pour élucider de façon spécifique les rôles fonctionnels des récepteur V1a centraux chez le rat, un modèle animal des plus utilisé en laboratoire. De même, le rôle du récepteur V1b a été particulièrement souligné mais le manque d'anticorps spécifiques ou de ligands radioactifs sélectifs ne permet pas d'étendre les études plus loin.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Le récepteur V1a : Le FE 201874 est une nouvelle molécule dérivant du F-180 qui est l'agoniste sélectif du récepteur V1a chez l'homme. Dans cette étude, nous avons effectué une caractérisation pharmacologique mutli-approche démontrant que le FE201874 peut combler ce déficit en agoniste V1a chez le rat. <p>Pour cela, nous avons déterminé ses propriétés pharmacologiques et physiologiques dans : plusieurs lignés cellulaires exprimant les récepteurs de la vasopressine et de l'ocytocine (affinité et cascade de couplage au second messenger), un modèle <i>ex vivo</i> (contraction d'anneaux d'aorte de rat) et un modèle <i>in vivo</i> (prolifération de la zone glomérulée du cortex surrénalien et mesure de lactation chez rate lactante).</p> <p>Le FE 201874 a montré une affinité nanomolaire pour le récepteur V1a de rat ; il est hautement sélectif vis à vis des autres récepteurs de la vasopressine. Il se lie également au récepteur de l'ocytocine avec une affinité modérée mais agit cependant comme antagoniste <i>in vitro</i> mais pas <i>in vivo</i>. Du point de vue fonctionnel, le FE 201874 agit comme un agoniste complet avec le récepteur V1a, il est donc le premier agoniste sélectif du rV1a-R.</p> <p>Ce peptide sélectif serait particulièrement utile dans les études pharmacologiques ayant pour but de mieux comprendre les rôles centraux de ces récepteurs dans les pathologies comportementales et les pathologies liées au stress.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Le récepteur V1b : Sur la base des peptides dérivés de la vasopressine précédemment synthétisé par notre équipe, nous avons développé de nouveau ligands sélectifs couplés à des fluorophores choisis pour leurs émissions spectrales et leurs luminosités afin de détecter des niveaux faibles d'expression dans les tissus natifs. <p>L'affinité et le couplage fonctionnel de ces ligands ont été caractérisés. Plusieurs ligands ont montré une forte affinité sélective pour le récepteur V1b mais agissent également comme agoniste complet pour ce même récepteur contrairement au récepteur OT. Les ligands ont été testés par la suite sur culture primaire d'hypophyse de rat exprimant naturellement le récepteur V1b puis sur tranches de cerveau de rat afin de réaliser une cartographie centrale des récepteurs V1b chez le rat.</p> <p>Plusieurs sites ont été détectés au niveau de l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale, de l'hypothalamus et du bulbe olfactif, qui représentent des zones tissulaires importantes connues pour être impliquées dans la régulation du stress, de l'anxiété, de la dépression ou de l'agression.</p> <p>De plus, en tenant compte de la nature agoniste de ces ligands fluorescents, l'activation de la voie MAP kinase au niveau des tranches cérébrale a été mise en évidence. Ainsi, la carte de l'expression <i>in situ</i> des récepteurs V1b en connexion avec leur fonction a été mise en évidence pour la première fois.</p>	
Mots clés : vasopressine, récepteurs V1a et V1b, ligands fluorescents, comportement, pharmacologie.	
Membres du jury	
Président de jury :	BOUSSEBOUA H. <i>Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.</i>
Directeurs de thèse :	MERAIHI Z. <i>Professeur à l'université Constantine 1, Algérie.</i>
Co-directeur de thèse :	GUILLON G. <i>Professeur à l'université Montpellier 2, France.</i>
Examineurs :	CHINI B. <i>Professeur à l'université de Milan, Italie.</i>
	GUERINEAU N. <i>Professeur à l'université d'Angers, France.</i>
	SAKA S. <i>Professeur à l'université Badji M. de Annaba, Algérie.</i>