

Université de Montréal

**Développement d'une méthode de quantification
des varicosités synaptiques et asynaptiques
établies par les neurones dopaminergiques**

Par
Charles Ducrot

Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Master en Neurosciences

Septembre 2015

© Charles Ducrot, 2015

Les neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire compacte (SNc) et de l'aire tegmentaire ventrale (ATV) développent des contacts de type synaptique et non synaptique. Malgré de nombreux travaux sur la synaptogénèse en général, aucune méthode autre que la microscopie électronique, n'a été développée pour quantifier les varicosités synaptiques et asynaptiques issues des neurones DA. L'objectif principal de ce projet était de développer une méthode d'analyse et de quantification des varicosités synaptiques et asynaptiques des neurones DA. L'hypothèse proposée est qu'il devait être possible de détecter la présence de synapses en visualisant la colocalisation d'une protéine présynaptique telle que synaptotagmine 1 (SYT1) avec un marqueur post-synaptique tel que la postsynaptic density protein 95 (PSD95). Pour ce faire, nous avons préparé des cultures primaires de neurones DA à l'aide d'une lignée de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH). Nous avons ensuite visualisé les terminaisons axonales à l'aide de marquages immunocytochimiques de protéines pré et post-synaptiques. L'analyse quantitative des images a été effectuée avec le logiciel de traitement d'image *Image-J*. Nos résultats montrent que, via l'association d'un marqueur présynaptique tel que SYT1 avec un marqueur postsynaptique tel que PSD95, seule une minorité des terminaisons établies par les neurones DA sont de type synaptique. En contraste, des neurones glutamatergiques du cortex, établissent une majorité de terminaisons associées à un marqueur postsynaptique.

Nos résultats valident donc la mise en place d'une technique d'analyse permettant de quantifier la proportion de terminaisons synaptiques et asynaptiques établies par les neurones DA.

Mots clés : Dopamine, Varicosités, Synapses, Protéines d'adhésion, Immunocytochimie

Dopamine neurons (DA) of the Substantia Nigra compacta (SNc) and Ventral Tegmental Area (VTA) are able to develop axon terminals that are either synaptic or non-synaptic in terms of their structure. No method other than electron microscopy was previously developed to quantify synaptic and non-synaptic axonal varicosities established by DA neurons. The main objective of this project was to develop a method for the quantification and analysis of synaptic and non-synaptic terminals established by cultured DA neurons. We hypothesized that synapses should be visualized by the colocalisation of presynaptic proteins such as synaptotagmin 1 (SYT1) and postsynaptic markers like the postsynaptic density protein 95 (PSD95). To perform this, we prepared primary DA neurons cultures from neurons obtained from the ventral mesencephalon of TH-GFP transgenic mice. We then used immunocytochemistry and confocal microscopy to localize markers of the pre and postsynaptic compartments. Images were quantified using the Image-J software.

Our results show that the majority of axon terminals established by DA neurons contain the presynaptic marker SYT1. However, only a minority are associated with the postsynaptic marker PSD95, compatible with previous *in vivo* results. In comparison, glutamatergic neurons from the cortex establish a majority of terminals associated with a postsynaptic marker.

Our results validate the establishment of an experimental strategy allowing quantification of the proportion of synaptic and non-synaptic contacts established by DA neurons, a technique that we plan to use to explore the molecular mechanisms of synapse formation by these neurons.

Keywords : Dopamine, Synapses, Adhesion proteins, Immunocytochemistry

Table des matières

I – Introduction..... p 9

- 1) Préambule
- 2) Le système dopaminergique
 - Généralités
 - Caractéristiques des neurones dopaminergiques
- 3) Les protéines intervenant dans la formation des synapses

II – Matériels et méthodes..... p 20

- 1) Préparation des cellules
- 2) Immunocytochimie
- 3) Acquisitions et analyses
 - Principe de la microscopie confocale
 - Acquisition des images
 - Traitement et analyses des images

III – Résultats p 30

IV – Discussion et perspectives..... p 35

- Les varicosités synaptiques et asynaptiques des neurones DA sont fonctionnelles
- Les neurones DA sont très majoritairement asynaptiques par rapport aux neurones glutamatergiques du cortex
- Le phénotype des neurones DA de la SNc est potentiellement dépendant des conditions expérimentales
- Le caractère majoritairement asynaptique des neurones DA de la SNc est-il un des facteurs de vulnérabilité dans la maladie de Parkinson ?

V – Bibliographie..... p 42

Liste des figures

Figure 1..... p 10

Figure 2..... p 12

Figure 3..... p 12

Figure 4..... p 18

Figure 5..... p 24

Figure 6..... p 27

Figure 7..... p 29

Figure 8..... p 31

Figure 9..... p 32

Figure 10..... p 33

Figure 11..... p 34

Figure 12..... p 36

Liste des sigles

AMPA : Alpha-Amino-3-hydroxy-5-Méthylisoazol-4-Propionate

ATV : Aire Tegmentaire Ventrale

CPF : Cortex Préfrontal

DA : Dopamine

D1 : Récepteur Dopaminergique de type 1

D2 : Récepteur Dopaminergique de type 2

EPSC : Courant Excitateur Postsynaptique

Glu : Glutamate

GFP : Green Fluorescent Protein

IPSC : Courant Inhibiteur Postsynaptique

MEM : Minimum Essential Medium

MPP+ : 1-méthyl-4-phenylpyridium

NAc : Noyau Accumbens

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Paraformaldéhyde

PSD95 : Protéine Postsynaptic Density 95

PTP : Protéine Tyrosine Phosphatase

qPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative

ROS : Espèces oxygénées réactives

RT : Transcriptase Inverse

SD : Striatum Dorsal

shRNA : short hairpin Ribonucleic acid

SNC : Substance Noire compacte

SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptor

SYT1 : Synaptotagmine 1

SV : Striatum Ventral

TH : Tyrosine Hydroxylase

Trk : Récepteur à Tyrosine Kinase

VGAT : Transporteur Vésiculaire du GABA

VGluT1 : Transporteur Vésiculaire du Glutamate de type 1

VGluT2 : Transporteur Vésiculaire du Glutamate de type 2

VMAT : Transporteur Vésiculaire des Monoamines

I- Introduction

1) Préambule

Depuis longtemps le système dopaminergique est la cible de nombreuses études afin de mieux comprendre son rôle tant sur le plan physiologique que pathologique.

La découverte de la dopamine chez les mammifères remonte au milieu du 20^e siècle avec les travaux du Dr Arvid Carlsson en 1958 et la mise en évidence de la présence de dopamine dans le cerveau de lapin. Aussi, il a été démontré que la dopamine, neurotransmetteur de la famille des monoamines, intervient dans des fonctions essentielles à l'homme telles que la motricité, la motivation ou encore la recherche de récompense (Fibiger et al., 1986). En plus d'être un précurseur de la noradrénaline (Holtz et al., 1939), la dopamine est un neurotransmetteur impliqué dans des pathologies très répandues comme la maladie de Parkinson, la toxicomanie ou encore la schizophrénie.

2) Le système dopaminergique et ses caractéristiques

- **Généralités**

Le système dopaminergique prend ses origines dans cinq grandes structures qui sont l'aire tegmentaire ventrale (ATV), la substance noire compacte (SNc), le bulbe olfactif, la rétine et l'hypothalamus (Carlsson et al., 1962). Cependant, la très grande majorité des neurones dopaminergiques proviennent du mésencéphale ventral, structure regroupant l'ATV et la SNc. Les neurones dopaminergiques issus de l'ATV projettent vers deux régions

anatomiques qui sont le noyau accumbens (NAc) et le cortex préfrontal (CPF) donnant lieu respectivement à la voie mésolimbique et mésocorticale. Ces deux voies interviennent dans la récompense, la motivation et l'apprentissage (Fibiger et al., 1986). Quant aux neurones dopaminergiques issus de la SNc, ils projettent majoritairement vers le striatum dorsal donnant lieu à la voie nigro-striée. Cette dernière est impliquée dans la motricité volontaire, en régulant l'activité des ganglions de la base par les récepteurs dopaminergiques de type D1 (voie directe) et de type D2 (voie indirecte) (Lanciego et al, 2012).

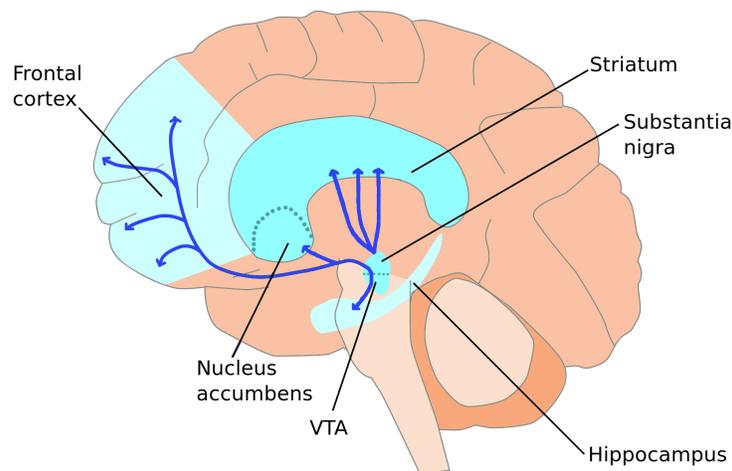


Figure 1 - Anatomie du système dopaminergique chez l'homme. Distribution des noyaux dopaminergiques et leurs aires de projections (Adapté de Gerra, 2007).

- **Les caractéristiques principales des neurones DA**

Les neurones dopaminergiques ont des caractéristiques bien précises leur conférant une spécificité au niveau phénotypique.

Une première caractéristique importante des neurones dopaminergiques est qu'ils développent une arborisation axonale très complexe avec de très nombreuses terminaisons (Matsuda et al, 2009).

Aussi, de précédentes études ont démontré, à l'aide de la microscopie électronique que les projections issues des neurones dopaminergiques pouvaient être de type synaptique ou asynaptique. Les premiers travaux montrant que certaines populations neuronales étaient capables de développer deux types de varicosités remontent au milieu des années 70 avec les études de Descarries et al, ayant étudié et découvert que les neurones noradrénergiques et sérotoninergiques chez le rat développaient des terminaisons asynaptiques (Descarries et al, 1975). Par la suite, cette observation a été rapportée dans l'ensemble du système monoaminergique incluant le système dopaminergique. Les terminaisons asynaptiques, appelées aussi varicosités libres, ont été caractérisées par les trois critères suivants : **1)** l'absence de densité post-synaptique, **2)** une circonférence supérieure par rapport aux varicosités synaptiques ainsi que **3)** l'absence de fente synaptique. Le fait que les varicosités non-synaptiques représentent environ 70% des varicosités dopaminergiques totales dans le striatum dorsal de rat (Descarries et al, 2008), souligne ainsi le caractère majoritairement asynaptique des neurones dopaminergiques du mésencéphale ventral. Cependant, la possibilité de développer des contacts asynaptiques n'est pas unique au système dopaminergique puisque l'ensemble des neurones monoaminergiques est capable, en plus des varicosités synaptiques, de développer ce type de terminaisons libres (Descarries et al, 1977).

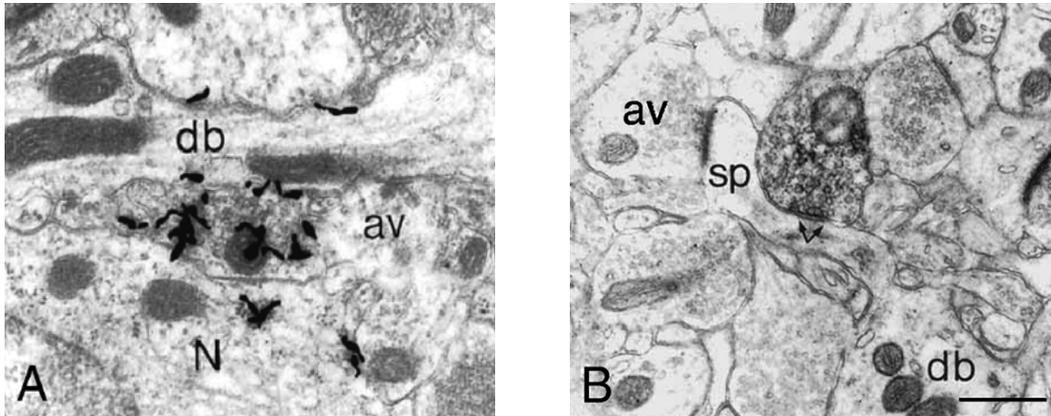


Figure 2 – Images représentant une varicosité asynaptique (A) et synaptique (B). **av**: vésicule synaptique ; **sp** : épine dendritique ; **db** : branche dendritique (Descarries et al., 2008).

Une autre caractéristique importante des neurones DA de la voie méso-limbique est la présence du transporteur vésiculaire au glutamate du type 2 (VGLUT2) au niveau de certaines des terminaisons synaptiques de ces neurones. Les travaux de *Fortin et al.*, en 2012 ont permis de démontrer que ce transporteur permettait la libération de glutamate par les neurones dopaminergiques mais aussi que cette protéine est importante pour la survie et la croissance des neurones DA l'exprimant.

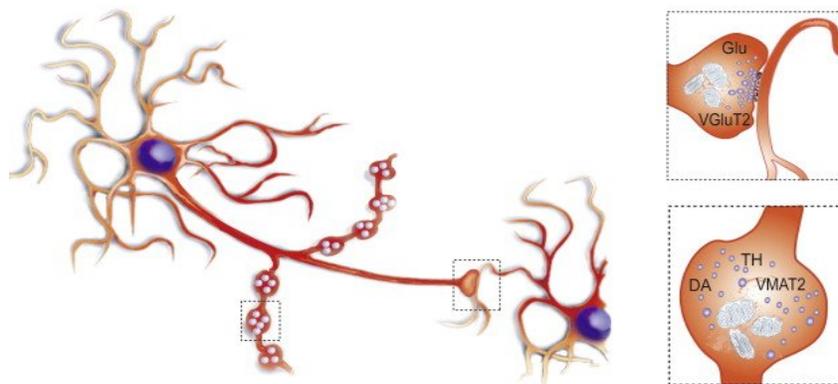


Figure 3 – Représentation schématique de varicosités synaptiques et asynaptiques développées par les neurones DA (Descarries et al, 2012) – Glu: Glutamate, VMAT2: Transporteur Vésiculaire aux Monoamines, TH: Tyrosine Hydroxylase (Trudeau et Gutierrez, 2007)

Enfin, une quatrième et dernière caractéristique des neurones DA mise au jour récemment est que certains neurones DA issus du mésencéphale ventral sont capables de co-libérer de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Les premiers travaux remontent en 2010 et ont montré que les neurones DA issus de la rétine de souris sont capables de libérer du GABA (Hirasawa et al., 2012). Cependant et contre toute attente, la libération de ce neurotransmetteur inhibiteur ne serait pas dépendante du transporteur vésiculaire du GABA (VGAT), qui ne semble pas être exprimé par les neurones DA adultes. Des études passées avaient démontrés que le transporteur VGAT est le seul connu pouvant transporter et emballer le GABA au sein de vésicules synaptiques mettant ainsi en avant son rôle fondamental dans la transmission GABAergique (Wojcik et al., 2006). En effet, les travaux de Tritsch et al., publiés en 2011, ont mis en avant qu'un knock-out (KO) conditionnel de VGAT spécifique aux neurones DA n'affecte en rien les courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) enregistrés dans les neurones du striatum. Cependant un traitement pharmacologique avec un antagoniste de VMAT2, la réserpine, diminue de façon significative les IPSC évoqués dans les neurones striataux par la stimulation des axones dopaminergiques, alors qu'un traitement pharmacologique avec un antagoniste de VGAT n'a eu aucun impact. Ces auteurs ont donc proposé que les neurones DA du mésencéphale ventral emmagasineraient le GABA via le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2, ce qui peut paraître surprenant.

3) Développement des synapses et protéines impliquées

L'observation que les neurones DA établissent deux types de terminaisons axonales avec une structure soit synaptique ou asynaptique soulève une question importante : qu'est ce qui explique au point de vue moléculaire que ces neurones soient capables d'une telle

diversité structurelle ? Egalement, pourquoi les autres types de neurones dans le cerveau, tels que les neurones glutamatergiques ou GABAergiques ne forment pas de terminaisons asynaptiques ? Afin d'aborder cette question, il convient de considérer les mécanismes connus de formation des synapses dans le système nerveux.

D'une façon générale, le développement, la maturation et le maintien des synapses font intervenir plusieurs grandes familles de protéines dont les plus importantes sont les neurexines, les neuroligines, les protéines tyrosine phosphatase (PTP) et les récepteurs à tyrosine kinase (TrK). Ces protéines dites d'adhésions ont un rôle fondamental dans la formation et le fonctionnement des synapses (Scheiffele et al., 2000 ; Takahashi et al., 2011).

- **Les neurexines**

La neurexine est une protéine présynaptique qui comporte trois isoformes, chacune exprimée sous deux promoteurs différents, alpha et bêta (Ullrich et al., 1995). Certaines isoformes, comme la neurexine 1 et 3, sont exprimées majoritairement aux synapses excitatrices. En revanche, l'isoforme de la neurexine 2 est principalement retrouvée aux synapses inhibitrices (Ben Chih et al., 2005). De précédents travaux ont démontrés leur rôle dans le développement des synapses excitatrices et inhibitrices. Ces études ont montré que l'expression des neurexines par des cellules non neuronales, issues de fibroblastes rénaux de singe (cellules COS), en contact avec des neurones issus de l'hippocampe induisait l'agrégation de la protéine postsynaptic density 95 (PSD95) et de la géphyrine (qui sont des marqueurs postsynaptiques des synapses excitatrices et inhibitrices respectivement). Autrement dit, la neurexine située sur la terminaison synaptique, participerait via des interactions transynaptique à la mise en place de protéines post synaptiques essentielles

pour le fonctionnement de la synapse (Graf Er et al., 2004). Les neurexines interagissent avec des protéines postsynaptiques, les neuroligines, qui comprennent trois isoformes, les neuroligines 1, 2 et 3 (Ben Chih et al., 2005).

- **Les neuroligines**

Majoritairement, les isoformes 1 et 3 des neuroligines interagissent avec les neurexines 1 et 3 ce qui fait que ces protéines sont principalement retrouvées au niveau des synapses excitatrices. L'isoforme 2 de la neuroligine, interagit plus facilement avec la neurexine 2 et est retrouvée en plus grande abondance aux synapses inhibitrices. Les travaux de Ben Chih et al., en 2005 ont démontré que les neuroligines étaient fondamentales pour la formation des synapses excitatrices et inhibitrices. En effet, des *short hairpin* RNA (shRNA) dirigés contre les trois isoformes des neuroligines diminuent fortement l'expression de marqueurs présynaptiques comme le transporteur au glutamate de type 1 (VGluT1) ou VGAT ainsi que des marqueurs postsynaptiques tel que la sous-unité GluR1 du récepteur alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA). Cette étude a également démontré que la densité des épines dendritiques était fortement diminuée après l'utilisation de shRNA dirigés contre les neuroligines. Ces données suggèrent ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines neuroligines 1, 2 et 3 porte atteinte à la formation des synapses.

- **Les protéines tyrosine phosphatase et le récepteur à tyrosine kinase**

Cette famille de protéine regroupe deux isoformes, la PTP-Sigma (PTP- σ) et la PTP-Delta (PTP- Δ) ayant chacune un rôle bien particulier au sein des neurones. La protéine PTP- Δ , est exprimée uniquement en présynaptique et est impliquée préférentiellement dans le guidage

et la croissance axonale (pour revue, Ji Won Um et al., 2013). En revanche la protéine PTP- σ est exprimée exclusivement de façon présynaptique et les travaux récents de Takahashi *et al.* en 2011, ont montré qu'elle était spécifiquement impliquée dans le développement et le fonctionnement des synapses excitatrices. En effet des co-cultures de cellules COS exprimant PTP- σ sont en mesure d'induire un regroupement de la sous-unité NR1 du récepteur N-méthyl D-aspartate (NMDA) et de PSD95 sur les dendrites en contact avec ces cellules neuronales. En revanche, aucune induction de l'agrégation de la géphyrine n'a été observée. La protéine PTP- σ , participerait donc à la fonctionnalité post-synaptique uniquement des terminaisons excitatrices. Egalement, cette étude a démontré que PTP- σ interagissait principalement avec les récepteurs à tyrosine kinase de type C (TrKC). Cependant, d'autres récepteurs comme nétrine G ligand 3 (NGL-3) et la protéine Slit Trk-Like protéine (Slitrk) interagissent aussi avec PTP- σ (pour revue, Ji Won Um et al., 2013).

- **Les protéines d'échafaudage**

Enfin, une dernière famille de protéines, appelée protéines d'échafaudage permet le maintien de l'ensemble des protéines impliquées dans les interactions synaptiques entre les neurones. Ces protéines d'échafaudage sont retrouvées aussi bien dans la partie présynaptique que postsynaptique et contiennent un domaine bien particulier qui est le domaine *Post synaptic density*, *Drosophila disc large tumor suppressor*, et *Zonula occludens* ou domaine PDZ.

Ce n'est que dans les années 1990 que les premiers travaux ont démontré que les protéines à domaine PDZ tel que la protéine postsynaptic density 95 (PSD95) étaient

impliquées dans la formation, le maintien et le fonctionnement des synapses (Cho KO et al., 1992)

Au niveau présynaptique, on retrouve la protéine calmoduline - dépendant serine kinase (CASK) jouant un rôle dans le maintien et l'organisation des synapses. Ces protéines CASK possèdent un domaine PDZ permettant d'interagir directement avec des protéines membranaires impliquées dans la formation et le fonctionnement des synapses (telle que les neurexines) mais aussi avec les filaments d'actine composant le cytosquelette. Egalement mais de façon indirecte et toujours via le domaine PDZ, les protéines CASK interagissent avec les vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs (Cho KO et al., 1992).

Dans la partie postsynaptique on retrouve majoritairement 2 protéines d'échafaudage impliquées dans le maintien et le fonctionnement des synapses. Là aussi les domaines PDZ permettent une interaction entre les protéines porteuses de ce domaine et des protéines membranaires comme des récepteurs ou des canaux ioniques. La première est la protéine PSD95 retrouvée uniquement aux synapses excitatrices. La seconde, la protéine géphyrine, est exprimée uniquement aux synapses inhibitrices.

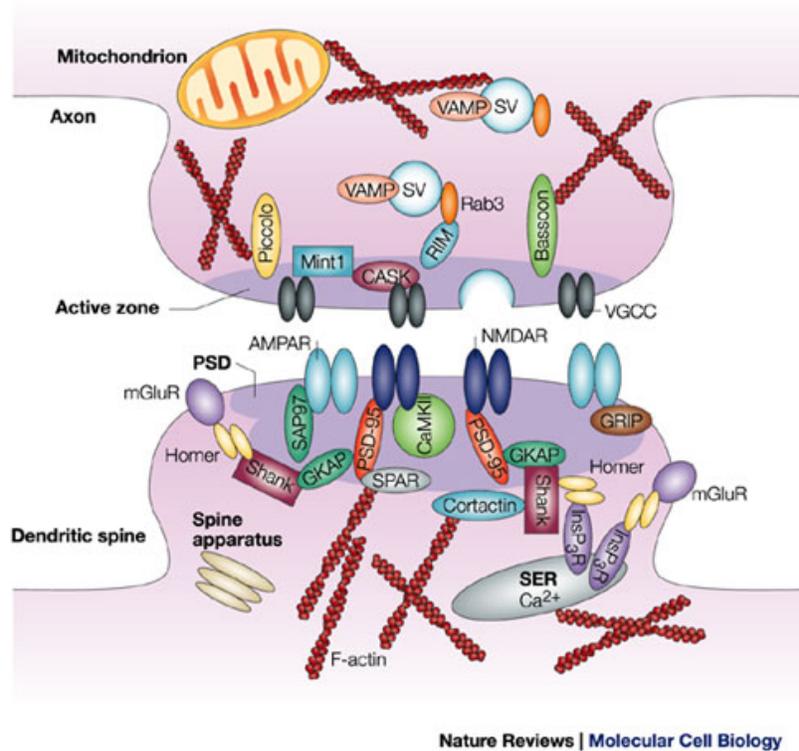


Figure 4 – Organisation moléculaire d’une synapse excitatrice - La partie présynaptique correspondant à la terminaison axonale et la partie postsynaptique correspondant à l’épine dendritique (Zheng Li et al, 2003)

Malgré de nombreux travaux sur la synaptogénèse en général, aucune étude ne s’est spécifiquement intéressée au développement des contacts synaptiques et asynaptiques des neurones dopaminergiques. Egalement, et à ce jour, aucune méthode autre que la microscopie électronique, une approche très exigeante en terme de temps, n’a été développée pour quantifier les varicosités synaptiques et asynaptiques issus des neurones dopaminergiques.

Ainsi, sur la base de ces informations l’objectif principal de ce projet était de développer une méthode d’analyse et de quantification des varicosités synaptiques et

asynaptiques des neurones dopaminergiques. L'hypothèse proposée est qu'il devait être possible de détecter la présence de synapses en visualisant la colocalisation d'une protéine présynaptique telle que synaptotagmine 1 (SYT 1) avec un marqueur postsynaptique tel que PSD95 dans le cas des synapses excitatrices ou avec géphyrine dans le cas des synapses inhibitrices. Par ailleurs, dans le cas des synapses excitatrices, la colocalisation de VGluT2 avec PSD95 devrait aussi permettre d'identifier les synapses excitatrices.

Pour aborder cette problématique et tester notre hypothèse, nous avons mis au point une méthode d'analyse et de quantification des contacts synaptiques et asynaptiques à l'aide d'un modèle de neurones dopaminergiques de souris *in vitro* et de marquages immunocytochimiques pré, post-synaptiques. Pour l'analyse quantitative des images, nous avons pris avantage du logiciel de traitement d'image *Image-J*. La mise au point de cette méthode de quantification des varicosités permettra par la suite d'étudier les protéines impliquées dans le développement, la formation et le maintien des synapses dopaminergiques.

Egalement, nous avons comparé la diversité phénotypique des varicosités issues des neurones DA du mésencéphale avec une population de neurones glutamatergiques issus du cortex préfrontal (CPF), une population qui est connue pour être exclusivement synaptique.

II - Matériels et Méthodes

1) préparation des cellules

a - Animaux

Lors de cette étude, des souris transgéniques de la souche TH-GFP ont été utilisées. Il s'agit d'une lignée dans laquelle les neurones DA expriment la protéine *Green Fluorescent Protein* GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (TH). Les animaux ont été hébergés en cage collective dans une animalerie dont le taux d'humidité, la température, les cycles jour/nuit ont été contrôlés (40%, 21°C, 12h, respectivement) et ont eu un accès illimité à l'eau et à la nourriture. Toutes les expérimentations ont été effectuées en accord avec le guide de protection et d'utilisation des animaux expérimentaux ainsi que par le comité de déontologie sur l'expérimentation avec les animaux de l'Université de Montréal.

b - Culture cellulaires

Des souris TH-GFP âgées entre les jours postnataux 0 et 2 (P0 et P2) ont été utilisées pour effectuer des cultures primaires de neurones dopaminergiques.

- **Préparation des cellules gliales**

Dans un premier temps des animaux TH-GFP ont été anesthésiés sur glace puis les cerveaux ont été extraits. Un bloc de tissu cortical a été disséqué puis les cellules ont été dissociées à l'aide d'une solution de papaïne. Par la suite, une trituration mécanique a permis d'obtenir des cellules individuelles. Une fois la dissociation faite, la suspension cellulaire a étéensemencée avec une solution de *minimum essential medium* (MEM) pendant 24h. Puis,

les cellules ont subi un passage à froid dans le but de garder uniquement les cellules gliales. Ces dernières ont été mises en flasque avec une solution de MEM chaud puis transférées dans l'incubateur pour une période comprise entre 5 et 7 jours avant d'être déposées sur les lamelles à une concentration de 100 000 cellules/mL. Une fois les cellules gliales arrivées à confluence, les lamelles étaient prêtes à recevoir les neurones DA.

- **Préparation des neurones DA**

Dans un second temps, une seconde série de souris TH-GFP âgées entre P0 et P2 ont été utilisées pour préparer les cultures primaires de neurones DA. Les animaux TH-GFP ont été anesthésiés sur glace puis les cerveaux ont été extraits. L'ATV et la SNc ont été disséqués, puis les cellules ont été dissociées à l'aide d'une solution de papaïne. Il en a été de même pour le striatum ventral et dorsal. Par la suite les neurones TH-GFP positifs ont été purifiés par tri cellulaire automatisé. Ces neurones DA purifiés, issus de l'ATV et de la SNc, ont été mis en co-culture sur des lamelles recouvertes de glie, respectivement avec des neurones du striatum ventral (SV) ou des neurones du striatum dorsal (SD) dans le but de favoriser le développement de leurs terminaisons axonales. L'ensemble des co-cultures neuronales ont été préparées à faible densité (5000 cellules/mL pour les neurones DA et 60 000 cellules/mL pour les neurones striataux) afin de mieux visualiser les terminaisons axonales en limitant leur superposition. Les cultures ont ensuite été placées dans un incubateur (37°C ; 5% de CO2 et 95% d'humidité) pendant une période allant de 3 à 14 jours suivant les expérimentations.

- **Préparation des neurones corticaux**

Des cultures primaires de neurones corticaux ont été préparées afin de comparer les neurones DA à une population de neurones purement synaptiques. Dans une première étape, nous avons vérifié que ce type de culture contient majoritairement (plus de 80%) des synapses positives pour le transporteur vésiculaire du glutamate de type 1 (VGluT1). Des souris TH-GFP âgées entre P0 et P2 ont été utilisées pour préparer les cultures primaires de neurones corticaux. Les animaux TH-GFP ont été anesthésiés sur glace puis les cerveaux ont été extraits. Le cortex a été disséqué, puis les cellules ont été dissociées à l'aide d'une solution de papaïne. Par la suite les cellules ont été déposées sur des lamelles préalablement recouvertes de cellules gliales à une densité de 5000 cellules/mL. Les cultures ont ensuite été placées dans un incubateur (37°C ; 5% de CO₂ et 95% d'humidité) pendant une période allant de 3 à 14 jours suivant les expérimentations.

2) Immunocytochimie

A partir des co-cultures (ATV/SV et SNc/SD) des immunocytochimies ont été effectuées dans le but de localiser et quantifier la présence de marqueurs dopaminergiques comme la TH, en compagnie de marqueurs présynaptiques comme le transporteur vésiculaire du glutamate (VGluT2), (SYT1) et de marqueurs post-synaptiques comme PSD95 et la géphyrine.

Après une période allant de 3 à 14 jours de culture, les neurones ont été fixés avec une solution de paraformaldéhyde à 4% contenant 4% de sucrose (PFA) pendant 20min. Puis les lamelles contenant les cultures ont été rincées au salin tamponné au phosphate (PBS) (3x5 min sous agitation) et mises en présence de triton 0.1%, pendant 20 minutes. Par la suite, les

neurones ont été placés dans une solution de blocage, pendant 10 minutes et finalement incubés avec une solution contenant le(s) anticorps primaire(s), spécifiques aux protéines d'intérêts. Dans cette étude nous avons utilisé un anticorps anti-GFP (Anti poulet ; 1 : 2000 ; *Abcam*) ; anti-synaptotagmine I (Anti lapin ; 1 : 1000 ; *Synaptic Systems*) ; anti-PSD95 (Anti souris ; 1 : 2000 ; *Pierce*) ; anti-SV2 (1 : 1000) ; anti-VGluT2 (Anti lapin ; 1 : 5000 ; *Synaptic Systems*) et anti-VGluT1 (Anti cochon d'inde ; 1 : 5000 ; *Millipore*).

Après avoir été incubées avec l'anticorps primaire, les lamelles ont été rincées au PBS et placées dans une solution contenant l'anticorps secondaire anti-espèce (Alexa 488 anti-poulet, Alexa 546 anti souris et Alexa 647 anti lapin ; 1 : 500 ; *Molecular Probes*) pendant 1h. Enfin, 3 rinçages au PBS et 2 rinçages à l'eau ultra pure de 5min chacun ont été effectués, puis les lamelles ont été montées sur lame non gélatinée à l'aide d'un milieu de montage Fluoromont-G (*Southern-Biotech*).

3) Acquisition et analyses des images

L'objectif principal de cette étude était de mettre au point une méthode d'analyse et de quantification des terminaisons asynaptiques et synaptiques des neurones DA.

Pour cela nous avons utilisé la microscopie confocale et le logiciel de traitement d'image *Image-J*.

a)- La microscopie confocale

Le principe du microscope confocal a été décrit pour la première fois dans les années 1950 mais ce n'est qu'en 1980 que les premiers modèles de microscopes sont apparus.

La microscopie confocale a été développée pour faire face aux limites de la microscopie optique classique. En effet, lors d'une acquisition d'image avec un microscope optique classique à partir d'une préparation présentant des différences de profondeur, l'image qui en résultera sera au foyer qu'à certains endroits. Pour pallier à cela, le microscope confocal permet d'effectuer des acquisitions dans un seul plan focal tout en excluant physiquement le signal hors foyer. Cela est dû au *pinhole* (trou d'aiguille) qui permet de récupérer uniquement la lumière émise par le plan focal voulu. Egalement, l'un des autres avantages de la microscopie confocale est qu'elle utilise principalement la lumière de lasers, qui sont une source de lumière dit « plus focalisable » que la lumière blanche classique.

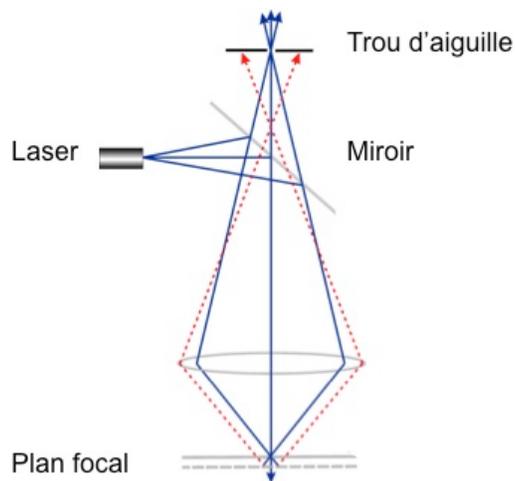


Figure 5 - Schéma représentant le principe de la microscopie confocale (Adapté de <http://li155-94.members.linode.com/myscope/confocal/confocal/>).

b) Acquisitions des images

Les images ont été acquises avec un microscope confocal (FV 1000 de Olympus) équipé d'un objectif 60X à immersion à l'huile. Toutes les images ont été acquises en choisissant visuellement une région émanant de neurones individuels et représentant

clairement un segment d'arborisation axonale (prolongement de diamètre fin et uniforme, décoré d'une série de varicosités). Pour chaque culture neuronale, un seul champ de terminaisons par neurone a été pris au hasard en visualisant le signal GFP. Les autres marqueurs tels que PSD95, VGlut2 et SYT1 n'ont pas été pris en compte dans le choix du champ de terminaisons. Une moyenne de 6 champs a été prise pour chaque lamelle. Pour chaque champ de terminaison sélectionné une seule acquisition a été effectuée. Des images d'une résolution de 2048X2048 pixels ont été capturées de façon séquentielle pour chaque marqueur (GFP, Vglut2 et PSD95).

C) Traitement et analyse des images

- **Procédure d'analyse**

Après avoir réalisé l'ensemble des acquisitions, chaque champ de terminaisons neuronales a été analysé avec le logiciel de traitement d'image *Image-J*.

Dans un premier temps, les critères permettant de définir et sélectionner les varicosités (synaptiques ou non) ont été définis pour chaque champ. Les critères principaux ont été **1)** un seuil permettant d'avoir le meilleur rapport signal-bruit, **2)** le nombre minimum et maximum de pixels regroupé en amas ainsi que **3)** la circularité de la varicosité dont la valeur est comprise entre 0,0 à 1,0 et où 1 représente une circularité parfaite. La circularité de la varicosité est dépendante de l'organisation des pixels regroupés en amas. L'ensemble de ces critères a été strictement identique pour chaque champ de terminaisons pris sur une lamelle et appartenant à une même culture. Chaque lamelle d'une même culture a été

immunomarquée avec la même solution d'anticorps primaires et secondaires. Par la suite, l'ensemble des champs de terminaisons a été analysé l'un après l'autre avec le logiciel *Image-J*.

Dans un souci de gain de temps, d'efficacité et de minimisation des erreurs, l'ensemble des acquisitions a été analysé au moyen d'une macro préalablement réalisée sur le logiciel *Image-J*. Pour chaque image, les critères préalablement définis ont été appliqués.

- **Exemple d'une analyse pour le signal GFP**

Pour chaque champ de terminaison, la première analyse consistait à extraire et quantifier le signal GFP correspondant spécifiquement aux varicosités tout en minimisant la sélection de signal non spécifique. Le logiciel *Image-J* permet ainsi de créer un masque ne sélectionnant que les signaux voulus.

Dans la figure 6 ci-dessous, il est possible de constater que l'image brute montre un segment d'arborisation axonale dopaminergique contenant un ensemble de varicosités (synaptique ou non). La création d'un masque de sélection superposé sur l'image originale (image B, en rouge) rend compte de la sélection très précise du signal correspondant spécifiquement à des varicosités dopaminergiques. Cette stratégie permet de sélectionner avec une grande précision le signal voulu.

Après l'analyse de ce champ, le logiciel *Image-J* a sélectionné 79 varicosités sur le signal brut. Un comptage manuel a révélé un nombre total de 82 varicosités sur le signal brut. La marge d'erreur était donc de +/-3.7%.

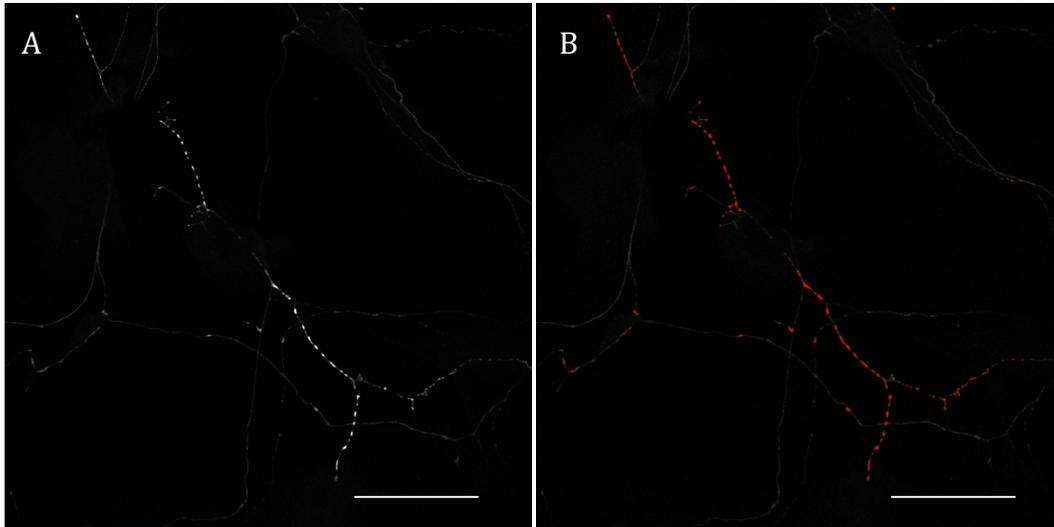


Figure 6 – Immunomarquage GFP correspondant à un segment de l’arborisation axonale d’un neurone dopaminergique issu de la SNc. **A** : Signal brut après l’acquisition au microscope confocal. **B** : Sélection du signal correspondant aux varicosités après avoir défini les critères de sélection à l’aide du logiciel *Image-J*. Echelle = 100 μ m

La suite de l’analyse consistait à déterminer combien de ces varicosités sélectionnées par *Image-J* colocalisaient avec le signal correspondant aux marqueurs pré et post synaptiques. Une analyse dans Excel nous permettra ensuite de calculer un pourcentage de varicosités immunopositives pour un marqueur présynaptique, post synaptique ou les deux réunis.

- **Problèmes rencontrés**

Durant l’analyse des acquisitions, le principal problème était de déterminer le meilleur rapport signal bruit ainsi que les critères permettant de garder le plus possible de signal spécifique. Les acquisitions pour l’immunomarquage dirigé contre PSD95 étaient les plus complexes à traiter puisque le bruit de fond généré par l’anticorps primaire était important.

Dans la figure 7, ci-dessous, l'immunomarquage correspond au signal PSD95. L'image A correspond au signal brut où il est possible de visualiser l'expression de PSD95 au niveau des épines dendritiques d'un neurone recevant des contacts synaptiques. L'image B représente la sélection générée par le masque (jaune) dans le logiciel *Image-J*. Il est facile de constater que la sélection réalisée par le masque correspond à du signal spécifique mais aussi à une grande majorité de signal non spécifique. La difficulté était donc de ne garder que le signal correspondant au signal PSD95 spécifique et regroupé au sein de structures qui sont vraisemblablement des densités postsynaptiques. Dans l'image C, après avoir appliqué les critères de sélection pour une densité postsynaptique exprimant PSD95, on peut constater que l'ensemble du signal non spécifique a été exclu. Ceci est principalement dû au fait que le signal non-spécifique était retrouvé dans des structures de très petite taille, exclues par nos critères de sélection, alors que le signal spécifique était retrouvé dans des structures de plus grande taille. Les critères de sélection pour le signal PSD95 étaient **1)** une valeur de circularité de 0.2 ainsi que **2)** un nombre minimum de 10 pixels regroupés en amas et **3)** un nombre maximal de 1000 pixels regroupés en amas.

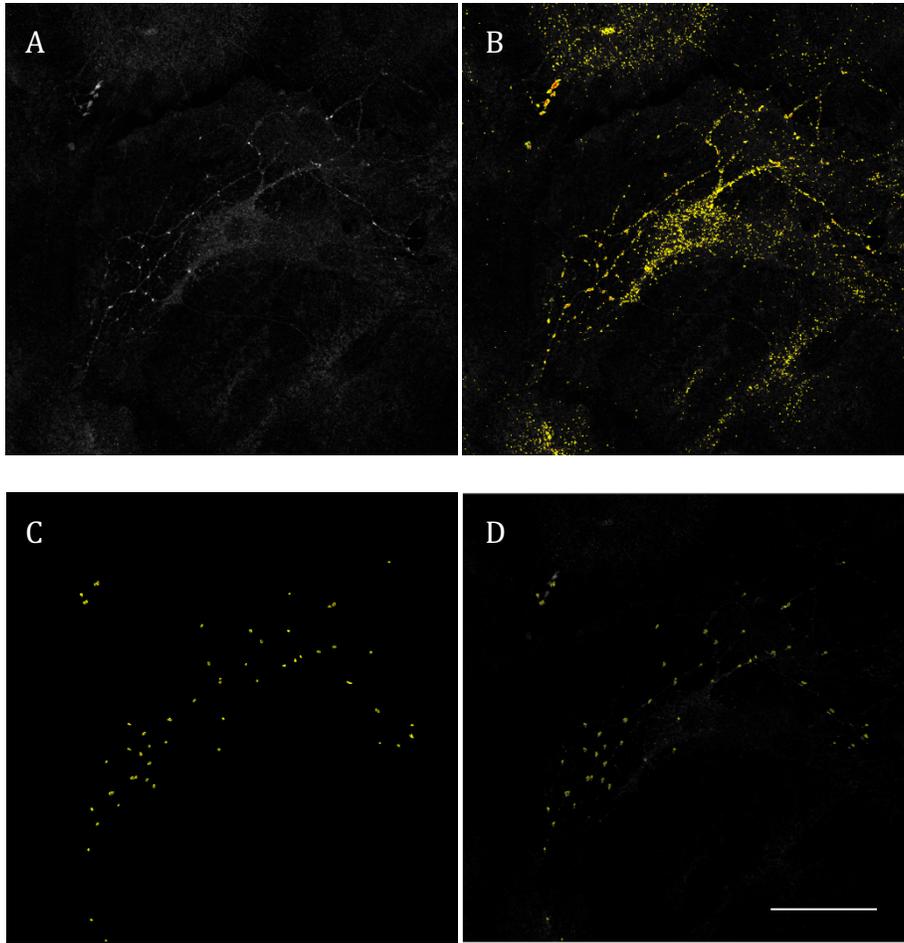


Figure 7 – Exemple de sélection d'un marquage synaptique PSD95 après avoir défini les critères de sélection des densités post-synaptiques présumées. **A** : acquisition originale de l'immunomarquage PSD95 ; **B** : masque généré par le logiciel Image-J ; **C** : Extraction du signal correspondant uniquement à celui de PSD95 ; **D** : Superposition du masque PSD95 sur l'acquisition originale. Echelle = 250 μ m

L'analyse des acquisitions pour les marqueurs VGluT2 et SYT1 a été strictement identique à celle de PSD95. Les paramètres déterminés permettaient de sélectionner un maximum de signal spécifique et un minimum de signal non spécifique.

III – Résultats

A partir des co-cultures (ATV/SV) ; (SNc/SD) et des cultures de neurones issus du CPF, des immunocytochimies ont été effectuées dans le but de quantifier les varicosités synaptiques et non synaptiques des neurones DA puis de comparer l'ensemble avec une population neuronale que la littérature rapporte comme purement synaptique, les neurones glutamatergiques du cortex préfrontal (CPF).

Les résultats obtenus et présentés dans la figure 8A montrent un marquage GFP ponctiforme et régulier signifiant la présence de varicosités au niveau d'une fibre axonale d'un neurone DA issu de l'ATV. De plus, l'immunomarquage dirigé contre la protéine SYT1, montre un marquage régulier ponctiforme co-localisant à 80% avec le signal GFP presque parfaitement. Cela suggère que la grande majorité des varicosités axonales sont bien des terminaisons axonales ayant à tout le moins une partie de la machinerie protéique essentielle à la libération des neurotransmetteurs par exocytose. Egalement dans la figure 8A, il est possible de voir que l'immunocytochimie dirigée contre le marqueur post-synaptique PSD95 colocalise plus faiblement avec les signaux GFP et SYT1, suggérant que seule une partie des terminaisons dopaminergiques sont synaptiques, du moins pour ce qui est des marqueurs des synapses excitatrices.

En comparaison, les immunomarquages obtenus sur les neurones glutamatergiques issus du CPF (figure 8B) montrent que le marqueur présynaptique VGluT1 est régulier et de

type ponctiforme. L'analyse visuelle montre que le signal VGluT1 colocalise de façon presque parfaite avec le marqueur présynaptique SYT1 et postsynaptique PSD95.

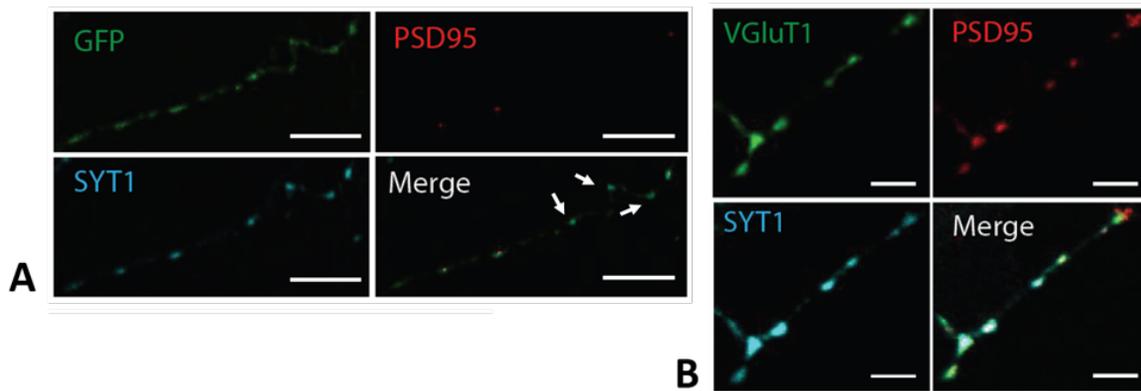


Figure 8 – Immunomarquage GFP, PSD95 et SYT1 au niveau d'un segment axonal dopaminergique issu de l'ATV (A) et d'un segment axonal glutamatergique issu du cortex préfrontal (B) – Echelle: Figure 7A = 25 μ m ; Figure 7B = 10 μ m

L'ensemble de ces résultats a été quantifié de façon précise pour chaque population neuronale en fonction du temps de culture (figures 9 à 11).

Dans un premier temps, les résultats obtenus pour les neurones DA issus de l'ATV (Figure 9) révèlent qu'après 3 jours de culture, 60% des varicosités identifiées avec le signal GFP colocalisent avec l'immunomarquage SYT1. Aussi cette colocalisation, entre les signaux GFP et SYT1, évolue de façon positive en fonction du temps. Après 7 jours de culture le signal GFP colocalise à près de 70% avec le signal SYT1, puis à 90% après 14 jours *in vitro*. Les résultats obtenus montrent par ailleurs que certaines des varicosités issues des neurones DA de l'ATV colocalisent avec le marqueur postsynaptique PSD95, ce qui évolue en fonction du temps. Après 3 jours de culture, environ 5% des varicosités issues des neurones DA de l'ATV

colocalisent avec le signal PSD95 alors qu'après 14 jours de culture environ 20% des varicosités GFP positives colocalisent avec la protéine PSD95. Cette colocalisation entre le signal GFP et PSD95, évoluant en fonction du temps, suggère que le développement des synapses s'effectue graduellement en fonction du nombre de jours de culture. Finalement, les résultats obtenus pour le triple immunomarquage des signaux GFP, PSD95 et SYT1 montrent que ces synapses potentielles possèderaient la machinerie protéique nécessaire à la relâche de neurotransmetteur.

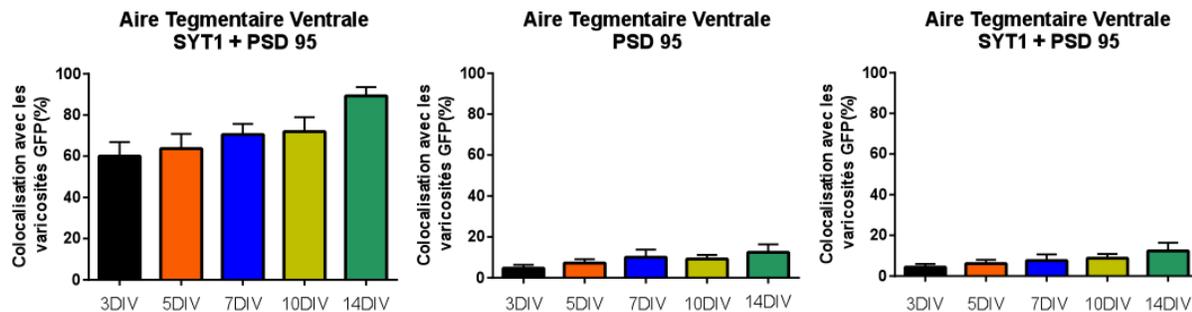


Figure 9 - Quantification de la colocalisation des marqueurs présynaptiques (GFP ; SYT1) et postsynaptiques (PSD95) au sein de neurones dopaminergiques issus de l'ATV après 3, 5, 7, 10 et 14 jours de culture (DIV)

Dans un second temps les résultats obtenus pour les neurones DA issus de la SNc (Figure 10) montrent qu'après 3 jours de culture, environ 60% des varicosités identifiées avec le signal GFP colocalisent avec l'immunomarquage dirigé contre la protéine SYT1. Aussi, cette colocalisation entre les signaux GFP et SYT1 évolue de façon positive en fonction du temps et ce comme pour les neurones DA issus de la SNc (Figure 9). Après 7 jours *in vitro* le signal GFP colocalise à près de 80% avec le signal SYT1, ce qui augmente à 90% après 14 jours de culture. Aussi, les résultats obtenus montrent que certaines des varicosités issues

des neurones DA de la SNc colocalisent avec le marqueur postsynaptique PSD95. Tout comme pour la SNc, cette colocalisation entre le signal GFP et PSD95 évolue en fonction du temps. Après 3 jours de culture, moins de 1% des varicosités DA issus des neurones DA de la SNc colocalisent avec la protéine PSD95. Après 14 jours de culture, la colocalisation entre les varicosités GFP et PSD95 atteint près de 20% et met en avant le développement des synapses en fonction du temps et donc de la croissance des neurones. Enfin, les résultats obtenus pour la triple colocalisation des signaux GFP, PSD95 et SYT1 montrent que ces synapses potentielles possèderaient, tout comme les neurones DA de la SNc, la machinerie protéique nécessaire à la relâche de neurotransmetteur.

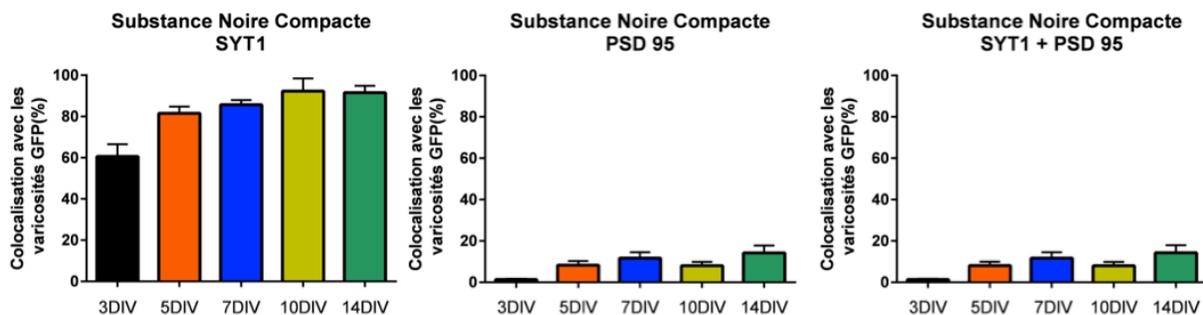


Figure 10 - Quantification de la colocalisation des marqueurs présynaptiques (GFP ; SYT1) et postsynaptiques (PSD95) au sein de neurones dopaminergiques issus de la SNc après 3, 5, 7, 10 et 14 jours de culture (DIV)

Pour terminer, les résultats obtenus avec les cultures de neurones corticaux (Figure 11) montrent qu'environ 60% des terminaisons VGluT1 colocalisent avec SYT1 après 3 jours de culture ce qui augmente pour atteindre 95% de colocalisation après 14 jours de culture. Cependant les résultats obtenus pour les immunomarquages entre VGluT1 et PSD95 sont bien différents de ceux observés avec les neurones DA. En effet après 3 jours in vitro, 40%

des terminaisons VGluT1 colocalisent avec le marqueur postsynaptique PSD95. Puis, après 14 jours de culture in vitro la colocalisation de ces deux marqueurs atteint près de 90%. Enfin les résultats obtenus pour le triple marquage révèlent qu'environ 90% des terminaisons colocalisant avec PSD95 colocalisent aussi avec SYT1, suggérant que la quasi-totalité des synapses potentielles issue des neurones glutamatergiques du CPF possède la machinerie nécessaire à la libération de neurotransmetteur (Figure 10).

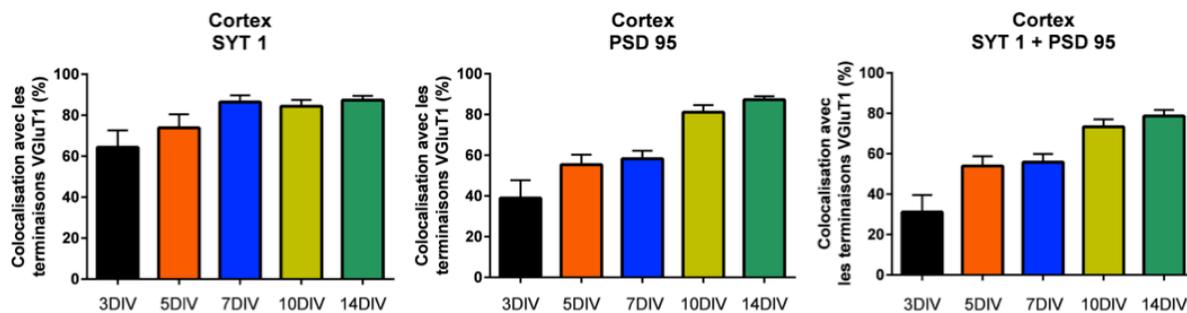


Figure 11 – Quantification de la colocalisation des marqueurs présynaptiques (GFP ; SYT1) et post-synaptiques (PSD95) au sein de neurones dopaminergiques issus du cortex après 3, 5, 7, 10 et 14 jours de culture (DIV)

Dans la suite de ce projet, nous souhaitons également quantifier et étudier le développement des synapses GABAergiques établies par les neurones DA de l'ATV et de la SNc. Pour ce faire, des marquages immunocytochimiques contre la GFP, SYT 1 et la géphyrine seront prochainement effectués sur des co-cultures de neurones DA et striaux de la même façon que les expériences présentées précédemment. L'ensemble sera comparé avec des neurones GABAergiques purement synaptiques issus du striatum ventral et dorsal.

IV – Discussion et perspective

Dans cette étude nous avons combiné des approches de cultures primaires de neurones DA avec des approches immunohistochimiques associées à de l'imagerie confocale pour mettre au point une méthode de quantification des varicosités synaptiques et asynaptiques.

- **Les varicosités synaptiques et asynaptiques des neurones DA sont potentiellement fonctionnelles**

Dans un premier temps, l'analyse de nos résultats montre que les varicosités issues des neurones DA de l'ATV et de la SNc sont potentiellement fonctionnelles et capables de libérer des neurotransmetteurs puisque qu'après 14 jours de culture, 80% du signal GFP, colocalise avec le signal SYT1. Cela suggère que les varicosités, quel que soit leur phénotype neurochimique, possèdent la machinerie nécessaire à la libération DA. En effet la protéine SYT 1 est impliquée dans le processus d'exocytose qui consiste en la fusion entre la membrane vésiculaire contenant le neurotransmetteur et la membrane présynaptique. Une entrée de calcium due à un potentiel d'action va, en se fixant sur la protéine SYT1, permettre un changement de conformation de cette dernière et déclencher la fusion des deux membranes (Südhof et al, 2013). Le neurotransmetteur pourra alors être libéré. La protéine SYT 1 fait partie de la famille des protéines dites de « trafic membranaire » et interagit avec le complexe *Soluble NSF Attachment Protein Receptor* (SNARE) également impliqué dans le processus d'exocytose (Figure 11).

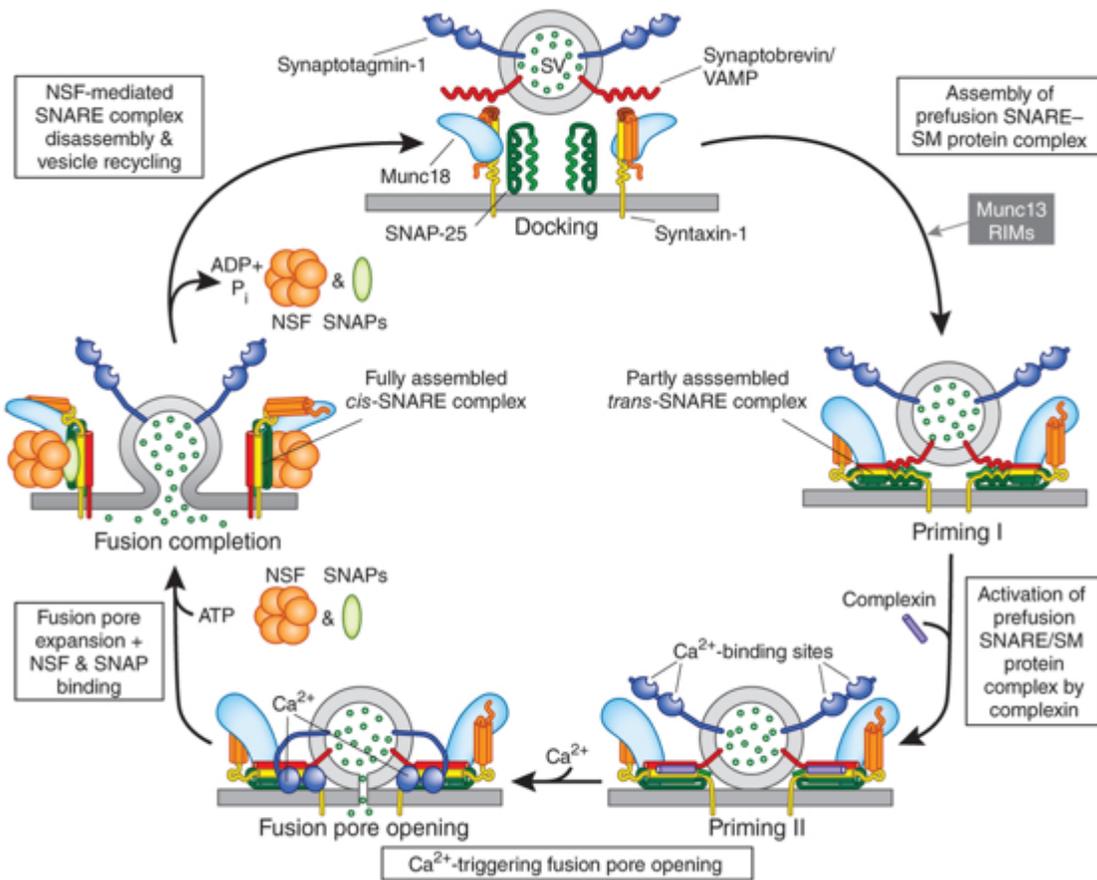


Figure 12 – Schéma représentant le mécanisme d'exocytose mettant en jeu le complexe SNARE et la protéine SYT1 (bleu foncé) au sein d'une terminaison neuronale (Südhof et al, 2013)

- **Les neurones DA sont très majoritairement asynaptiques par rapport aux neurones glutamatergiques du cortex**

Dans un second temps les résultats obtenus avec notre méthode d'analyse et de quantification montrent que les neurones dopaminergiques sont très majoritairement

asynaptiques en comparaison aux neurones glutamatergiques issus du CPF. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus dans les travaux de Descarries et al., en 2008 via la microscopie électronique. Ceci suggère que la méthode développée par notre laboratoire pour quantifier les varicosités synaptiques et asynaptiques est fiable et efficace.

Une hypothèse que nous considérons présentement pour expliquer le caractère asynaptique des neurones DA du mésencéphale est que possiblement, l'expression des protéines présynaptiques (Neurexines, 1, 2, 3 et PTP-S) et postsynaptiques (Neurologines 1, 2, 3 et Trk-C) impliquées dans la formation et le maintien des synapses serait plus faible en comparaison à des neurones purement synaptiques comme les populations de neurones glutamatergiques ou GABAergiques. Des travaux additionnels doivent maintenant être entrepris pour évaluer ceci directement

L'une des limites observées de la technique utilisée ici concerne la résolution des images acquises. Notre méthode suggère que lorsque l'on retrouve une colocalisation parfaite d'un signal issu d'un marqueur présynaptique avec un signal issu d'un marqueur postsynaptique, il s'agit d'une synapse. Malgré tout, il est très difficile de distinguer séparément un signal unitaire correspondant à un marqueur pré ou post-synaptique d'un signal correspond à un amas de marqueurs pré ou post synaptiques. Il s'agit d'une limitation inhérente à la résolution spatiale limitée de la microscopie optique même en mode confocal.

- **Le phénotype des neurones DA de la SNc est potentiellement dépendant des conditions expérimentales.**

Il est surprenant dans notre étude de constater que les neurones DA issus de la SNc montrent des terminaisons synaptiques possiblement glutamatergiques. Les résultats obtenus dans cette étude indiquent qu'environ 20% des varicosités colocalisent avec la protéine PSD95 suggérant que ces varicosités sont glutamatergiques et expriment le transporteur VGluT2. Or, il est intéressant de rapporter que les travaux de Stuber et al, publiés en 2012 ont montré, par des approches d'optogénétique et d'électrophysiologie sur tranche, que les neurones DA issus de la SNc et projetant vers le striatum dorsal ne libéraient pas de glutamate. L'une des explications possibles est que les conditions expérimentales favoriseraient plus facilement l'expression de VGluT2 au sein des neurones DA de la SNc. Cette conclusion est compatible avec des résultats antérieurs du laboratoire Trudeau (Dal Bo et al., 2004 ; Mendez et al., 2008). L'utilisation du tri cellulaire automatisé et la mise en culture pourraient créer un stress cellulaire aboutissant à une expression plus importante du transporteur VGluT2.

- **Le caractère majoritairement asynaptique des neurones DA de la SNc est-il un des facteurs de vulnérabilité dans la maladie de Parkinson ?**

Dans la suite du projet nous souhaitons comprendre si le caractère majoritairement asynaptique des neurones DA ne serait pas un des facteurs de grande vulnérabilité des neurones de la SNc dans la maladie de Parkinson.

En effet, les neurones DA de la SNc montrent une dégénérescence marquée dans la maladie de Parkinson. Curieusement, les neurones DA de l'ATV, bien moins vulnérables dans cette maladie et dotés d'une arborisation axonale moins développée, établissent beaucoup plus de synapses glutamatergiques contrairement aux neurones DA issus de la SNc (Stuber et al, 2012). Comme expliqué précédemment dans l'introduction, la formation et le maintien des synapses fait intervenir des protéines spécifiques comme les neurexines, les neuroligines et les protéines tyrosine phosphatases. Nous savons également que les synapses sont fondamentales pour la survie des neurones. Des facteurs neurotrophiques comme le *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) activent des voies de survie cellulaire via des récepteurs tels que le TrkB, localisés à la synapse. Pourquoi les neurones DA de la SNc dégèrent plus largement que ceux de l'ATV dans la maladie de Parkinson reste une question encore non totalement résolue. Malgré tout, de très récents travaux publiés par le laboratoire Trudeau montrent que la vulnérabilité sélective des neurones DA de la SNc est la conséquence d'une activité métabolique plus importante par rapport aux neurones DA de l'ATV ou du bulbe olfactif chez la souris. En effet, l'étude de Pacelli et al publiée en 2015, révèle que les neurones DA de la SNc possèdent un niveau basal de stress oxydatif plus important mais aussi densité mitochondriale plus élevée au niveau de l'axone et cela par rapport aux neurones DA de l'ATV. Enfin, cette étude a démontré que la longueur des prolongements axonaux des neurones DA de la SNc était deux fois plus importante que celle des neurones DA de l'ATV et trois fois plus grande par rapport aux neurones DA du bulbe olfactif après 7 jours in vitro. Ainsi, les neurones de la SNc auraient tendance à avoir une activité métabolique plus importante due à leur arborisation axonale complexe, favorisant ainsi la production en

grande quantité d'espèces oxygénées réactives (ROS). Finalement, ces travaux mettent en avant que la production importante de ROS par les neurones DA de la SNc dû à leurs caractéristiques phénotypiques, augmente leur vulnérabilité à certaines neurotoxines comme le 1-méthyl-4-phenylpyridium (MPP+) ou la roténone (Pacelli et al, 2015).

Cependant une autre hypothèse que nous proposons et désirons explorer serait que la grande vulnérabilité des neurones DA de la SNc serait en partie due au faible nombre de synapses glutamatergiques développées par ces neurones. Afin de tester notre hypothèse nous souhaitons identifier certaines des protéines clés impliquées dans la formation des synapses des neurones DA. Pour ce faire, des souris TH-GFP seront utilisées dans le but de purifier des neurones DA de la SNc et de l'ATV par tri cellulaire automatisé. La technique de RT-qPCR permettra de caractériser, quantifier et comparer l'expression de l'ARNm de protéines candidates telles que les neurexines et le PTP entre les neurones de la SNc et de l'ATV. Un tri cellulaire de neurones issus du striatum ventral et dorsal sera également réalisé dans le but de comparer par RT-qPCR l'expression des marqueurs postsynaptiques comme les neuroligines et les Trk-C. Par la suite, nous manipulerons à la hausse (surexpression virale) et à la baisse (siRNA) l'expression de ces protéines pour changer le nombre de synapses établies par les neurones DA. Puis à l'aide de notre méthode de quantification des varicosités synaptiques et asynaptiques développée dans le cadre du présent travail, nous évaluerons l'expression des marqueurs pré et postsynaptiques. Finalement nous testerons l'hypothèse qu'une augmentation du nombre de synapses diminuera la vulnérabilité des neurones DA de la SNc au 1-méthyl-4-phenylpyridium (MPP+) et à la roténone, deux agents

toxiques fréquemment utilisés pour induire la mort des neurones DA *in vitro*, alors qu'une baisse du nombre de synapses aura l'effet inverse.

A ce stade du projet nous avons obtenus des résultats préliminaires montrant que la neurexine 1 alpha est plus exprimée dans les neurones DA de l'ATV que dans ceux de la SNC et ce de façon significative. En revanche, il n'y a pas de différence dans l'expression des neurexines 2, 3 alpha et de la protéine PTP-S.

Ce projet novateur nous permettra de déterminer ultérieurement si la vulnérabilité des neurones DA dans la MP est en partie associée à leur caractère très asynaptique. Ces expériences pourraient à terme mener à une avancée dans la compréhension de cette maladie et contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

V – Bibliographie

1. Bourne Y. et al., 2014 – The neuroligins and their ligands: from structure at the synapse – Science, 307, 1324
2. Carlsson A. et al., 1962 – Cellular localization of brain monoamines – Acta Physiologica Scandinavia Supplementum. 56, 1-28.
3. Chih B. et al., 2005 – Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins – Science, 307(5713):1324-8
4. Cho KO. et al., 1992 - The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein – Neuron, 9(5) :929-42
5. Dal Bo G. et al., 2004 – Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine – Journal of Neurochemistry, 1938-1405
6. Dean C. et al, 2003 - Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals – Nature Neuroscience, 6(7) :108-16
7. Descarries L. et al., 1975 – Serotonin nerve terminals in adult rat néocortex – Brain Research 100(3) :563-88
8. Descarries L. et al., 1977 – Noradrenergic axon terminals in the cérébral cortex of rat – Brain Research, 133(2) :197-222.
9. Descarries L. et al., 2000 – Ultrastructural évidence for diffuse transmission by monoamine and acétylcholine neurons of the central nervous system – Progress in Brain Research, Vol 125

10. Descarries L. et al., 2008 – Glutamate in dopamine neurons : synaptic versus diffuse transmission. *Brain Research Review*, 58 :290-302
11. Fibiger et al., 1986 – Bilateral augmentation of dopaminergic and serotonergic activity in the striatum and nucleus accumbens induced by conditioned circling – *Journal of Neuroscience*, 6(7):2037-44
12. Fortin GM. et al., 2012 – Glutamate corelease promotes growth and survival of midbrain dopamine neurons – *Journal of Neuroscience*, 32(48):17477-91
13. Graf ER et al., 2004 – Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins – *Cell*, 119(7):1013-26
14. Ginty D. et al., 2002 – Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along axon et al., 2002 – *Current Opinion in Neurobiology*, 12:268-274
15. Hirasawa H. et al., 2012 – Corelease of dopamine and GABA by a retinal dopaminergic neuron – *Journal of Neuroscience*, 32(38):13281-91
16. Holtz P., 1939 – Dopadecarboxylase – *Naturwissenschaften* 27, 724-725
17. Ji Won Um et al., 2013 – LAR-RPTPs: synaptic adhesion molecules that shape synapse development – *Trends in Cell Biology*, Vol 23, No.10
18. Kaplan DR. et al., 2000 – Neurotrophin signal transduction in the nervous system – *Current opinion in Neurobiology*, Vol 10, Issue 3, 381-391.
19. Lanciego Jl. et al., 2012 – Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia – *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12): a009621

20. Mendez J.A. et al., 2008 – Developmental and Target-Dependent Regulation of Vesicular Glutamate Transporter Expression by Dopamine Neurons – *Journal of Neuroscience*, 28, 6309-6318
21. Pacelli C. et al., 2015 – Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons – *Current Biology*, 25, 1-12
22. Stuber GD. et al, 2010 - Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate – *Journal of Neurosciences*, 30(24) :8229-33
23. Südhof TC. et al., 2013 – A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond – *Nature Medicine*, 19, 1227-1231.
24. Takahashi H. et al., 2011 – Postsynaptic TrkC and presynaptic PTP function as a bidirectional excitatory synaptic organizing complex – *Neuron*, 69(2) :27-303
25. Tritsch NX. et al., 2012 – Dopaminergic neurons inhibits striatal output through non-canonical release of GABA – *Nature*, 490(7419):262-6
26. Trudeau L-E. et al., 2007 - On cotransmission & Neurotransmitter Phenotype Plasticity – *Molecular Interventions*, 7(3) :138-46
27. Ullrich B. et al., 1995 – Cartography of neurexins: More than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons – *Neuron*, 14(3) :497-507
28. Zheng L. et al., 2003 – Some assembly required: the development of neuronal synapses – *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 833-841

29. Wojcik SM et al., 2006 – A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine – *Neuron*, 50(4) : 575-87