

LAURE FRELAND

**MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION
DE COMPOSÉS PHARMACOLOGIQUEMENT
ACTIFS SUR LA VOIE D2R-AKT-GSK-3**

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

DÉPARTEMENT DE PSYCHIATRIE ET NEUROSCIENCES
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Les maladies mentales sont un phénomène en pleine expansion dans nos sociétés occidentales. Des estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) prévoient que d'ici 2020, la dépression mesurée en DALYs (déficience ajustée par année de survie qui est un indicateur d'années de vie avec une déficience et des années perdues par une mort prématurée) [1] sera la deuxième cause d'invalidité tout âge ou sexe confondu dans le monde ce qui entraînerait un coût exorbitant pour nos sociétés [2]. Investir dans la découverte des causes des maladies mentales ainsi que dans leur traitement représente par conséquent un élément crucial pour conserver la cohésion sociale. Aujourd'hui, l'une des causes les plus probables à l'origine des pathologies mentales semble impliquer une dérégulation de la voie de signalisation neuronale D2R-AKT-GSK-3 au sein du striatum. La première étape de l'étude préclinique des médicaments est le criblage pharmaceutique in-vitro c'est-à-dire un criblage sur cellules et en laboratoire. Ainsi, l'objet de ma maîtrise concerne le développement de modèles d'études in vitro permettant l'étude de la voie de signalisation neuronale D2R-AKT-GSK-3. Compte tenu du manque d'expertise de mon laboratoire d'accueil à l'époque, mon mémoire sera à dominante méthodologique. Tout d'abord, j'ai mis au point un modèle de culture cellulaire de striatum de souris transgéniques sur lamelles. Ceci pour m'assurer que la culture est viable et qu'elle présente les différentes populations neuronales en proportions similaires à ce que l'on trouve chez l'animal. J'ai utilisé cette même culture dans le cadre d'un article édité en 2011 (Swift *et al.*, 2011) afin de prouver que les récepteurs dopaminergiques endogènes peuvent transactiver les récepteurs TrkB endogènes dans les neurones du striatum, phénomène visible via la technique d'Analyse de Distribution d'Intensité Spatiale (SpIDA). Une fois assurée par ces deux résultats que le modèle fonctionne bien et est utilisable dans le cadre d'une étude de stimulation, la seconde étape entreprise a été la mise au point d'une technique de criblage pharmacologique à moyen débit en plaque de 96 puits. Ces résultats me permettent d'envisager que ce modèle est développable et a un véritable potentiel dans le criblage pharmaceutique qui souffre actuellement de nombreuses limitations concernant l'étude des protéines G. En effet, il assure une certaine flexibilité dans l'examen des variables utilisées sans avoir à modifier la trousse de réactifs expérimentale.

Je dédie ce mémoire à ma famille et à mes amis ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont supportée durant toute la durée de rédaction de ce mémoire et qui m'ont aidé à conserver le cap dans cette aventure.

Table des matières

Résumé.....	i
Table des matières	iii
Liste des figures	v
<u>Chapitre 1</u>	v
<u>Chapitre 2</u>	v
<u>Chapitre 3</u>	v
Liste des abréviations.....	vii
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Les troubles mentaux.....	1
1.2 Étiologies des désordres mentaux.....	3
1.2.1 <i>La théorie anatomique : implication des ganglions de la base dans les désordres mentaux</i>	3
1.2.2 <i>Composition histologique du striatum</i>	5
1.2.3 <i>La théorie moléculaire : la voie de signalisation dopaminergique</i>	7
1.2.4 <i>Les récepteurs dopaminergiques D2R et la voie AKT/GSK-3</i>	7
1.3 Étapes précédant l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament.....	10
1.4 Criblage pharmaceutique in vitro	10
1.5 Objectifs du projet	12
Chapitre 2: Matériels et Méthodes.....	13
2.1 Modèle de souris Transgéniques D1-TOM/D2-GFP.....	13
2.2 Culture de neurones sur lamelles.....	16
2.2.1 <i>Préparation des lamelles</i>	17
2.2.2 <i>Ensemencement et entretien de la culture</i>	17
2.2.3 <i>Immunocytochimie</i>	19
2.3 Culture de neurones en plaque de 96 puits.....	20
2.3.1 <i>Mise en culture et entretien</i>	20
2.3.2 <i>Stimulation, fixation et immunocytochimie</i>	21
2.4 Principe du LI-COR et son analyse quantitative de la réponse à la stimulation.....	22
2.5 Analyse statistique des résultats	23
Chapitre 3: Résultats.....	24
3.1 Culture de neurones sur lamelles.....	24
3.1.1 <i>Composition de la culture de striatum de souris</i>	24
3.1.2 <i>Utilisation de la méthode de culture neuronale pour l'étude de la transactivation du récepteur de BDNF par les récepteurs de la dopamine</i>	30
3.2 Adaptation du protocole pour la culture en plaque de 96 puits.....	32
3.2.1 <i>Milieu Lonza</i>	33
3.2.2 <i>Milieu «habituel: NBC + 5% FBS»</i>	35
3.3 Effet de la stimulation sur cellules au LI-COR.....	36
3.3.1 <i>Milieu Lonza</i>	40
3.3.2 <i>Milieu habituel «NBC + 5% FBS»</i>	42
Chapitre 4 : Discussion.....	46
4.1 Culture de neurones sur lamelles.....	46
4.2 Le modèle D1 tom/D2 GFP.....	47

4.3 Adaptation du protocole en plaque de 96 puits.....	51
4.4 Synthèse.....	54
Conclusion et Perspectives	55
Webographie.....	58
Bibliographie	59
Annexe 1 :Protocoles détaillés.....	64

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 - Schéma représentatif du cerveau humain et des ganglions de la base :	4
Figure 2 - Schéma représentatif des deux grandes voies dopaminergiques	8
Figure 3 - Représentation schématique de la formation du complexe D2R-AKT-PP2A suivant la liaison de la dopamine à son récepteur	9

Chapitre 2

Figure 4 - Représentation schématique de la « fabrication » d'une lignée de souris transgénique	15
Figure 5 - Spectres d'absorption et d'émission de tdTomato, EGFP et Alexa 647	20
Figure 6 - Schéma représentatif du principe d'utilisation du LI-COR	22

Chapitre 3

Figure 7 - Marquages obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés avec NeuN, GAD, DARPP32	25
Figure 8 - Marquages obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés avec VMAT2, DAT, ChAT et TyrOHase	28
Figure 9 - Marquages td-Tomato et EGFP obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés	29
Figure 10 - Transactivation des récepteurs TrkB endogènes par les récepteurs dopaminergiques endogènes après stimulation visible au SpIDA - Image issue de Swift and al. 2011	31
Figure 11 - Cultures de neurones modèles de Krantis	33
Figure 12 - Clichés de la culture en plaque de 96 puits en milieu lonza	34
Figure 13 - Clichés de la culture en plaque de 96 puits en milieu Lonza	35
Figure 14 - Cliché de culture de neurones en plaque de 96 puits en milieu conventionnel	36
Figure 15 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR dans les deux canaux simultanément	37
Figure 16 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR lue dans un seul canal 800 nm figurant donc GSK-3 total	38
Figure 17 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR lue dans un seul canal 680 nm figurant la molécule GSK-3 déphosphorylée donc sous forme activée	39
Figure 18 - Histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur 3 cultures à 100 000 (100K) cellules par puits dans le milieu LONZA pour 3 conditions LY BpVphen et CTL	40

Figure 19 - Histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur 3 cultures à 150 000 (150K) cellules par puits dans le milieu LONZA pour 3 conditions LY BpVphen et CTL.....	41
Figure 20 - Histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur 3 cultures à 100000 (100K) cellules par puits dans le milieu habituel pour 3 conditions LY BpVphen et CTL.....	43
Figure 21 - Histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur 3 cultures à 150000 (150K) cellules par puits dans le milieu habituel pour 3 conditions LY BpVphen et CTL.....	44

Liste des abréviations

AKT ou AKT : Protéine kinase de type B (Serine/Thréonine Protein kinase)
 AMPc : Adénosine MonoPhosphate Cyclique
 AMPA : Le 2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid est un agoniste qui mime les effets du glutamate sur les récepteurs AMPA
 BAC : Chromosome Bactérien Artificiel
 BSA : Bovine serum albumin
 ChAT : Choline Acetyl Transferase
 CHO : Chinese Ovary Hamster
 DA : Dopamine
 DARPP32 : Dopamine and cAMP-Regulated neuronal PhosphoProtein ou Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 1B (PPP1R1B)
 DAT : Dopamine Transporter/Transporteur à la Dopamine
 DMSO : DiMethyl SulfOxide
 DNase : Enzyme clivant l'ADN
 DsRed : Protéine tétramérique ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur rouge, issue du corail *Discosoma*. D'où l'appellation *Discosoma Red*
 D1R : Récepteurs dopaminergiques de type 1
 D2R : Récepteurs dopaminergiques de type 2
 Drd1 : Récepteurs dopaminergiques de sous-type 1
 Drd2 : Récepteurs dopaminergiques de sous-type 2
 Drd3 : Récepteurs dopaminergiques de sous-type 3
 Drd4 : Récepteurs dopaminergiques de sous-type 4
 EGFP : Endogenous Green Fluorescent Protein/Protéine Verte Fluorescente endogène
 EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor/Récepteur au facteur de croissance épidermal
 ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
 FBS : Foetal Bovine Serum
 GABA : γ -Aminobutyric acid
 GAD : Glutamic Acid Decarboxylase
 Gaio : Sous type de protéine G inhibitrice
 GFAP : Protéine Acide Fibrillaire Gliale
 GFP : Green Fluorescent Protein/Protéine Verte Fluorescente
 GPCR : Récepteurs couplés aux Protéines G
 GPe : Globus Pallidus externe
 GPi : Globus pallidus interne
 GSK-3 : Glycogen Synthetase Kinase de type 3
 HEK293 : Human Embryonic Kidney,
 HeLa : Human cervical epithelial cancer cells
 Kb : Kilobases
 MSNs : Medium Spiny Neurons, Neurones moyen épineux
 NADPH-d : La nitric oxide synthase
 NBC : Milieu de Culture NeuroBasal Complet
 NGF : Nerve Growth Factor
 NeuN : Neurofilament N
 O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

P33 : Phosphore 33

PDL : Poly-D-Lysine

PP2A : Protein Phosphatase de type 2 A

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFA : ParaFormaldéhyde

PKA : Protéine Kinase de type A

PUT : Putamen

SpiDA : Spatial intensity Distribution Analysis

TrkB : Récepteur aux Tyrosine kinases de type B ou récepteur aux facteurs de croissance

VMAT2 : Vesicular Monoamine Transporter de type 2

Chapitre 1 : Introduction

Le thème de ce mémoire est la mise au point d'une méthode de criblage pharmacologique à moyen débit. Pour amener cette thématique nous allons donc, dans la partie d'introduction suivante, remettre en contexte les raisons qui m'ont amenée à cette mise au point.

1.1 Les troubles mentaux

Les troubles mentaux tels que la schizophrénie, la dépression, les troubles bipolaires, le trouble hyperactif avec déficit d'attention sont devenus récemment un énorme problème médical et social. En effet, les troubles psychiatriques sont un groupe de pathologies mentales avec le plus haut taux de handicap (Melzer *et al.*, 2003; O.M.S 2012).

L'organisation mondiale de la santé (O.M.S) définit la santé comme étant "un état de complet bien-être physique, mental et social, et [qui] ne consiste pas seulement en une absence de maladie ou d'infirmité"¹. De même, on considère la santé mentale comme un état de bien-être qui permet à chacun de réaliser son potentiel, de faire face aux difficultés normales de la vie, de travailler avec succès, de manière productive et d'être en mesure d'apporter une contribution à la communauté. De ce fait, la santé mentale ne s'exprime pas simplement par l'absence de troubles mentaux bien que ce soit bien ces troubles mentaux qui nous préoccupent (O.M.S, 2012). En effet, ils sont l'une des principales causes de suicide que l'on peut rencontrer. Ainsi, en moyenne, sur 800 000 personnes qui se suicident chaque année, plus de 90% souffrent de troubles mentaux (Jorm *et al.*, 1995).

Selon l'O.M.S, un trouble mental ou comportemental se caractérise par une perturbation de la réflexion, de l'humeur ou du comportement qui ne rentre plus dans le cadre des normes ou des croyances culturelles et qui attire l'attention de ceux qui en

¹ Cette définition a été adoptée lors de la conférence internationale de la santé qui s'est déroulée à New York du 19 au 22 juin 1946. Son entrée en vigueur a été validée le 7 avril 1948 à la constitution de l'O.M.S.

souffrent ou leurs proches. Dans la plupart des cas, ces symptômes s'accompagnent d'une détresse et interfèrent avec les fonctions personnelles. Toujours selon l'O.M.S, les symptômes peuvent être physiques (céphalées, troubles du sommeil), émotionnels (tristesse, peur, angoisse), cognitifs (difficulté à raisonner normalement, croyances anormales, troubles de la mémoire), comportementaux (comportement agressif, incapacité à exécuter les activités de la vie courante, usage abusif de substances), perceptuels (perception visuelle ou auditive de choses que les autres ne voient ou n'entendent pas).

En regardant les prévisions de L'O.M.S concernant la dépression au niveau mondial pour 2020 on réalise que cette pathologie va devenir la deuxième cause de DALYS (déficience ajustée par année de survie qui est un indicateur d'années de vie avec une déficience et des années perdues par une mort prématurée) [1] derrière les pathologies cardio-vasculaires tous âges ou sexes confondus. Le coût pour la société, aussi bien humain que financier, engendré par les symptômes et l'incapacité de ces personnes à réaliser leur plein potentiel va être très important. Si y on ajoute l'inversement de la pyramide des âges dû au vieillissement de la population on peut voir que la cohésion sociale est en jeu. La prévention du suicide et des pathologies mentales s'avère ainsi être une priorité de santé publique. De nombreux traitements plus ou moins efficaces existent afin de pallier aux symptômes mentionnés précédemment. Malheureusement, les traitements disponibles actuellement présentent de nombreux effets indésirables ou résistances. Si nous prenons le cas du lithium qui est le traitement de référence pour soigner les patients bipolaires, nous voyions que 50% des patients y sont résistants (Geddes *et al.*, 2010; Bowden *et al.*, 2000). De plus, ce traitement présente des effets secondaires dose-dépendants comme l'insuffisance rénale (Le Roy *et al.*, 2009). Ceci n'est que l'exemple le plus marquant de ce phénomène qui ne dresse guère un tableau encourageant pour notre futur collectif. Cependant, la recherche aussi bien clinique que fondamentale nous a démontré que l'on pouvait entrevoir les causes de ces troubles afin de mieux comprendre et traiter les maladies psychiatriques. En effet, plusieurs pathologies psychiatriques dont la schizophrénie semblent être dues à un déséquilibre dans les structures des ganglions de la base et principalement dans les transmissions dopaminergiques (Mackay *et al.*, 1982). De même, beaucoup de drogues entraînant une addiction semblent affecter ce système (Eisenberg et

Berman, 2010). Ainsi, connaître les interactions existantes entre les récepteurs dopaminergiques et ses effecteurs pourrait permettre de mettre au point de nouveaux traitements entrant dans la prise en charge des maladies neuropsychiatriques.

Investir dans la recherche aussi bien clinique que fondamentale afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et les médications associées représente les nouveaux enjeux du 21^{ème} siècle. La finalité sera d'améliorer la prise en charge ainsi que la qualité de vie de ces patients qui vont être de plus en plus nombreux. Pour cela, il faudra investiguer plus précisément les structures et les neurotransmetteurs impliqués dans les désordres mentaux grâce à la recherche.

1.2 Étiologies des désordres mentaux

Si l'on pousse plus avant la recherche concernant les causes neurobiologiques des désordres mentaux, la plupart des études s'accordent à dire qu'elles s'expriment soit par une cause anatomique, le plus souvent les ganglions de la base, soit au niveau moléculaire via la voie de signalisation dopaminergique. Il s'avère que ces deux causes sont complémentaires. Aussi, nous détaillerons ci-après chacune de ces deux théories qui nous intéresseront plus particulièrement dans la mise en place de notre méthode de détection des composés pharmaceutiques.

1.2.1 La théorie anatomique : implication des ganglions de la base dans les désordres mentaux

Les ganglions de la base comprennent le striatum, mais aussi le globus pallidus (ou pallidum), la substantia nigra (consistant en pars reticulata et pars compacta) et le noyau subthalamique comme le montrent ci-après les **figures 1 A et B**. Le striatum étant lui-même composé du noyau caudé et du putamen séparés par les fibres de la capsule interne et le nucleus accumbens au niveau antérieur (Kandel, Schwartz, Jessel, 2000).

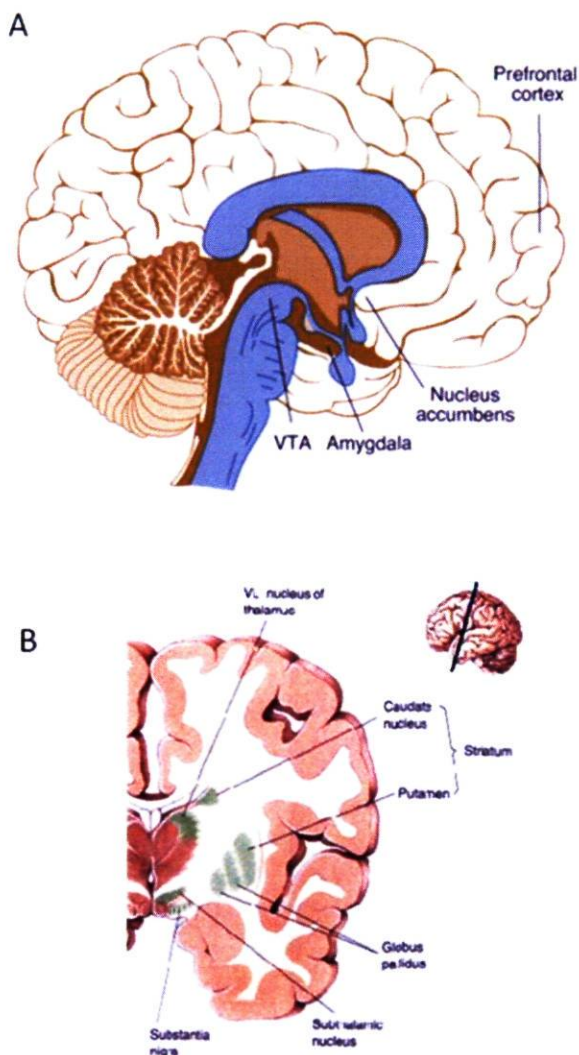


Figure 1 - Schéma représentatif du cerveau humain et des ganglions de la base :

1A - coupe sagittale d'un cerveau humain. ¹

1B - coupe transversale distinguant les ganglions de la base et notamment le striatum composé du putamen et du noyau caudé. ²

Le striatum est la principale structure réceptrice ou voie d'entrée des ganglions de la base. Elle est divisée en trois parties (cf. **figure 1B** ci-dessus) : le noyau caudé, le putamen et le striatum ventral (qui inclut le nucleus accumbens, cf. **figure 1A**).

¹<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh312/images/thatcher.gif>

²<http://brainmind.com/BasalGanglia.html>

Bien que jouant un rôle essentiel dans la motricité volontaire, les ganglions de la base ne sont pas directement connectés avec la moelle épinière contrairement à d'autres composants du système moteur. Ces noyaux reçoivent leurs inputs du cortex cérébral et envoient leurs outputs au tronc cérébral et au thalamus, dont ce dernier assure après filtrage des informations un retour de type feedback au cortex préfrontal, prémoteur et moteur. (Kandel, Schwartz, Jessel, 2000). Ces structures sont impliquées dans le contrôle des mouvements et leurs lésions causent, en observation clinique, des troubles du mouvement. Ainsi, les désordres affectant les ganglions de la base résultent soit en une diminution du mouvement (maladie de Parkinson), soit en un mouvement excessif (maladie de Huntington). De plus, des troubles du comportement ou troubles neuropsychiatriques cognitifs peuvent survenir lors de lésions de ces ganglions, mettant en évidence leur rôle dans les diverses fonctions des lobes frontaux (Kandel, Schwartz, Jessel, 2000). En effet, dans le cadre de maladies dégénératives des ganglions de la base et de lésions du striatum le risque de survenue d'épisode dépressif majeur est augmenté (Folstein *et al.*, 1985). De même, des investigations post-mortem sur les structures constituant le striatum ont montré que le noyau caudé et le putamen sont plus petites chez les dépressifs et les bipolaires que chez les individus contrôles (Husain *et al.*, 1991; Krishnan *et al.*, 1992 et 1993; Baumann *et al.*, 1999). Ajoutons que des études effectuées post-mortem sur des cerveaux de patients schizophrènes ont montré que leur néostriatum présentait une concentration de dopamine augmentée (Mackay *et al.*, 1982), un taux de récepteurs D2R/D3R et surtout D4R élevé (Mackay *et al.*, 1982; Murray *et al.*, 1995; Seeman *et al.*, 1995). De plus, la synthèse et le stockage de dopamine au niveau présynaptique dans le striatum, mesurée par PET radiotraceurs L-DOPA, sont augmentés dans la phase prodromique de la maladie schizophrénique (Howes *et al.*, 2009).

1.2.2 Composition histologique du striatum

Les neurones de projection ou Neurones Moyens Epineux (MSNs) représentent 90 à 95% des neurones du striatum chez la souris. C'est le type cellulaire neuronal principal et le principal neurone de projection du striatum (Wilson et Groves, 1980). Ils utilisent le GABA comme neurotransmetteur inhibiteur et leurs épines dendritiques sont les cibles principales

des projections corticostriatales et thalamostriatales (Ribak *et al.*, 1979; Oertel et Mugnaini 1984; Parent et Hazrati, 1995; Doig *et al.*, 2010). Ces cellules sont séparées en deux sous-population en fonction de leur site de projection et de leur patron d'expression en neuropeptides (Graybiel 1990; Guzman *et al.*, 1993). Les MSNs striatonigraux expriment les neuropeptides Substance P et dynorphine, sont à l'origine de la voie directe et projettent au Globus Pallidus Interne (GPi), à la Substantia Nigra (SN) et à l'aire tegmentale ventrale tout en exprimant le récepteur Drd1a. La voie indirecte est composée de MSNs striatopallidaux exprimant le neuropeptide enkephaline, enrichis en récepteurs Drd2 qui projettent au Globus Pallidus Externe (GPe) et influencent de façon indirecte le GPi et la SN via le noyau subthalamique (Flores-Barrera *et al.*, 2010; Gerfen *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1998; Lobo *et al.*, 2009).

Les interneurones striataux présentent des dendrites dépourvues d'épines et sont globalement séparés en deux sous-populations en fonction de la taille de leur corps cellulaire : les interneurones GABAergique de taille moyenne et les interneurones cholinergiques géants (Parent et Hazrati, 1995).

Les interneurones striataux de taille moyenne utilisent le GABA comme neurotransmetteur et sont divisés en trois types selon le type de neuropeptides qu'ils expriment. En plus d'exprimer le GABA et l'enzyme servant à sa synthèse : la decarboxylase de l'acide glutamique (GAD), le premier type exprime la parvalbumine. Le second type exprime la somatostatine, le neuropeptide Y et la NADPH-d (la nitric oxide synthase). Enfin, le troisième groupe exprime la calrétinine (DiFiglia *et al.*, 1976; Cicchetti *et al.*, 2000).

Les interneurones cholinergiques sont des neurones géants sans épines qui sont la source principale d'acétylcholine du striatum (DiFiglia *et al.*, 1976). Ces cellules sont peu nombreuses puisqu'elles ne représentent que 1 à 2 % de la population cellulaire totale du striatum (Phelps et Vaughn, 1986). Leurs dendrites reçoivent des contacts synaptiques provenant des projections émanant de la substance noire, du thalamus et du cortex. Les interneurones cholinergiques modulent l'activité des neurones de projection striataux et des interneurones GABAergiques (Cicchetti *et al.*, 2000). Ils peuvent exprimer la calrétinine

et/ou la Choline acetyl Transferase (ChAT) (Kimura *et al.*, 1981; Bolam *et al.*; 1984, Phelps *et al.*, 1985).

Les ganglions de la base et plus précisément la signalisation dopaminergique anormale sont principalement mis en cause dans de nombreux troubles neuropsychiatriques. Nous allons donc détailler maintenant les principaux éléments de la signalisation dopaminergique : les récepteurs dopaminergiques.

1.2.3 La théorie moléculaire : la voie de signalisation dopaminergique

Les récepteurs dopaminergiques font partie de la famille des protéines G à sept domaines transmembranaires et présentent une conservation de la séquence en acides aminés sur leur domaine transmembranaire. Ils sont séparés en deux familles : les récepteurs de type D1 (D1R) : Drd1a, Drd1b et Drd5, et les récepteurs de type D2 (D2R) : Drd2, Drd3, Drd4 (Lachowicz et Sibley, 1997; Lobo, 2009) qui sont tous deux exprimés dans le striatum (Kebabian et Calne, 1979; Creese *et al.*, 1983; Lobo *et al.*, 2009) La famille des récepteurs D2 est principalement impliquée dans l'étiologie des troubles mentaux et est la cible de nombreux traitements stabilisateurs de l'humeur et antipsychotiques (Beaulieu et Gainetdinov, 2011).

1.2.4 Les récepteurs dopaminergiques D2R et la voie AKT/GSK-3

Les récepteurs D2R sont couplés à au moins deux voies de signalisation indépendantes dans le striatum adulte (Beaulieu *et al.*, 2007) (cf. **figure 5**). Une première voie implique l'activation des protéines G, $G_{\alpha i/o}$, qui entraînent la régulation des canaux ioniques et l'inhibition des adénylates cyclases (Missale *et al.*, 1998). Le blocage de cette voie par l'halopéridol accroît la production d'AMP_c menant à une activation de la protéine kinase A (PKA). Les récepteurs D2R régulent aussi la voie de signalisation AKT/GSK-3 à travers un mécanisme AMP_c-indépendant (Beaulieu *et al.*, 2004) (cf. figure 5 ci-dessous).

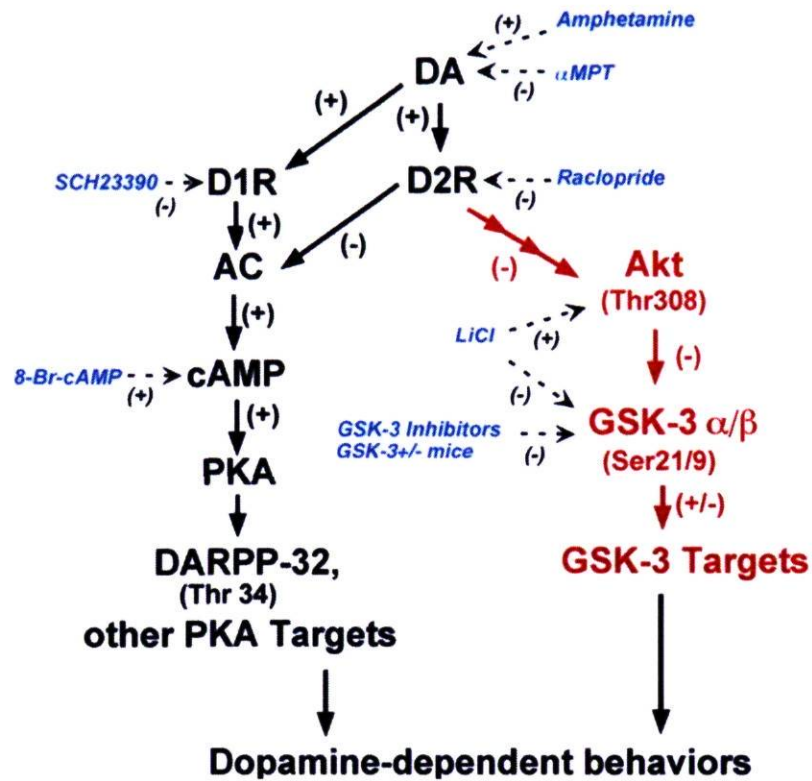


Figure 2 - Schéma représentatif des deux grandes voies dopaminergiques. Issu de Beaulieu et al., 2004.

Dès l'activation, les récepteurs D2R induisent la formation d'un complexe de signalisation composé de la protéine kinase AKT, la protéine d'échafaudage β -arrestine 2, et la protéine phosphatase 2A (PP2A) comme le montre la figure 3 ci-après. Issu de Beaulieu *et al.*, 2007.

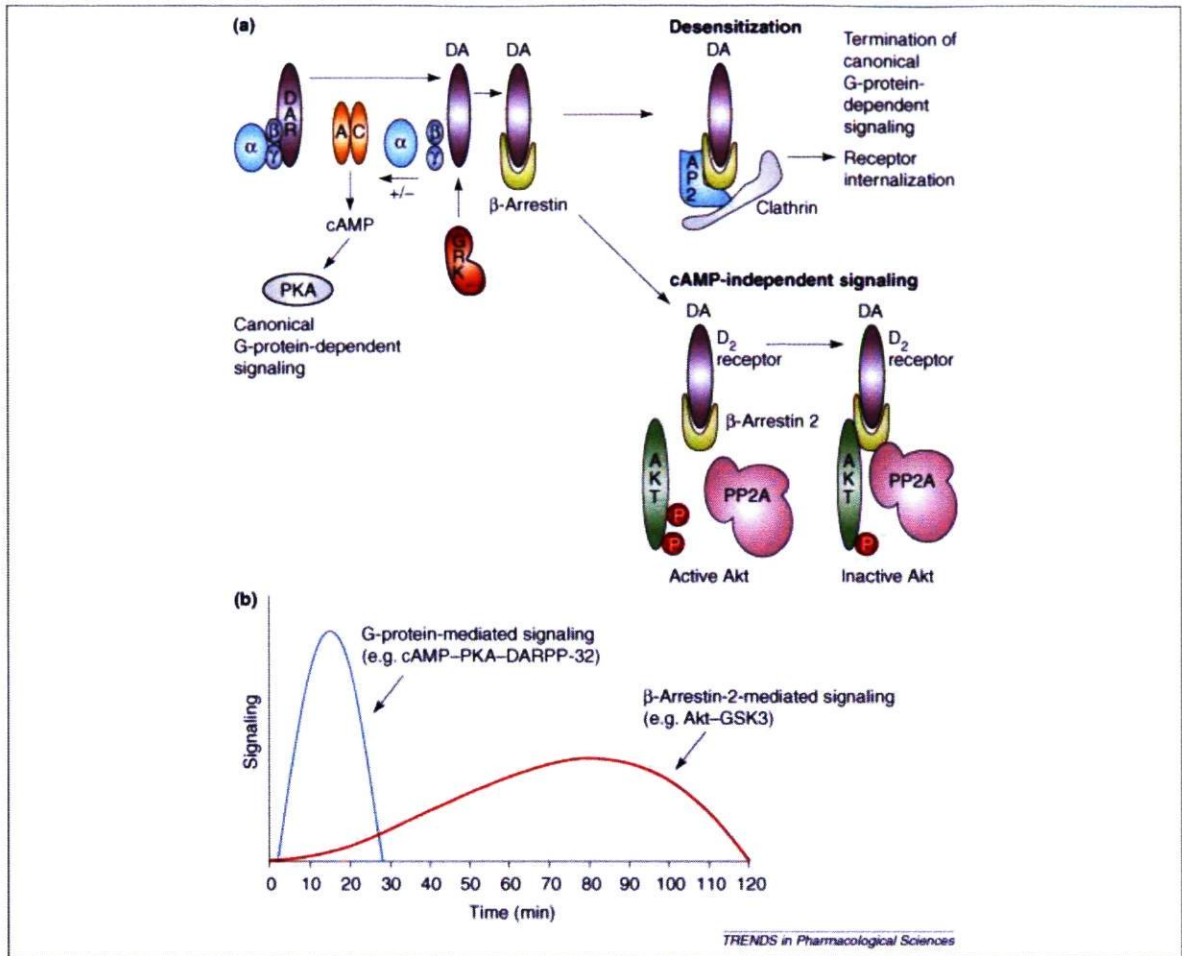


Figure 3 - Représentation schématique de la formation du complexe D₂R-AKT-PP2A suivant la liaison de la dopamine à son récepteur. Issu de Beaulieu *et al.*, 2007.

La formation de ce complexe facilite l'inactivation d'AKT par PP2A (Beaulieu *et al.*, 2005). Parce qu'AKT est un régulateur négatif de GSK-3, l'inhibition d'AKT en réponse à la stimulation des récepteurs D₂R mène à une activation de GSK-3 (Beaulieu *et al.*, 2008b; Beaulieu *et al.*, 2008a). La formation du complexe AKT/β-arrestine 2/PP2A et donc l'activité de GSK-3 cérébrale peuvent être inhibées par le lithium (Beaulieu *et al.*, 2008). Cette voie présente un intérêt dans l'étude des composés pharmacologiques puisque les récepteurs D₂R sont présumés impliqués dans l'étiologie des désordres psychiatriques tels que la schizophrénie (Carlsson *et al.*, 2001; Gainetdinov *et al.*, 2001; Sharp *et al.*, 2001). En outre, la voie de signalisation AKT/GSK-3 est affectée chez certains schizophrènes comme l'a démontré le groupe de Emamian (Emamian *et al.*, 2004). Il est

donc d'une grande importance médicale et pharmaceutique d'étudier cette voie dopaminergique de type D2 pour trouver de nouveaux effecteurs moléculaires de la voie et permettre ainsi la mise au point de nouveaux composés pharmaceutiques.

1.3 Étapes précédant l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament

Avant qu'un médicament n'arrive au chevet d'un patient, il doit franchir un certain nombre d'étapes attestant de son efficacité et de sa sécurité d'emploi. Une molécule jugée prometteuse sera testée en phase de recherche préclinique : tout d'abord in-vitro, sur cellules ou en tubes à essai, puis in-vivo sur un modèle animal dans le cas où les premiers essais in-vitro s'avèrent concluants. Cette étape de tests précliniques assure de l'innocuité du futur médicament car, dès à présent, seront découverts les éventuels effets toxiques (tératogènes, carcinogènes ou mutagènes) de certaines molécules. Ainsi, un médicament jugé prometteur en phase préclinique passera alors en phase de tests clinique sur l'homme une fois toutes ces étapes précédentes validées (Lipsky et Sharp, 2001; Santé Canada, 2006).

1.4 Criblage pharmaceutique in vitro

Plusieurs techniques de criblage existent depuis quelques années déjà. Comme je voulais voir le niveau de phosphorylation de ma protéine d'intérêt GSK3 à l'intérieur des neurones, sans la dénaturer, écarter toutes les méthodes basées sur un lysat cellulaire s'imposait à moi. Les méthodes à écarter comprennent donc le western-blot, l'ELISA et l'immunoprécipitation. La seule technique d'investigation acceptable est l'immunoessai qui me permet d'observer mes protéines à l'intérieur des neurones. Je vais donc détailler dans la suite de ce texte les principales techniques existant actuellement pour investiguer les protéines phosphorylées lors de criblages pharmaceutiques et celle pouvant m'intéresser dans le cadre de mon projet.

Tout d'abord, la très fortement utilisée, technique des puces à ADN, ARN ou protéines (microarray ou Chips) va lyser les cellules pour marquer leur contenu après stimulation, il s'agit d'une information quantitative [4]. Les plus connues sont les sondes des laboratoires affymetrix®. Ces laboratoires proposent également une nouvelle technique permettant d'étudier les protéines phosphorylées via une transfection des neurones avec des vecteurs pour leur faire exprimer la molécule fluorescente (ici la luciférase) en fonction de l'activation du gène d'intérêt. L'avantage est de travailler *in vivo*. Les problèmes sont que la transfection va endommager un grand nombre de neurones mais seule est investiguée l'expression de gènes et non les molécules dans leur conformation native. [5] Ceci ne permet pas d'aller regarder ensuite en microscopie et d'avoir une information qualitative. Cette technique a donc tout naturellement été écartée.

Deuxièmement, les techniques radio-immunologiques sont particulièrement intéressantes. La technique au Phosphore 33 (P33) à l'époque où j'ai commencé cette étude était couramment utilisée et était couteuse car elle obligeait à acheter différentes troupes de réactifs. De plus, elle ne permettait pas d'investiguer toutes les voies de signalisation. À présent, une nouvelle technique permet d'investiguer les protéines kinases de la voie AKT-GSK-3 ou encore Erk (impliquée dans les voies de l'apoptose) avec une même trousse de réactifs en suivant le marquage dû à l'AMPc radioactif dans les cellules. À l'époque, le prix était le seul inconvénient. Maintenant, seules restent les règles de sécurité en matière de déchets radioactifs. Une autre limitation est que la cellule ne reste pas intacte. [3]

Finalement, les techniques immunologiques ou immunoessais permettent la stimulation, la fixation et le marquage dans le même puits de culture, ce qui permet de se passer de lysat cellulaire. Le principe est de perméabiliser les cellules préalablement fixées puis d'utiliser un anticorps dirigé contre une protéine phosphorylée et un anticorps dirigé contre la même protéine totale (sous forme phosphorylée et non-phosphorylée). Avec une seule plaque on peut obtenir l'information de plusieurs western-blot individuels ou de plusieurs ELISA. L'avantage principal de cette technique est le prix peu élevé comparé aux techniques radio-immunologiques. Le seul problème est une potentielle réaction croisée des anticorps si ces derniers manquent de spécificité. C'est cette technique que j'ai choisit de développer pour mener mon investigation [3].

1.5 Objectifs du projet

Étant donné qu'à l'époque aucune technique disponible ne permettait l'étude des protéines dans leur conformation native pour un coût moindre, nous pouvons donc affirmer qu'il y avait, en quelques sortes, un manque à combler. La thématique était de mettre au point une méthode de détection de composés pharmacologiquement actifs sur la voie D2R-AKT-GSK-3. Les méthodes utilisées visaient à répondre aux différentes questions que l'on peut se poser, telles : la culture de striatum issue de nouveau-nés de souris présente-t-elle les mêmes caractéristiques et populations neuronales que le striatum trouvé chez l'animal? Les neurones dopaminergiques de la culture de striatum sont-ils stimulables par un agoniste dopaminergique? Cette stimulation vise-t-elle le D2R? La même culture est-elle viable en plaque de 96 puits? Cette nouvelle culture est-elle stimulable sur la voie de signalisation D2R-AKT-GSK-3?

Toutes ces questions nous serviront de guides pour valider chacune des étapes de la mise en place de la méthode de détection envisagée dans ce mémoire.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Les troubles mentaux ont des causes anatomiques et biochimiques identifiées et nombreuses. Néanmoins, parmi ces causes, se détachent particulièrement, en termes d'importance, une région anatomique qui est le striatum et une voie de signalisation qui est D2R-AKT-GSK-3. Pour investiguer l'effet de molécules d'intérêt thérapeutique sur cette voie à l'étape préclinique, le plus intéressant est de faire du criblage pharmacologique de drogues in-vitro. Or, les méthodes actuellement disponibles ne permettent de visualiser ni les voies de signalisations complètes ni les molécules dans leur conformation native car elles contiennent d'importantes limitations techniques. Pour les contourner, j'ai donc choisi de mettre au point une méthode de détection de composés pharmacologiquement actifs sur la voie D2R-AKT-GSK-3. Pour cela, j'ai dû passer par plusieurs étapes de validation. Dans un premier temps, j'ai utilisé des souris transgéniques pour la culture de neurones sur lamelles et nous verrons par la suite cette technique en détails. Concernant la seconde étape, des souris Wild Type (WT) ont été utilisées pour réaliser l'adaptation de cette culture en plaque de 96 puits, une technique que nous détaillerons dans un deuxième temps.

Je vais donc passer en revue dans le présent chapitre les techniques et méthodes utilisées pour répondre aux différentes questions que j'ai pu me poser pour mettre en place cette méthode de détection sur la voie dopaminergique de type 2.

2.1 Modèle de souris Transgéniques D1-TOM/D2-GFP

En 2008, Shuen et ses collègues (Shuen *et al.*, 2008) ont élaboré le protocole à suivre pour la fabrication de souris transgéniques de type *Drd1a-tdTomato*. Leur protocole étant très spécifique, j'ai repris ci-après les étapes suivies.

La majorité du génome de souris est cloné sous forme de grands fragments de 150 à 200 kilobases dans les chromosomes bactériens artificiels (BACs). Un vecteur de transport est utilisé pour modifier le BAC par recombinaison homologue dans *Escherichia coli*. Ce vecteur contient une origine de répllication conditionnelle (Ori), un gène *recA* pour

supporter la recombinaison, des gènes de sélection positive et négative et une cassette de recombinaison contenant deux petites boîtes d'homologie A et B encadrant une cassette de modification qui transporte les éléments devant être insérés dans le BAC.

En résumé, le BAC d'intérêt est sélectionné et le premier exon codant du gène cible est remplacé par une cassette qui code pour la protéine d'intérêt et un marqueur de sélection, à travers une recombinaison homologue dans la bactérie *Escherichia coli*. Le BAC modifié est ensuite injecté dans des oocytes fertilisés où il sera intégré aléatoirement dans l'ADN chromosomique. Les œufs microinjectés sont alors transplantés dans l'oviducte d'une femelle pseudogestante. Le transgène est porté par 20 à 30% des descendants, de façon commune connus comme les fondateurs. Pour établir les lignées de souris transgéniques, les fondateurs sont ensuite accouplés avec des souris de génotype sauvage et 50% des descendants vont hériter du BAC (**cf. figure 4**).

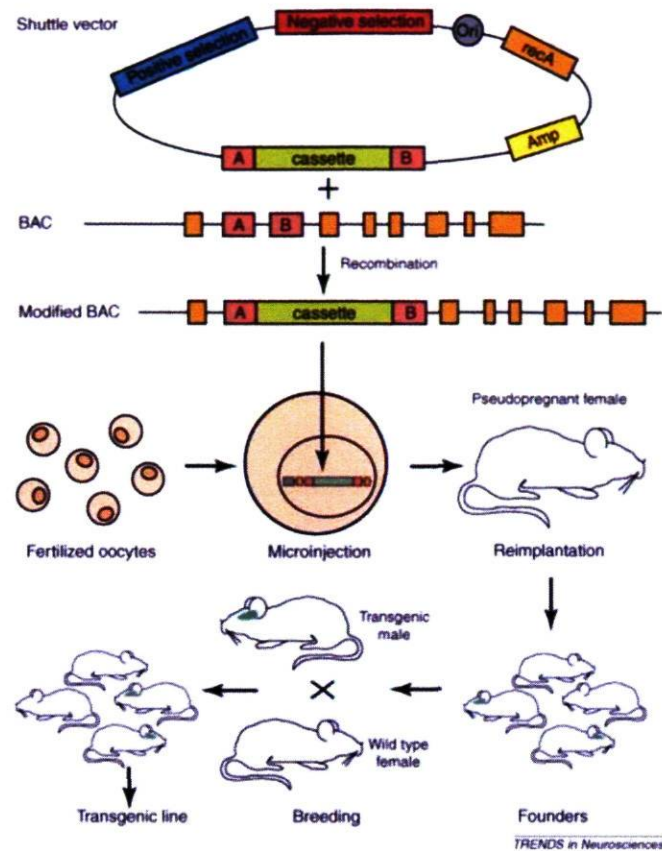


Figure 4 - Représentation schématique de la « fabrication » d'une lignée de souris transgénique

Un vecteur-navette est fabriqué et va être recombiné de façon homologe dans la bactérie *Escherichia coli* avec le chromosome bactérien artificiel (BAC). Le BAC modifié est ensuite microinjecté dans des oocytes fertilisés qui sont par la suite implantés dans une femelle pseudogestante. Cette dernière donnera ensuite naissance à 20 à 30 % de fondateurs qui seront ensuite recroisés avec des phénotypes sauvages pour donner naissance à la lignée transgénique. Image issue de *Trends in neuroscience* (Shuen *et al.*, 2008).

L'utilisation de sites d'entrée ribosomales internes (IRES) peut permettre l'expression de multiples protéines d'intérêt. La grande taille des BACs augmente les chances qu'ils incluent les séquences régulatrices nécessaires au patron d'expression similaire à celui du gène endogène. Ils ont en général un faible nombre de copies et sont beaucoup moins sensibles aux variations du patron d'expression dépendant du site d'insertion (effets positionnels) que les petits plasmides. Des problèmes ont été soulevés sur ce système : il est nécessaire de suivre un nombre suffisant de lignées avant que le patron d'expression correct

soit obtenu, les gènes endogènes peuvent être interrompus au site d'insertion. De plus, l'expression de transgènes est sensible au nombre de copies et aux sites d'insertion. Ce fait explique qu'une décroissance des niveaux d'expression avec le temps dus à une modification de l'ADN étranger ou de possibles effets toxiques du gène rapporteur ont aussi été rapportés (Shuen *et al.*, 2008).

Dans mon cas, le modèle utilisé pour attester que ma culture était bien du striatum est la lignée de souris D1-TOM/D2-GFP. Il s'agit d'une souris double BAC transgénique issue de croisement entre des souris BAC transgénique *Drd1a-tdTomato*² (Shuen *et al.*, 2008) qui présentent une expression du chromophore tomato placée sous le contrôle du promoteur du récepteur D1R et des souris D2R-EGFP (Gong *et al.*, 2003) qui présentent une expression du chromophore EGFP soumise aux régulations du promoteur du récepteur D2R. L'intérêt principal de cette culture est que suivant le niveau d'expression de l'un ou l'autre des types de récepteurs, le neurone va synthétiser plus ou moins de chromophore et par conséquent avoir une coloration visible en fluorescence. Ce système permet grâce à deux marqueurs différents de visualiser et distinguer avec certitude les types de neurones striataux de projection dont les voies directe D1 et indirecte D2 sont issues. En effet, en théorie, chez les rongeurs, les récepteurs dopaminergiques de type 1a et de type 2 sont ségrégués sur la voie directe et indirecte respectivement (Shuen *et al.*, 2008). De plus, les récepteurs restent, en principe, fonctionnels ce qui permet de les stimuler à l'aide d'un agoniste ou de les bloquer à l'aide d'un antagoniste afin de mettre en évidence les relations existant entre les récepteurs dopaminergiques et leurs effecteurs moléculaires.

2.2 Culture de neurones sur lamelles

Afin de réaliser mon projet, je suis passée par une première étape de validation décisive qui est celle de vérifier que la culture de neurones de striatum est possible. Pour attester du bon prélèvement de striatum j'ai utilisées les souris transgéniques D1-TOM/D2-

² La *Drd1 a-tdTomato* est une protéine fluorescente de couleur rouge qui est dérivée de la *DsRed* (Shaner *et al.*, 2004).

GFP. L'expertise à cet effet n'étant pas disponible au laboratoire, j'ai dû y importer la technique de culture cellulaire de neurones. La méthode utilisée fut celle de la coculture. En effet, dans cette culture, les astrocytes servent de cellules de soutien et nourricières aux neurones.

2.2.1 Préparation des lamelles

Le protocole suivi est une adaptation de celui de Francine Nault du laboratoire du Dr. Paul De Koninck (Francine Nault et Paul de Koninck, 2010). Les lamelles sont découpées dans un matériau s'appelant l'Aclar® 10mm. Ce matériau présente une bonne résistance mécanique et des propriétés optiques sensiblement similaires à celles du verre en microscopie. Après découpe à l'aide de punch sur une plaque de téflon, les lamelles subissent trois rinçages dans de l'eau stérile puis trois dans de l'éthanol à 70% et enfin trois autres dans l'eau stérile. Tous les rinçages sont effectués sous agitation pendant plusieurs heures. Les lamelles sont ensuite enduites de Poly-D-lysine (PDL) à 100 µg/mL toute la nuit sous agitation constante. Elles sont ensuite rincées trois fois dans l'eau stérile puis séchées en dessous d'une lampe ultraviolette sous hotte biologique pendant 30 minutes au minimum ou toute la nuit. Elles sont ensuite déposées en conditions stériles dans le fond des puits des plaques douze ou six puits. Les produits et solutions utilisés sont les mêmes que ceux mentionnés dans la publication de Francine Nault et Paul DeKoninck, éditée en 2010 (Francine Nault et Paul de Koninck, 2010).

2.2.2 Ensemencement et entretien de la culture

Le protocole suivi est une adaptation du protocole de Banker (Banker GA, Cowan.MW, 1977) et de Francine Nault (Francine Nault et Paul de Koninck, 2010). Les cerveaux sont prélevés sur des souriceaux entre le jour de la naissance et le quatrième jour après la naissance. Les animaux sont tués selon les règles en vigueur à l'Université Laval et le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de cette institution. Une fois morts, la tête des souriceaux est coupée au niveau du cou. La peau du crâne est coupée en deux en position sagittale, même chose pour l'os du crâne en passant par le canal de la moelle épinière. Le cerveau est prélevé puis coupé en deux dans le sens sagittal dans une solution

de dissection. Le prélèvement striatal est effectué à l'aide d'un scalpel toujours dans la même solution. Ces prélèvements sont ensuite coupés en petits morceaux avec le scalpel puis incubés dans une solution de papaïne pendant 15 à 20 minutes contenant aussi de la DNase. Seuls les morceaux sont récupérés et placés dans une solution de trituration contenant de la BSA et de la DNase. On procède ensuite à la trituration avec une pipette pasteur dont la pointe a été préalablement passée dans la flamme (pour la rendre mousse) jusqu'à ce que le milieu devienne trouble (< 20 fois). Cette solution est laissée à sédimenter pendant deux minutes puis le surnageant est prélevé et mis dans un nouveau tube. L'opération est recommencée deux fois à l'aide de 2 mL de milieu de trituration à chaque fois (cf. annexes et Francine Nault et Paul de Koninck, 2010). Le surnageant est séparé en 4 tubes puis centrifugé à 300 G pendant cinq minutes. Ensuite, le nouveau surnageant est retiré et les culots cellulaires sont resuspendus très doucement dans du milieu de culture. Après dilution au $1/5^{\text{ème}}$ dans le bleu trypan (Sigma), les cellules sont comptées sur un Hémacytomètre ou une cellule de Mallassez. Le nombre de ces cellules présentes au niveau de quatre carreaux est évalué en faisant le calcul suivant $(N/4) \times 5 \times 10\ 000$, on obtient le nombre de cellules par mL. Puis les cellules sontensemencées au nombre de 250 000 par puits. Finalement, chaque puits est complété à 2 mL pour une plaque de 12 puits et à 4 mL pour une plaque de 24 puits, avec du milieu NBC additionné de 5% à 10% de sérum de veau fœtal. Au bout de 48 heures, l'Ara-c est introduit à la concentration de 5 μM final dans la culture pour empêcher la prolifération astrocytaire. La moitié du volume de milieu est changé tous les deux à trois jours (Francine Nault et Paul de Koninck, 2010). Les produits et solutions utilisés sont les mêmes que ceux mentionnés la publication de Francine Nault et Paul DeKoninck, éditée en 2010 (Francine Nault et Paul de Koninck, 2010).

Les stimulations effectuées pour l'article de Swift *et al.*, 2011 ont été effectuées à 14 jours de culture. Le milieu est remplacé par du NBC contenant les différentes drogues à la concentration désirée. L'apomorphine (Sigma) est un agoniste des récepteurs D2R dilué dans une solution de NBC sans sérum contenant 0,1% d'acide ascorbique qui sert à éviter l'oxydation de la molécule. Cette solution d'acide ascorbique (Sigma) à 0,1% sert également de contrôle. Le BDNF (Prospec) est un ligand des récepteurs TrkB utilisé à une

concentration finale de 50 pM dans le NBC sans sérum. Les cellules sont mises à l'incubateur pendant trois minutes. L'inhibiteur de tyrosine kinase sélectif des EGFR (dont TrkB fait partie) AG1478 est utilisé à 0,2 mM dans le NBC sans sérum pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, on procède directement à la fixation avec le paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma).

2.2.3 Immunocytochimie

Une fois cette culture obtenue, j'ai pratiqué une immunocytochimie sur les neurones. Les cellules adhérant sur les lamelles sont fixées dans la PFA 4% pendant quinze minutes puis rincées trois fois avec du PBS (InVitrogen) pendant dix minutes. Si les épitopes antigéniques à marquer sont extracellulaires, une étape de blocage est réalisée avec seulement du goat serum 2% dans le PBS pendant 45 minutes. En revanche, si les épitopes antigéniques à marquer sont intracellulaires, une étape de perméabilisation/blocage est réalisée avec un détergent, le Triton X-100 (InVitrogen) à 0,1% additionné de goat serum (InVitrogen) à 2% dans le PBS pendant 45 minutes. Ensuite, les cellules sont mises en contact avec l'anticorps primaire dans la même solution que précédemment pendant toute la nuit à 4°C. Il s'ensuit trois rinçages dans le PBS de dix minutes chacun. Les cellules sont ensuite mises en contact pendant 45 à 60 minutes avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de perméabilisation/blocage ou solution de blocage en fonction de l'épitope à cibler. Il faut alors procéder à trois rinçages de dix minutes dans le PBS. La dernière étape étant le montage lamelle sur lame avec la solution de montage vectashield®. La liste des anticorps utilisés est insérée dans le protocole d'immunocytochimie disponible en annexe.

Pour visualiser un troisième marquage, il faut utiliser une longueur d'onde éloignée des spectres des deux autres molécules fluorescentes que sont tdTomato et EGFP. Pour cela j'ai utilisé un marquage avec un anticorps secondaire Alexa 647. Comme on peut le constater sur la **figure 5**, son spectre ne génère pas de recouvrement avec celui des deux autres molécules. Les pics d'excitation et d'émission étant bien individualisés pour les trois molécules, aucune interférence d'un marquage avec un autre ne devrait donc, en théorie, être observée en microscopie confocale. Les lamelles ont été observées avec un microscope confocal axovision LSM Zeiss.

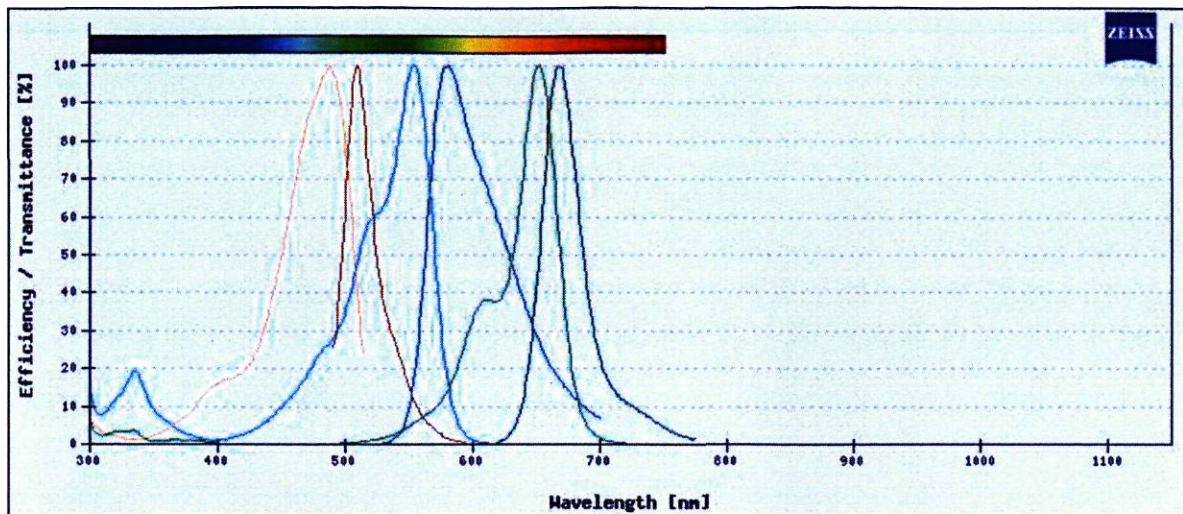


Figure 5 - Spectres d'absorption et d'émission de tdTomato, EGFP et Alexa 647

De gauche à droite : spectre d'absorption (à gauche) et d'émission (à droite) sont visibles en marron pour EGFP puis en bleu pour tdTomato et enfin en vert pour Alexa 647. On peut constater qu'on a deux pics bien individualisés pour chaque fluorophore ce qui nous permet de considérer qu'aucun des marquages ne fera des interférences avec les autres. Source : https://www.micro-shop.zeiss.com/us/us_en/spektral.php

2.3 Culture de neurones en plaque de 96 puits

2.3.1 Mise en culture et entretien

Afin d'éviter les redondances avec la culture cellulaire sur lamelles, vous trouverez en annexe le protocole de culture cellulaire en plaque de 96 puits. Néanmoins, nous avons modifiés les points qui suivent. Cette culture est réalisée avec des embryons et non des nouveau-nés. Les embryons sont prélevés dans une femelle gestante sous anesthésie par isoflurane. La femelle est ensuite tuée par dislocation cervicale. Puis, on place le sac vitellin contenant les embryons dans le HBSS (InVitrogen) glacé. L'incubation dans la solution de papaïne se déroule pendant un temps moindre allant de cinq à dix minutes en fonction de l'âge des embryons. Avant l'ensemencement, le fond des puits a été préalablement enduit de PDL durant toute la nuit puis rincé trois fois pendant une heure avec de l'eau stérile. Chaque puits est complété avec du milieu de culture Lonza ou NBC (InVitrogen) additionné de 5% de sérum de veau fœtal et d'antimitotiques à 200 µlitre de

volume final. La moitié du volume de milieu est changé tous les deux à trois jours en fonction de l'aspect de la culture (après un temps d'attente de sept jours dans le cas du Lonza). Les concentrations d'antimitotiques utilisées sont données dans les protocoles en annexe.

2.3.2 Stimulation, fixation et immunocytochimie

Le milieu de culture doit être changé six heures avant la stimulation effectuée à 12 jours de culture avec 100 μ L de NBC sans sérum par puits. Ceci permet de retirer tout élément en excès pouvant nuire à la stimulation (tel le glutamate) et de mettre tous les puits dans les mêmes conditions de milieu (même taux de nutriments, même taux de gaz, même taux de tampon carbonate). Certains puits sont stimulés avec 100 μ L de NBC contenant les drogues au double de la concentration désirée. LY294002 (LY, Sigma) inhibiteur des phosphatidylinositol PI3 kinases est utilisé à la concentration de 100 μ M. BpVphen (Sigma) inhibiteur potentiel de protéine phosphotyrosine phosphatase et activateur de kinase de récepteur à l'insuline (IRK) est utilisé à la concentration de 60 μ M. Puis, la fixation est effectuée pendant cinq minutes avec de la Paraformaldéhyde 16 ou 8% dont la dilution dans le puits donne une concentration finale de 4%. On procède alors à trois rinçages de cinq minutes avec du PBS additionné d'acide okadaïque (Tocris) à la concentration finale de 30. 10^{-3} μ M. Ce dernier est un inhibiteur de la phosphatase PP2A empêchant donc la déphosphorylation des protéines phosphorylées telle GSK-3 que j'investigue. Suivra une étape de perméabilisation et de blocage avec une solution de Triton X-100 à 0,1%, goat serum à 2% et Tween à 0,1% dans le PBS contenant de l'acide okadaïque à la concentration mentionnée précédemment. Cette étape se déroulera pendant 30 minutes et sera utilisé 100 μ L de cette solution par puits. Par la suite, on réalise une incubation avec 25 μ litres d'anticorps primaire toute la nuit dans la solution précédente avec une agitation douce à température ambiante. Pour éviter « l'effet de bord » les puits de la périphérie ont été laissés vides de toute cellule et sont remplis d'H₂O. La plaque est scellée avec du parafilm pour éviter l'évaporation de la solution et le dessèchement des puits en résultant. On procède ensuite à cinq rinçages de moins de cinq minutes dans le PBS pour finir par une incubation avec 25 μ litres de solution de perméabilisation/blocage contenant l'anticorps

secondaire pendant 45 minutes à une heure avec une agitation douce. On termine avec cinq nouveaux rinçages de moins de cinq minutes dans une solution PBS/Tween 0,2%. Ce n'est qu'une fois que les puits sont complètement séchés que l'on peut procéder à la lecture au LI-COR [6]. Dans le cas d'une immunocytochimie réalisée pour observation au microscope, on suit les règles de l'immunocytochimie sur lamelles. Les plaques ont été observées au microscope inversé à fluorescence de marque Olympus. Les anticorps utilisés sont présentés dans le protocole d'immunocytochimie en annexe.

2.4 Principe du LI-COR et son analyse quantitative de la réponse à la stimulation

Le LI-COR est une technique d'immunofluorescence quantitative permettant l'analyse simultanée de deux différentes protéines cibles in-situ, en culture cellulaire fixée, par la quantification du signal de fluorescence totale dans chaque puits (cf. **figure 6**).

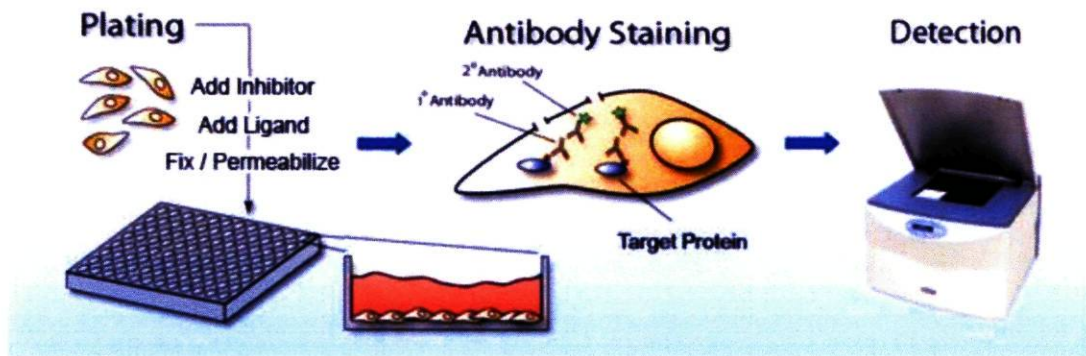


Figure 6 - Schéma représentatif du principe d'utilisation du LI-COR

Les cellules sont ensemencées directement dans le fond des puits d'une plaque de 96 puits sur lequel elles croissent. On procède ensuite à la stimulation avec un ligand ou un inhibiteur sur la culture cellulaire avant de les fixer et perméabiliser. Le marquage est ensuite effectué avec les anticorps primaires allant cibler les protéines d'intérêt. Il se poursuit par les deux types d'anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires. Les anticorps secondaires portant chacun un fluorophore qui fluoresce respectivement à 680 nm et à 800 nm. Les cellules sont ensuite séchées et analysées au LI-COR. Cet appareil contient des lasers permettant l'analyse aux bonnes longueurs d'ondes des marquages effectués dans chaque puits. Source : Paul Jasper, Harvard [7].

En dessous de 700 nm, l'absorption lumineuse due aux composés tissulaires résulte en une faible profondeur de pénétration de quelques millimètres. Or, le principe du LI-COR permet de s'affranchir de ces limitations puisque le coefficient d'absorption lumineuse des tissus est considérablement plus petit dans la région du proche infrarouge (700 à 900 nm). Ce procédé va donc nous permettre la réduction des interférences dues à l'autofluorescence des cellules, des lipides, de la microplaque et des composés chimiques. Les cellules sont marquées avec deux anticorps secondaires contenant des fluorophores fluorescents dans l'infrarouge qui sont spécifiques pour les longueurs d'onde utilisées par LI-COR. Ce marquage va ensuite être scanné par l'appareil qui contient deux lasers dédiés qui vont aller chacun stimuler un fluorophore, puis, l'appareil va récolter et quantifier la réponse lumineuse. Pour analyser le résultat de fluorescence total dans chaque puits, un ratio doit être fait dans les résultats de quantification obtenus grâce aux deux canaux infrarouges différents (dans notre cas une protéine phosphorylée sur une protéine totale). Source: [7].

2.5 Analyse statistique des résultats

La lecture de la plaque au LI-COR nous donne des intensités de fluorescence dans chaque puits. Ces intensités nous permettent de calculer les rapports qui sont de type intensité de fluorescence de la protéine phosphorylée sur intensité de fluorescence de la protéine totale. La différence entre les rapports des intensités de fluorescence mesurées dans chaque puits au LI-COR est analysée entre deux conditions de stimulation à chaque fois en réalisant un test de Student. Les différences entre les rapports sont considérées statistiquement significative dès que $P < 0.05$, hautement significatives dès que $P < 0.01$ et très hautement significatives dès que $P < 0.001$. Pour le projet, les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPadPrism pour Windows (v.5.01, GraphPad Software, San Diego, CA).

Chapitre 3 : Résultats

Nous venons de détailler les différentes méthodes et le matériel utilisé tout au long de ma maîtrise. Différentes étapes furent accomplies successivement et deux types de culture réalisées. La première fût la culture cellulaire de striatum sur lamelles obtenue à partir de souris transgéniques nouveau-nés D1-TOM/D2-GFP. La deuxième fût la culture de striatum d'embryons de souris en plaque de 96 puits avec stimulation suivie de fixation, marquage et enfin lecture de ce dernier par l'appareil LI-COR. Ces méthodes visaient, je vous le rappelle, à répondre aux différentes questions posées, telles, la culture de striatum issue des nouveau-nés de souris présente-t-elle les mêmes caractéristiques et populations neuronales que le striatum trouvé chez l'animal? Les neurones dopaminergiques de la culture de striatum sont-ils stimulables par un agoniste dopaminergique? Cette stimulation vise-t-elle le D2R? La même culture est-elle viable en plaque de 96 puits? Cette nouvelle culture est-elle stimulable sur la voie de signalisation D2R-AKT-GSK-3? Nous allons ainsi voir dans ce chapitre les résultats obtenus pour chacune des deux méthodes.

3.1 Culture de neurones sur lamelles

3.1.1 Composition de la culture de striatum de souris

Afin de vérifier que le prélèvement de striatum était bien réalisé j'ai utilisé les souris transgéniques D1-TOM/D2-GFP. La culture montrait beaucoup de neurones verts et rouges en fluorescence attestant de la nature striatale du prélèvement. Une fois cette culture obtenue, j'ai pratiqué une immunocytochimie sur ces cellules. NeuN qui est un antigène nucléaire me permet de voir tous les neurones et de les différencier des astrocytes. En comparant la **figure 7a** et la **figure 7b** on s'aperçoit qu'un certain nombre de neurones ne contiennent pas de fluorescence endogène. Ce résultat est attendu puisque j'utilise un mélange de striatum issus de tous les embryons de la portée dont certains n'expriment pas ou très peu le transgène. Le deuxième marqueur investigué est GAD, l'enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en GABA dans les MSNs, les interneurons striataux mais aussi

dans les astrocytes et les microglies (Lee et al., 2011). Sur le **cliché 7d** on voit un marquage très ponctiforme et diffus ne concernant pas seulement les neurones du **cliché 7c**. Ce marquage semble être présent non seulement dans les neurones et leurs terminaisons mais aussi dans les astrocytes ce qui rend son observation difficile. Le troisième marquage, DARPP32, qui est exprimé dans les MSNs exprimant le récepteur D1R est présent dans beaucoup de neurones et marque aussi bien les rouges que les verts (cf. **figures 7e et 7f**), ce qui est documenté (Shuen et al., 2008).

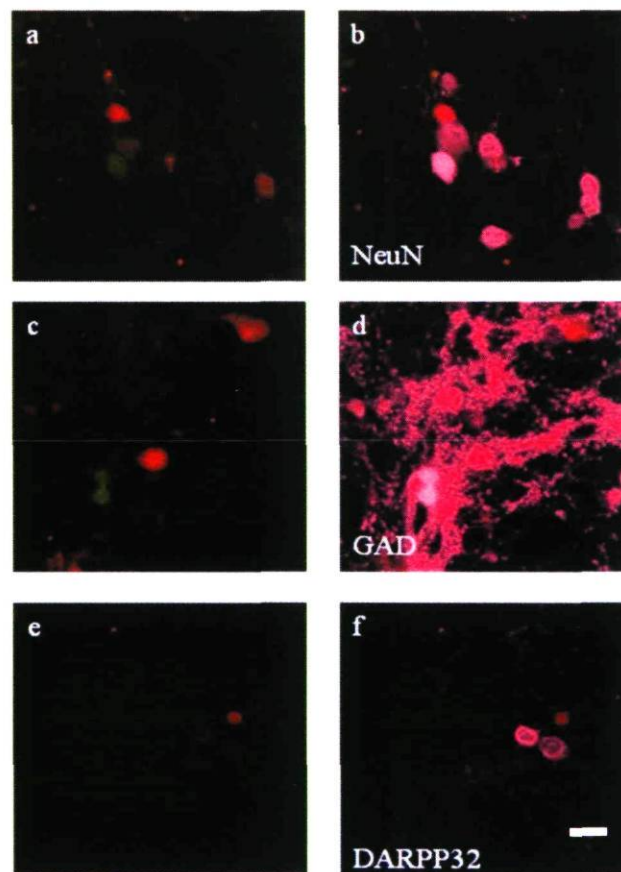


Figure 7 - Marquages obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés avec NeuN, GAD et DARPP32

Panneaux **a à f** : neurones exprimant les marqueurs D1R-tdTomato et D2R-EGFP en culture âgés de 14 jours. Les panneaux sont organisés par paire où les clichés de gauche (**a, c, e**) montrent la fluorescence D1-TOM visualisée en rouge et D2-GFP visualisée en vert tandis que le cliché de droite présente la fluorescence dans les trois longueurs d'ondes. Le

panneau b nous montre un marquage NeuN qui figure les noyaux des neurones. On remarque la présence de neurones marqués par NeuN et présentant pas ou peu de fluorescence. Le **panneau d** montre un marquage GAD qui figure les neurones fluorescents mais aussi d'autres neurones ainsi que ce qui semble être les astrocytes avec un aspect en toile d'araignée. Le **panneau f** présente un marquage de DARPP32 qui cible les MSNs. Ce marquage, bien que censé marquer les neurones rouges ne marque pas celui présent à l'image mais marque deux autres neurones dont la fluorescence endogène est très faible. Ce neurone rouge est très certainement un neurone en dégénérescence. Sur tous les clichés nous pouvons apprécier la faiblesse du marquage endogène. Barre d'échelle 15µm.

L'enzyme suivante me renseigne sur la composition en interneurones cholinergiques: ChAT enzyme de synthèse de l'acétylcholine présente dans le corps cellulaire. Sur les **figures 8e et 8f** on observe beaucoup de neurones ChAT positifs. Néanmoins, lors du comptage final ils se sont révélés peu nombreux.

Enfin, trois cibles nous renseignent sur la présence de neurones provenant d'autres régions anatomiques que le striatum: la TyrOHase ou enzyme catalysant la transformation de tyrosine en L-DOPA (précurseur de la dopamine présent uniquement dans les neurones dopaminergiques) ainsi que VMAT2 transporteur vésiculaire présynaptique de la dopamine, mais aussi DAT transporteur actif de recapture présynaptique de la dopamine. Le marquage TyrOHase montre la présence de neurones dopaminergiques peu nombreux (cf. **figure 8h** comparativement à **8g**) et de marquage non-spécifique du corps cellulaire des neurones fluorescents. Les marquages VMAT2 et DAT ressemblent aux contrôles obtenus sur la même culture avec l'anticorps secondaire Alexa 647 seulement. Je considère donc qu'il s'agit dans les trois cas (TyrOHase, VMAT-2 et DAT) d'un marquage non-spécifique dû à un anticorps secondaire dirigé contre la souris ou le rat reconnaissant peut-être un épitope antigénique similaire sur les cellules de souris (cf. **figure 8d et 8b**).

Ensuite, j'ai procédé à des comptages sur 200 neurones rouges et verts au total sur trois cultures successives. Ma culture contenait majoritairement des neurones dopaminoceptifs attestés par la fluorescence endogène ainsi que des neurones GABAergique en très grand nombre visualisés par le marquage GAD positif et enfin des Medium Spiny Neurons (MSNs ou neurones épineux moyens) très nombreux (>85%) attestés par le marquage DARPP32 (cf. **figure 7**). Elle contenait également moins de 5% de neurones tyrosine hydroxylase positifs (cf. **figure 8h**) et moins de 10% de neurones

acétylcholine positifs (cf. **figure 8g**, problème de marquage à considérer ici aussi), ceci attestant de la qualité de la dissection du striatum. En effet, les interneurons cholinergiques et tyrosine hydroxylase ne doivent représenter que moins de 5 à 10% du total des neurones (Gerfen *et al.*, 1992, Lobo *et al.*, 2009). Les marquages VMAT2 et DAT étaient présents et concernaient même les MSNs transgénique. Ils ressemblaient au contrôle dans lequel on voyait l'Alexa 647 adhérer au corps cellulaire des neurones donc j'ai considéré que le marquage était très peu présent, ce qui allait aussi dans le sens d'une qualité acceptable de préparation. Notez que certains neurones fluorescents semblent ne pas être des MSNs mais des interneurons (cf. **figure 8f**), ceci est dû à la non-spécificité du marquage de l'anticorps secondaire Alexa 647.

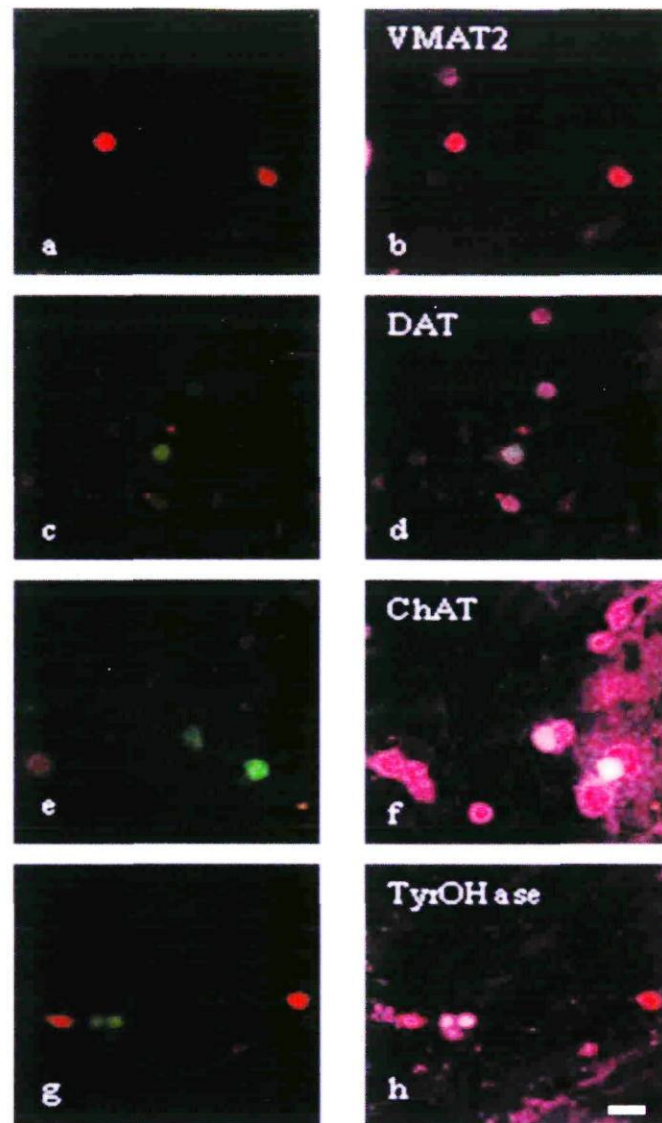


Figure 8 - Marquages obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés avec VMAT2, DAT, ChAT et TyrOHase

Panneaux a à h : neurones exprimant les marqueurs D1R-tdTomato et D2R-EGFP en culture âgés de 14 jours. Les panneaux sont organisés par paire où le cliché de gauche montre la fluorescence D1-TOM visualisée en rouge et D2-GFP visualisée en vert tandis que le cliché de droite présente la fluorescence dans les trois longueurs d'ondes. Le **panneau b** nous montre un marquage VMAT2 qui cible tous les neurones. Le **panneau d** montre un marquage DAT ciblant aussi tous les neurones. Le **panneau f** présente un marquage ChAT qui semble représenter beaucoup de neurones. Le **panneau h** montre un marquage TyrOHase. Les neurones TYrOHase sont très peu nombreux, un seul semble spécifique et est visible sous les 2 verts de la **figure 8g**, les autres correspondent à du marquage non-spécifique. Les **panneaux b et d** nous montrent du marquage qui correspond à un marquage non spécifique par l'anticorps secondaire du corps cellulaire de tous les neurones sans distinction. Barre d'échelle 15µm.

Pour finir, les marquages tdTomato et en particulier EGFP (cf. figure 9) sont relativement faibles et nécessitent une amplification avec respectivement un anti-DsRed et un anti-GFP.

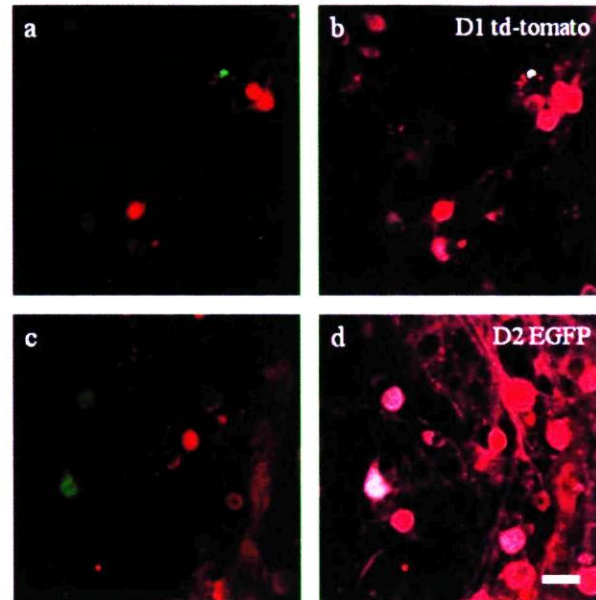


Figure 9 - Marquages td-Tomato et EGFP obtenus en immunocytochimie sur la culture de neurones de striatum de souris nouveau-nés

Panneaux a à d : neurones exprimant les marqueurs D1R-tdTomato et D2R-EGFP en culture âgés de 14 jours. Les panneaux sont organisés par paire où le cliché de gauche montre la fluorescence D1-TOM visualisée en rouge et D2-GFP visualisée en vert tandis que le cliché de droite présente la fluorescence dans les trois longueurs d'ondes incluant le marquage supplémentaire. Le **panneau b** nous montre un marquage ciblant la molécule td-Tomato. Nous pouvons constater que ce marquage n'est pas spécifique aux neurones visibles en rouge et donc exprimant td-Tomato. Le **panneau d** montre un marquage ciblant la molécule EGFP. Nous pouvons également remarquer que ce marquage n'est pas spécifique aux neurones verts exprimant EGFP. Barre d'échelle 15 µm.

Malheureusement, seul le marquage anti-DsRed fonctionnait, l'anticorps anti-GFP étant soit non-spécifique (toutes les cellules marquées) avec le lapin anti-GFP, soit spécifique mais trop sporadique (une cellule marquée sur vingt) avec le souris anti-GFP. Ce marquage n'était donc pas fiable (cf. **figure 9** ci-avant). Le comptage de cellules exprimant D1R versus cellules exprimant D2R était de ce fait impossible. De même, les tentatives de marquage sur des cellules D1-TOM/D2-GFP de D1R et D2R se sont révélées infructueuses

car les anticorps anti-D1R et anti-D2R n'étaient pas spécifiques. En effet, une vérification de ces derniers a montré qu'ils marquaient respectivement des neurones de souris D1R KO et D2R KO, ce qui est en principe impossible puisque le KO n'exprime pas le récepteur. Un comptage cellulaire a quand même été tenté avec les anti-GFP lapin et anti-DsRed sur 500 neurones (dans des cultures de neurones embryonnaires et adultes) et a donné un rapport de deux tiers en faveur des neurones D2-GFP.

3.1.2 Utilisation de la méthode de culture neuronale pour l'étude de la transactivation du récepteur de BDNF par les récepteurs de la dopamine

En qualité de co-auteure sur le travail de Swift *et al.* édité en 2011, j'ai été amenée à réaliser la culture de neurones de striatum de souris nouveaux nés, les stimulations, les marquages ainsi que certains clichés (cf. **Figure 10**) pour l'article. Le but de cette collaboration était de confirmer sur un modèle « plus physiologique » qu'est le neurone les résultats obtenus en cellules CHO-k1 transfectées. En effet, le neurone contrairement aux cellules CHO-k1 comprend déjà toutes les molécules impliquées dans la voie D2R-AKT-GSK-3 ainsi que leurs effecteurs intermédiaires et ne nécessite pas de transfection pour les synthétiser. Les résultats ont démontré que le SpIDA détectait mais aussi permettait de quantifier la dimérisation et la transactivation des EGFRs par les GPCRs.

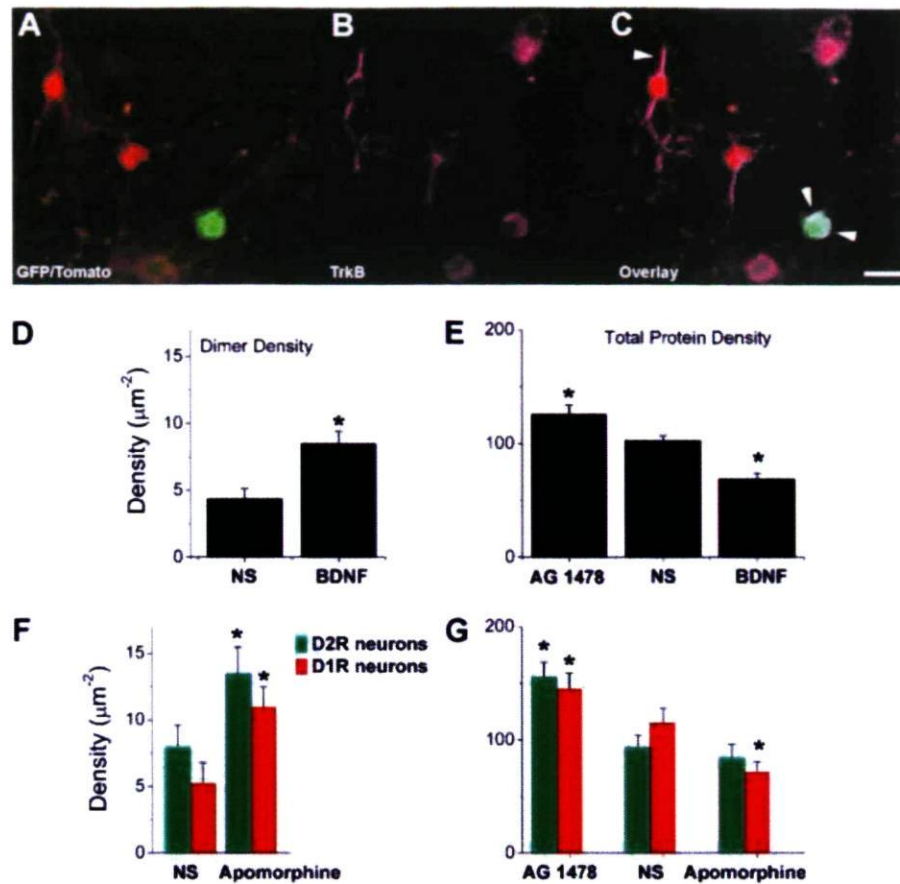


Figure 10 - Transactivation des récepteurs TrkB endogènes par les récepteurs dopaminergiques endogènes après stimulation visible au SpIDA. Image issue de Swift and al. 2011 (Swift *et al.*, 2011).

Les images A à C représentent une immunodétection de surface de TrkB endogène dans la culture de neurones striataux obtenue à partir de souris transgéniques D1R-tdTomato/D2R-EGFP. Les pointes de flèches sur le panneau C montrent le marquage TrkB à la surface des neurones. Le panneau D montre la densité de dimères de TrkB et le panneau E, la densité de protéines totale à la surface des neurones après incubation avec AG1478 à 0.2 mM pendant 30 minutes à 37°C (n = 31), en condition non-stimulée (n = 93) et après stimulation directe par du BDNF (n = 37). Le panneau F représente l'analyse en SpIDA des dimères de TrkB et le panneau G représente la densité de surface des neurones après incubation avec AG1478 à 0.2 mM pendant 30 minutes à 37°C (D2R n = 30 et D1R n = 33), en condition non-stimulée (D2R n = 19 et D1R n = 26) et après stimulation des récepteurs dopaminergiques endogènes avec l'apomorphine à 2 μM pendant 3 minutes à 37°C (D2R n = 33 et D1R n = 38). Image extraite de Swift *et al.*, 2011. Barre d'échelle 15 μm.

Comme montré sur les **figures 10D et 10E**, la stimulation avec du BDNF, ligand des récepteurs TrkB, a entraîné une augmentation de la dimérisation de ceux-ci et une réduction de leur expression à la surface des neurones. De façon similaire dans la **figure 10F**, la stimulation avec de l'apomorphine a grandement favorisé la dimérisation des récepteurs TrkB endogènes dans les neurones exprimant soit D1R ou D2R, les faisant passer de 5 à 8 μm^2 . Ceci prouve que les récepteurs dopaminergiques endogènes peuvent transactiver les récepteurs TrkB endogènes dans les neurones du striatum et que le SpIDA peut être utilisé afin de détecter ce phénomène. L'AG1478, un inhibiteur sélectif et réversible des récepteurs EGFR aux tyrosines kinases, a augmenté l'expression des récepteurs tyrosine kinase en surface dans les neurones exprimant D1R et D2R à leur surface comme ce fut le cas dans l'étude menée sur les cellules CHO-k1 (cf. **figures 10E et 10G**). Ces derniers passent de 125 à un peu plus de 150 μm^2 après stimulation.

Ce travail démontre que la stimulation est possible sur la culture de neurones transgéniques étudiée. Néanmoins, les quantités de réactifs utilisées étant importantes, pour des questions de rentabilité, nous avons décidé de miniaturiser les conditions de manipulation. C'est la raison pour laquelle l'adaptation du protocole en culture dans les plaques de 96 puits, méthode vue ci-après, paraît plus appropriée à atteindre cet objectif de minimisation des coûts.

3.2 Adaptation du protocole pour la culture en plaque de 96 puits

J'ai utilisé deux milieux de culture différents dans le but de reproduire les résultats d'Anthony Krantis et William Staines présentés à la 42^{ème} rencontre de la Société de Toxicologie du 21 au 25 Mars 2003, Nashville, Tennessee USA San Diego en 1998. Sur cette présentation par affiches, le groupe montrait l'aspect de deux cultures obtenues en plaque de 96 puits, l'une étant une coculture et l'autre non (cf. figure 11 ci-après). Ce type de culture fût d'ailleurs réutilisé par les mêmes auteurs dans une publication postérieure en 2011.

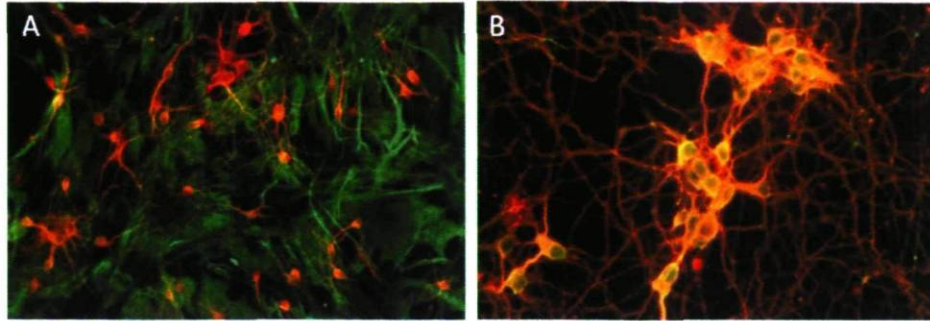


Figure 11 - Cultures de neurones modèles de Krantis

Sur le cliché de gauche, nous pouvons observer une coculture où un tapis d'astrocytes servent de cellules de soutien et nourricière aux neurones très peu nombreux et parsemés (**figure A**). Le marquage employé est GFAP en vert qui marque les astrocytes et Tuj-1 marquant les neurones en rouges. Sur le cliché de droite, le tapis d'astrocytes est absent (ou réduit au minimum) et les neurones sont regroupés pour survivre (**figure B**). Le marquage employé est PGP9.5/Tuj-1 marquant les neurones tous les deux. Clichés issus de l'affiche de présentation d'Anthony Krantis et William Staines présentée à la 42^{ème} rencontre de la Société de Toxicologie du 21 au 25 Mars 2003, Nashville, Tennessee USA San Diego en 1998.

Alors que nous n'arrivions pas à conserver les neurones de nouveau-nés plus de sept jours en culture en plaque de 96 puits, les neurones embryonnaires prélevés entre 14 et 18 jours de gestation se conservent plus de trois semaines avec les nouvelles conditions de culture. J'ai procédé à un marquage de l'axone des neurones par un anticorps anti-Tau en rouge et marqué les astrocytes avec un anticorps anti-GFAP en vert (cf. **figures 12A, 12B, 12C, 14C et 14D**). Puis, j'ai réalisé un marquage de l'axone des neurones par un anticorps anti-Tau en rouge et marqué en vert les dendrites avec un anticorps anti-MAP-2 (cf. **figures 13A, 13B, 13C, 13D, 14A et 14B**). Les résultats ont été obtenus chacun sur trois puits, reproduits sur trois cultures différentes et servaient de contrôle pour s'assurer de la reproductibilité des conditions.

3.2.1 Milieu Lonza

Les **figures 12 et 13** présentent les résultats obtenus avec un milieu de culture Lonza (contenant du NGF ou Nerve Growth Factor). On observe des neurones regroupés en cluster ou « structure pseudo-ganglionnaire », des câblages d'axones entre ces sphères et

une petite couronne dendritique entourant la sphère ganglionnaire. Le regroupement des neurones leur permet de se protéger mutuellement en profitant des facteurs de croissance et des neurotransmetteurs sécrétés par les autres neurones. Les astrocytes sont de très petite taille comparativement au milieu neurobasal additionné de 5% de FBS. Ceci est certainement dû à la différenciation majoritairement en neurones entraînée par l'addition de NGF. Ces astrocytes de très petite taille suivent le câblage axonal et émettent des prolongements dans la sphère. Certains astrocytes projettent leurs prolongements cytoplasmiques sur plusieurs câbles axonaux en même temps.

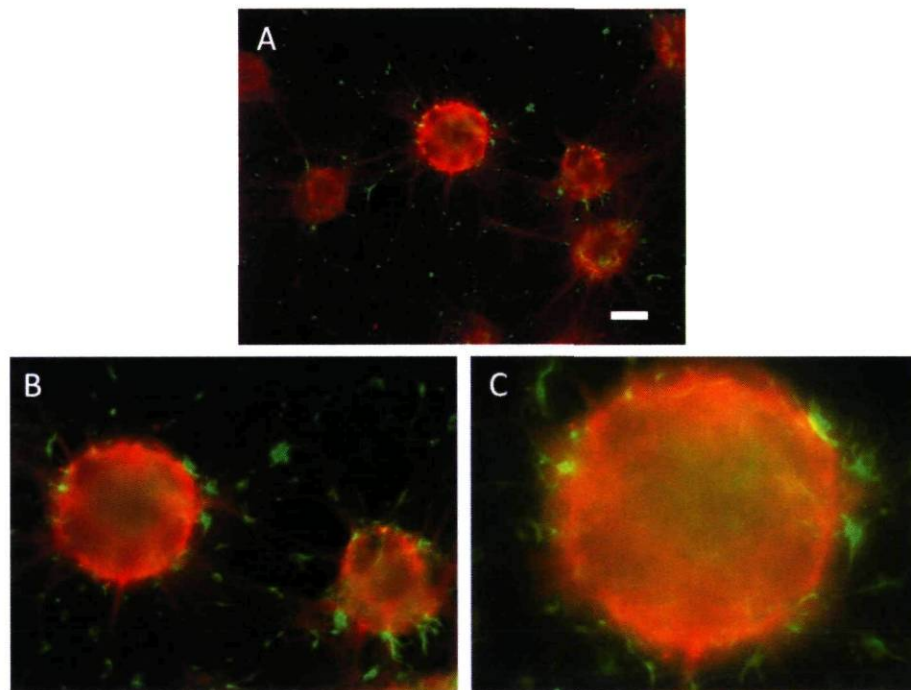


Figure 12 - Clichés de la culture en plaque de 96 puits en milieu Lonza

Les **panneaux A, B et C** figurent la même zone. De **A** à **C** la magnification va croissante. En vert, nous pouvons observer un marquage GFAP ciblant les astrocytes et en rouge un marquage tau ciblant les axones des neurones. L'aspect des corps cellulaires des neurones regroupés en structure sphérique est caractéristique. De ces sphères sortent des câbles constitués d'axones regroupés. Les astrocytes suivant ces câbles sont de très petite taille comparativement aux regroupements de neurones. Les excroissances des astrocytes ou podocytes semblent aussi entrer dans les sphères de neurones. Barre d'échelle 150 μm .

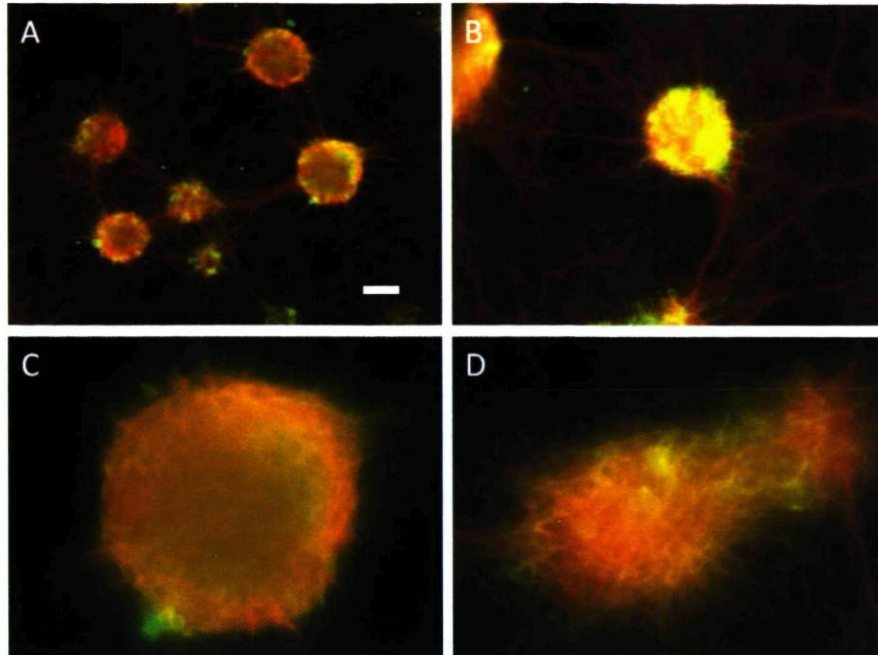


Figure 13 - Clichés de la culture en plaque de 96 puits en milieu Lonza

Les **panneaux A, B et C** figurent la même cible. De **A à C** la magnification va croissante. Le panneau **D** représente un autre exemple du phénomène observé en **C**. En vert, nous pouvons observer un marquage Map2 protéine associée aux microtubules ciblant les dendrites des neurones alors que le marquage tau en rouge cible les axones de ces mêmes neurones. Concernant les neurones, nous observons les mêmes phénomènes que dans la figure précédente: l'aspect des corps cellulaires des neurones regroupés en structure sphérique est caractéristique. De ces sphères, sortent également des câbles constitués d'axones regroupés. Barre d'échelle 150 μ m.

3.2.2 Milieu «habituel: NBC + 5% FBS»

La **figure 14** présente les résultats obtenus avec un milieu de culture neurobasal complet additionné de 5% de sérum de veau fœtal (FBS). On observe des neurones individualisés sur un tapis d'astrocytes très dense. Les astrocytes sont de taille très importante comparativement au milieu Lonza pour une même magnification.

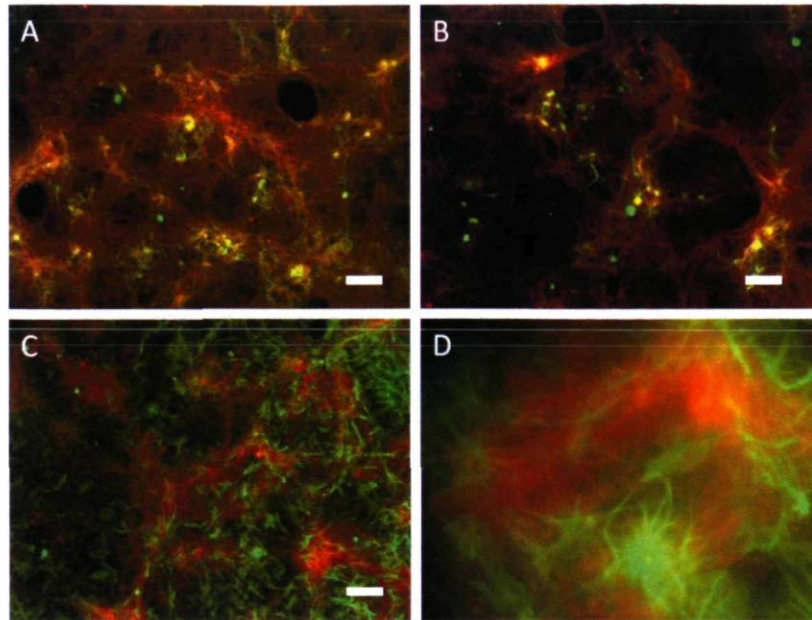


Figure 14 - Cliché de culture de neurones en plaque de 96 puits en milieu conventionnel

Panneaux supérieurs A et B : Clichés pris au même grossissement. En rouge, nous pouvons observer un marquage tau ciblant les axones des neurones alors que le marquage vert cible Map2 donc les dendrites de ces mêmes neurones. Le cliché de gauche, **A**, représente le pourtour du ménisque observé généralement au fond des puits recouverts de PDL. Le cliché de droite, **B**, représente le centre du puits ou zone du ménisque. On note l'aspect clairsemé de la zone contrairement au **cliché A** très dense reflétant une diminution en terme de quantité de neurones.

Panneaux inférieurs C et D : en vert, nous pouvons observer un marquage GFAP ciblant les astrocytes et en rouge un marquage ciblant les axones des neurones. Les astrocytes entourent et envahissent les embranchements axonaux visibles en rouge. Le **cliché D** est un agrandissement d'une région du **cliché C**. Barre d'échelle 150 μm .

3.3 Effet de la stimulation sur cellules au LI-COR

La dernière étape de validation fût la mise au point de l'analyse au LI-COR. Les résultats obtenus avec la culture embryonnaire ont montré la présence, avec les deux types de milieu de culture, d'un effet des drogues mentionnées précédemment. La stimulation fût effectuée à 12 jours de culture neuronale cette fois-ci avec du LY 294002 inhibiteur des phosphatidylinositol PI3 kinases (augmentant la déphosphorylation de GSK-3) et du

bpVphen inhibiteur potentiel de protéine phosphotyrosine phosphatase et un activateur de kinase de récepteur à l'insuline (IRK) (diminuant le niveau de déphospho GSK-3). Le but de ces expériences était de valider la stimulation et de déterminer les meilleures conditions pour celle-ci aussi bien en termes de densité cellulaire que d'âge d'embryon ou de milieu de culture. Les résultats attendus avec des différences significatives furent obtenus sur 3 cultures différentes (cf. **figures 18 à 21**). Notez bien que l'âge de l'embryon est arbitraire puisque nous nous fiions aux plugs qui sont des bouchons de spermes présents chez les femelles après l'accouplement pour dater le début de grossesse.

Nous pouvons voir ci-après les résultats de la stimulation des cellules au LI-COR. Pour plus de simplicité, je les détaillerai en regard des différents clichés pris.

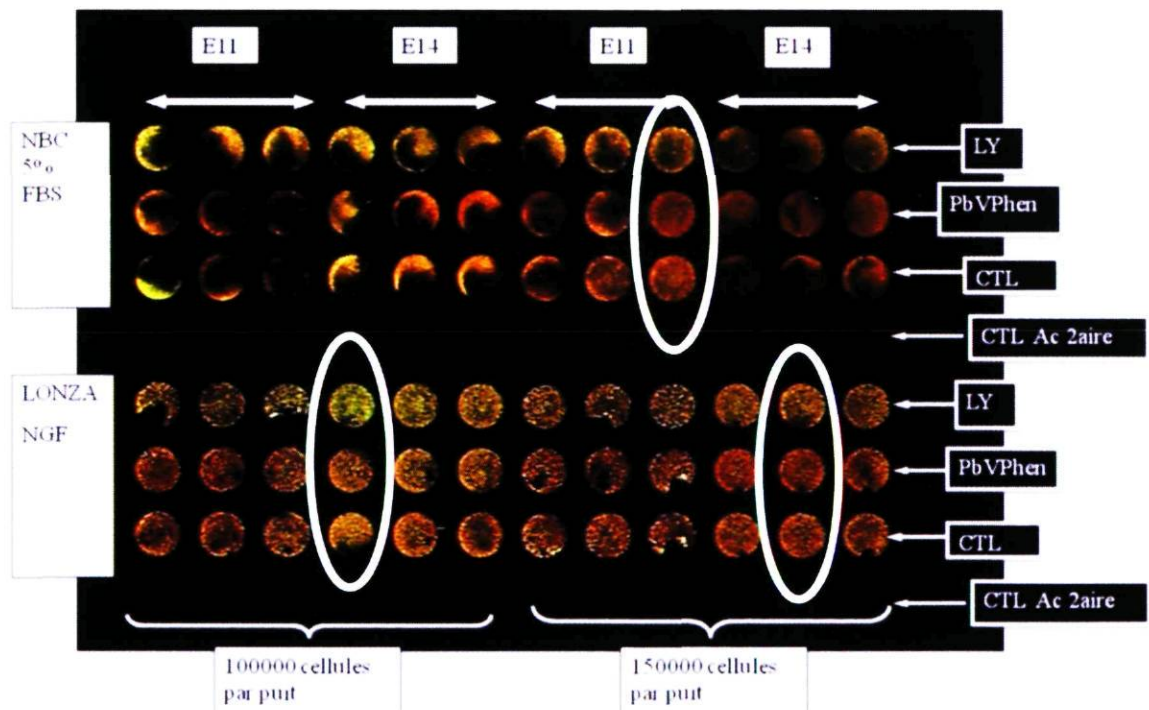


Figure 15 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR dans les deux canaux simultanément

La plaque était séparée en deux types de cultures avec deux milieux différents. Ces huit conditions en triplicat sont les suivantes : Embryon de 14 jours (E11) ou embryon de 17 jours (E14) avec milieu conventionnel NBC ou Lonza, à 100000 ou 150000 cellules par puits. Chaque triplicat est stimulé avec du LY 294002 (LY) ou bpVphen ou sert de control DMSO (solvant des drogues). *Nota bene* : les dénominations E11 et E14 ont été données arbitrairement et figurent simplement deux cultures d'âge différent. On peut observer une

différence d'aspect des deux cultures avec cette méthode puisque les puits NBC 5% FBS présentent un aspect plus diffus et homogène que les puits ayant contenu du milieu de culture Lonza où la culture présente un aspect ponctiforme dû à un regroupement des neurones sous forme d'amas sphériques. Il est intéressant d'observer ce même résultat déjà observé dans notre étude précédente en microscopie (cf. **figure 10 et 11** vues précédemment). Ceci prouve que les sphères sont de taille importante. Les deux canaux 680 normalement montré en vert et 800 nm en rouge sont visibles simultanément ce qui a pour incidence de donner une couleur souvent jaunâtre aux puits. La couleur des puits va de vert à rouge en fonction de l'intensité de fluorescence des molécules marquées dans les deux canaux. Trois triplicats sont entourés d'un cercle blanc fin de montrer qu'une différence d'intensité de fluorescence et donc de concentration de DéphosphoGSK-3 sur GSK-3 total est visible à l'œil nu.

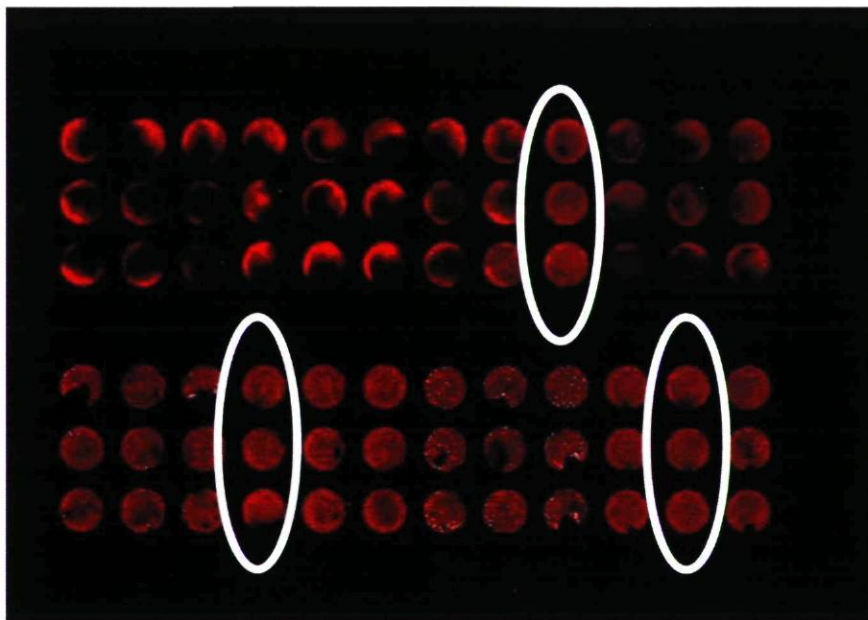


Figure 16 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR lue dans un seul canal 800 nm figurant donc GSK-3 total

Ce cliché montre la même plaque que dans la figure 15 mais cette fois-ci visualisée uniquement à 800 nm, apparaissant en rouge ici, et représentant GSK-3 total. Aucune différence d'intensité n'est notable entre les différentes conditions LY, bpVphen et contrôle sur chacune des cultures (100 000 vs 150 000cellules par puits ou milieu Lonza vs milieu NBC). Donc le GSK-3 total semble ne pas varier à l'œil. Les triplicats entourés d'un cercle blanc et nous servant de repère ne semblent pas présenter de différence d'intensité à l'œil nu.

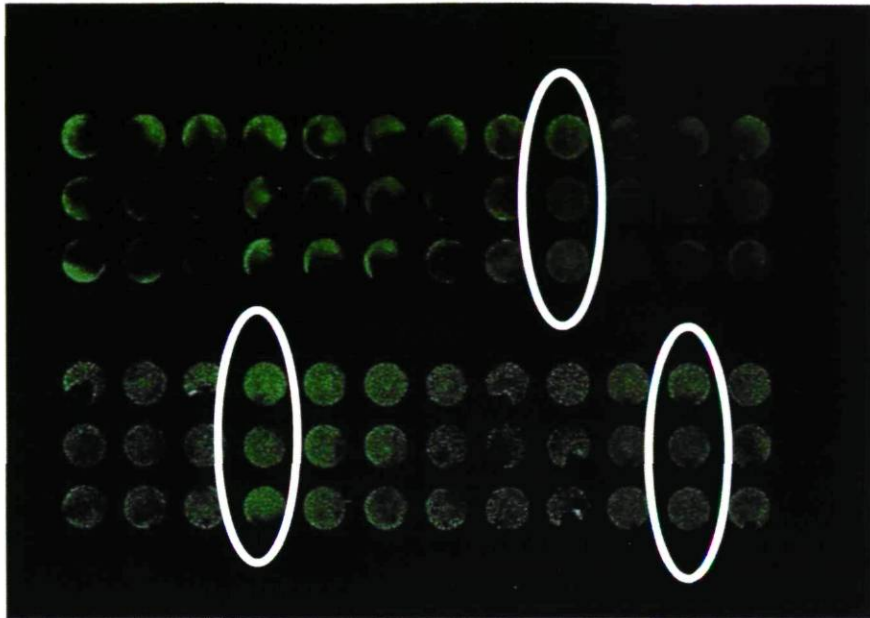


Figure 17 - Aspect d'une expérience type de validation de la méthode de stimulation en plaque de 96 puits lue au LI-COR lue dans un seul canal 680 nm figurant la molécule GSK-3 déphosphorylée donc sous forme activée

Ce cliché montre la même plaque que dans les **figures 15** et **16** mais cette fois-ci visualisée uniquement à 680 nm apparaissant en vert ici et représentant DéPhospho GSK-3. Encerclées en blanc, les conditions où une différence d'intensité de fluorescence et donc de concentration de DéphosphoGSK-3 est visible à l'œil nu entre les trois puits sur une même colonne.

Je vais maintenant vous montrer ci-dessous des montages représentant l'analyse statistique de la fluorescence des plaques scannées ci-dessus. Je vais les décortiquer pour chaque milieu de culture, par condition de concentration de cellules par puits et d'âge d'embryon. Les histogrammes représentent sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur trois cultures analysé par un « Student t-test » en testant les conditions LY, bpVphen et DMSO par lot de deux. Puisque nous voyions que l'âge est approximatif, pour des raisons de clarté, j'ai décidé de ne pas montrer le graphique présentant le total pour les embryons à 14 jours et le total pour les embryons à 17 jours. Encore une fois, pour des raisons de clarté je détaillerais les résultats en regard des différents montages.

3.3.1 Milieu Lonza

J'ai procédé à une analyse en fonction de l'âge de l'embryon et de la concentration de cellules ensemencées par puits sur trois cultures différentes. Nous avons une tendance finale qui est que la condition la plus favorable est un embryon plus âgé de 17 jours et une concentration plus élevée à 150 000 cellules par puits.

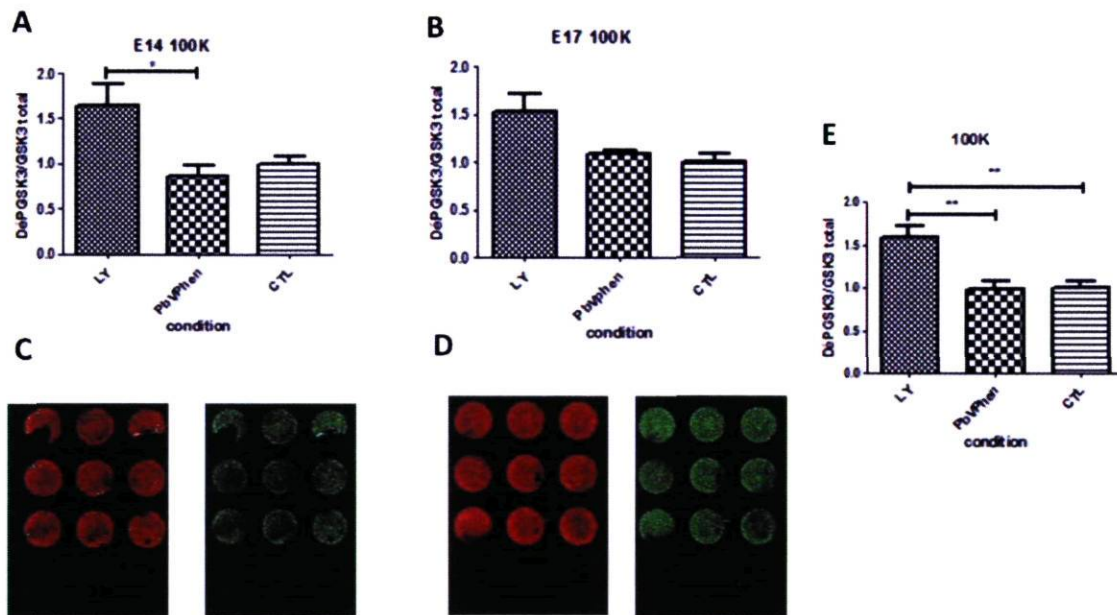


Figure 18 - Photomicrographies des puits et histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur trois cultures à 100 000 (100K) cellules par puits dans le milieu Lonza pour trois conditions LY, bpVphen et CTL.

A) et C) Panneaux de gauche : culture obtenue avec des embryons de 14 jours et ensemencées à 100000 cellules par puits.

A) panneau supérieur: histogrammes montrant une différence significative seulement entre la stimulation par LY et bpVphen.

C) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

B) et D) Panneaux du centre : culture obtenue avec des embryons de 17 jours et ensemencées à 100000 cellules par puits.

B) panneau supérieur: histogrammes ne montrant aucune différence significative entre les stimulations par LY et bpVphen ou le contrôle. Les stimulations n'ont pas d'effet sur les cellules apparemment.

D) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

E) panneau supérieur de droite : histogrammes tous âges confondus montrant une différence très significative entre les stimulations par LY et bpVphen ainsi qu'entre LY et le contrôle. Pas de différence entre bpVphen et contrôle.

L'astérisque démontre une différence significative (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; t test). Investigation sur $n = 9$ puits pour chaque condition.

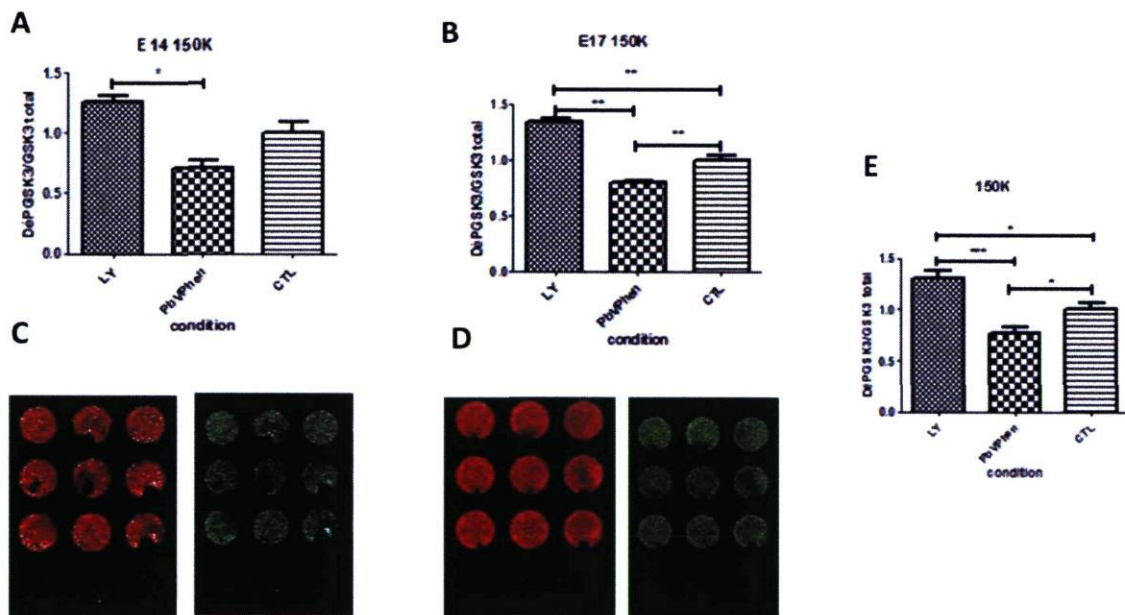


Figure 19 - Photomicrographies des puits et histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur trois cultures à 150 000 (150K) cellules par puits dans le milieu Lonza pour trois conditions LY, bpVphen et CTL.

A) et C) Panneaux de gauche: culture obtenue avec des embryons de 14 jours et ensemencées à 150000 cellules par puits.

A) panneau supérieur: histogrammes montrant une différence significative entre la stimulation par LY et bpVphen.

C) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

B) et D) Panneaux du centre: culture obtenue avec des embryons de 17 jours et ensemencées à 150 000 cellules par puits.

B) panneau supérieur: histogrammes montrant une différence significative entre les trois stimulations prises deux à deux.

D) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

E) panneau supérieur de droite : histogrammes montrant une différence significative entre les trois stimulations prises deux à deux tous âge confondus.

L'astérisque démontre une différence significative (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; t test). Investigation sur $n = 9$ puits pour chaque condition.

3.3.2 Milieu habituel «NBC + 5% FBS»

J'ai également procédé à une analyse dans le milieu habituel afin de voir une différence éventuelle entre les deux milieux en termes de réponse à la stimulation. Cette réponse a été également analysée en fonction de l'âge de l'embryon et de la concentration de cellulesensemencées par puits. Là encore nous obtenons la même conclusion que dans le milieu Lonza : La tendance finale obtenue est qu'un embryon plus âgé de 17 jours et une concentration plus élevée à 150 000 cellules par puits donnent les conditions les plus favorables à l'observation d'un effet de stimulation en plaque de 96 puits.

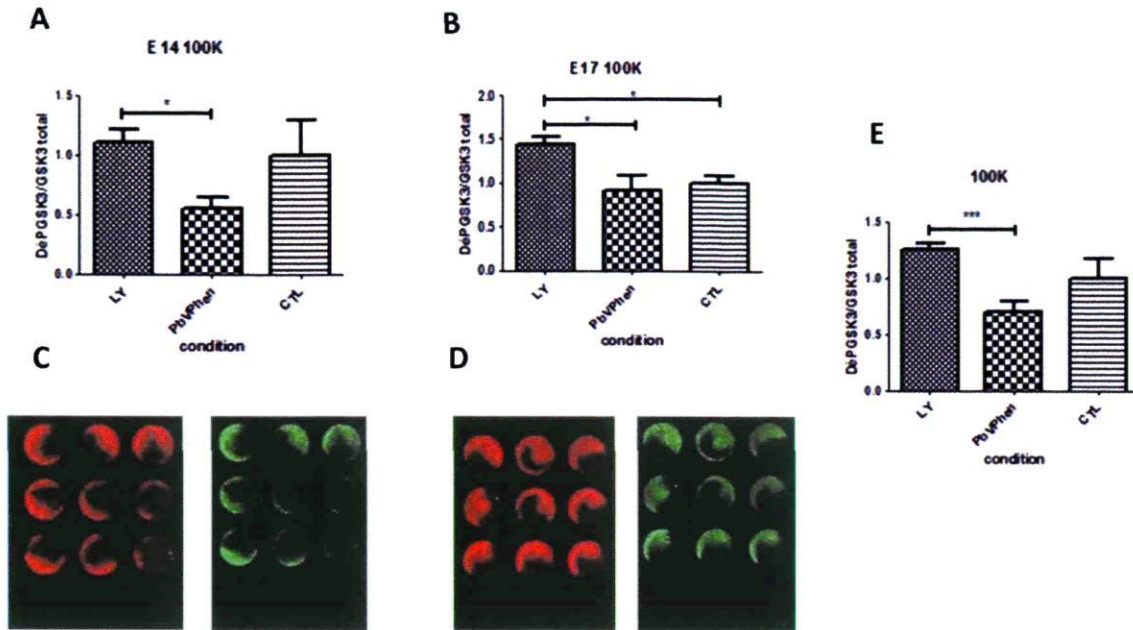


Figure 20 - Photomicrographies des puits et histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur trois cultures à 100 000 (100K) cellules par puits dans le milieu habituel pour trois conditions LY, bpVphen et CTL.

A) et C) Panneaux de gauche: culture obtenue avec des embryons de 14 jours et ensemencées à 100 000 cellules par puits.

A) panneau supérieur: histogrammes montrant une différence significative seulement entre la stimulation par LY et bpVphen.

C) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

B) et D) Panneaux du centre: culture obtenue avec des embryons de 17 jours et ensemencées à 100 000 cellules par puits.

B) panneau supérieur: histogrammes ne montrant une différence significative entre les stimulations par LY et bpVphen ainsi que LY et le contrôle. Pas de différence entre bpVphen et le contrôle.

D) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

E) panneau supérieur de droite : histogrammes cumulatifs tous âges confondus montrant une différence très significative entre les stimulations par LY et bpVphen.

L'astérisque démontre une différence significative (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; t test). Investigation sur $n = 9$ puits pour chaque condition.

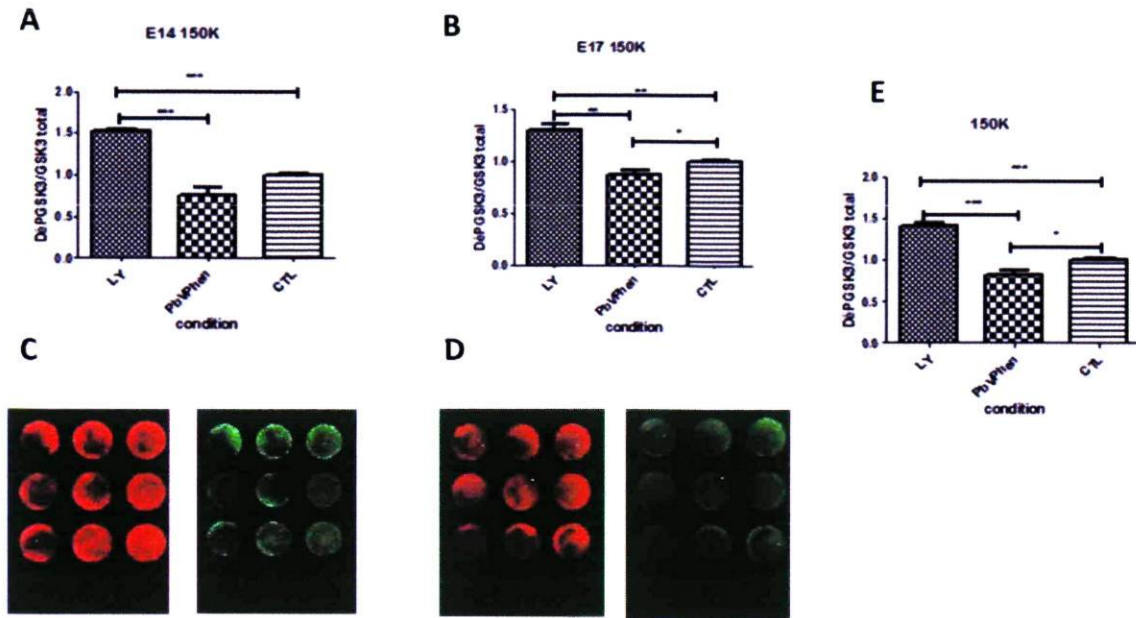


Figure 21 - Photomicrographies des puits et histogrammes de sommation des intensités de fluorescence de GSK-3 déphosphorylé normalisé par rapport à GSK-3 total effectué sur trois cultures à 150000 (150K) cellules par puits dans le milieu habituel pour trois conditions LY, bpVphen et CTL.

A) et C) Panneaux de gauche: culture obtenue avec des embryons de 14 jours etensemencées à 150 000 cellules par puits.

A) panneau supérieur: histogrammes montrant une différence significative entre la stimulation par LY et bpVphen ainsi qu'entre LY et contrôle.

C) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

B) et D) Panneaux du centre: culture obtenue avec des embryons de 17 jours etensemencées à 150 000 cellules par puits.

B) panneau supérieur: histogrammes ne montrant une différence significative entre les 3 stimulations prises deux à deux.

D) panneau inférieur : cliché de la fluorescence obtenue au LI-COR dans chaque canal. La première rangée représente la stimulation au LY, la seconde au bpVphen et la troisième le contrôle DMSO.

E) panneau supérieur de droite : histogrammes cumulatifs tous âges confondus montrant une différence significative entre les trois stimulations prises deux à deux.

L'astérisque démontre une différence significative (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; t test). Investigation sur $n = 9$ puits pour chaque condition.

En conclusion pour la culture sur plaque de 96 puits, nous avons une tendance finale qui est que la condition la plus favorable dans les deux milieux est un embryon plus âgé de 17 jours (sachant que le terme de la grossesse d'une souris est à 21 jours) et une concentration plus élevée à 150 000 cellules par puits. Cette condition permettrait d'avoir un système qui est stimuable et donne une différence d'intensité de fluorescence appréciable au LI-COR. À 150 000 cellules par puits, les deux milieux de culture donnent des résultats équivalents (cf. **figure 19B et 21B**). À 100 000 cellules le Lonza (cf. **figure 18A et 18B**) montre des réponses à la stimulation bien en dessous de celles du milieu habituel (cf. **figure 20A et 20B**). Ainsi, dans le cadre de la stimulation, le milieu Lonza semble être moins intéressant à faible densité que le milieu habituel. De plus, un problème se détache des résultats, le puits contrôle a une grosse intensité de fluorescence au niveau basal et présente très rarement de différence d'intensité de fluorescence significative avec la stimulation LY censée augmenter au maximum l'intensité de fluorescence.

Chapitre 4 : Discussion

Nous avons validé notre méthode de détection de composés pharmacologiques sur la voie dopaminergique D2R car elle répond positivement aux différents contrôles que nous avons fixés pour étudier son efficacité. En effet, la première étape qui est la culture cellulaire de neurones de striatum de souris sur lamelles a été un succès suite à l'obtention de pourcentages similaires sur différentes populations neuronales par rapport à ceux connus chez l'animal. La seconde étape de validation qui consistait à savoir si une stimulation de ces neurones par un agoniste était possible a donné des résultats positifs, ce qui a fait l'objet d'une figure dans une publication (Swift *et al.*, 2011). La troisième étape était de savoir si la culture en plaque de 96 puits était possible et nous avons obtenu de bons résultats en changeant l'âge des cerveaux prélevés. En effet, en utilisant des cerveaux d'embryons entre 14 et 18 jours de gestation, en microscopie, la culture était beaucoup moins enflammée et contenait beaucoup moins d'astrocytes. La dernière validation, quant à elle, fût de cibler la voie D2R-AKT-GSK-3 avec un ligand et de vérifier si l'effet était visible au LI-COR. Là encore, les résultats sont positifs et semblent indiquer une possibilité d'utiliser ce modèle, ce dont nous allons discuter dans cette partie. Toutefois, certaines critiques peuvent également être soulevées quant à l'élaboration et à l'intérêt réel de cette méthode.

4.1 Culture de neurones sur lamelles

Cette partie de mon travail a permis de répondre aux deux premières questions. Les résultats sont concluants puisque la composition obtenue en différentes sous-populations neuronales de la culture cellulaire de neurones transgéniques D1-TOM/D2-GFP est similaire à celle retrouvée chez l'animal au niveau du striatum. Ainsi, la composition en neurones était majoritairement représentée par des MSN (attesté par le marquage DARPP32 positif), les interneurones acétylcholinetransférase et les neurones tyrosine hydroxylase positifs représentant moins de 10% sur 200 neurones comptés (Gerfen *et al.*, 1992; Lobo *et al.*, 2009). Le fait de retrouver en culture cellulaire une proportion similaire à celle obtenue chez l'animal est intéressant. En effet, cette étude *in vitro* permet d'aller

regarder en microscopie des effets ou cinétiques de drogues au niveau de réseaux de neurones tandis que chez l'animal la forte concentration de neurones, créant un réseau très dense, rend plus difficile la visualisation au niveau d'un neurone. Ainsi, puisque nous pouvons faire diminuer la densité d'ensemencement de la culture à quasiment individualisé, ce modèle permet une observation des mécanismes moléculaires plus aisée que chez l'animal. Néanmoins, le modèle in-vitro ne représente pas les conditions physiologiques puisque les connexions striatales naturelles du cerveau donc les différents rétrocontrôles via des neurotransmetteurs inhibiteur et excitateur sont absentes. Nous sommes donc en droit d'émettre des réserves sur l'intérêt de ce modèle pour une étude poussée sur le neurone s'il n'est pas couplé aux résultats chez l'animal. Ce modèle in-vitro a donc un intérêt au départ d'une étude en tant que méthode de défrichage, c'est-à-dire d'investigation de toxicité éventuelle. Il permettrait de gagner du temps et d'éviter de gaspiller des animaux pour des molécules candidates potentiellement toxiques. Il peut aussi être utilisé par la suite pour une étude précise d'un mécanisme d'action de drogue au sein de populations de neurones.

Bien que cette première validation soit un succès de par les résultats obtenus, le marquage endogène tdTomato et en particulier EGFP est relativement faible, nécessitant une amplification avec un anti-DsRed et un anti-GFP respectivement. Plus ennuyeux, pour l'objectif d'observer deux populations neuronales clairement individualisées, beaucoup de neurones de cette culture semblent présenter les deux marquages donc exprimer les deux types de récepteurs. Nous allons en détailler les causes probables et les solutions ci-après.

4.2 Le modèle D1-tom/D2-GFP

Le problème de fiabilité du marquage endogène s'est posé à nous. La culture étant effectuée avec tous les nouveau-nés d'une portée et sans génotypage préalable, le niveau d'expression des transgènes par les neurones était variable. Pour contourner ce problème d'expression plus ou moins grande de fluorophore par les neurones et obtenir un marquage homogène nous avons décidé d'utiliser des anticorps dirigés contre les molécules fluorescentes. Ceci visant à observer la même intensité de fluorescence en cas de marquage de la molécule endogène par l'anticorps. Or, le comptage de cellules exprimant D1R versus cellules exprimant D2R était impossible puisque seul le marquage anti-DsRed fonctionnait,

l'anticorps anti-GFP étant soit non-spécifique avec le lapin anti-GFP soit spécifique mais trop sporadique avec le souris anti-GFP. Les anticorps de lapin qui sont polyclonaux ont plus de chance d'être moins spécifique que ceux de souris qui sont monoclonaux ce qui est cohérent avec les résultats. De plus, le phénomène de photobleaching de la GFP qui n'est pas une molécule stable puisqu'elle se dégrade rapidement peut intervenir. En effet, cette propriété est utilisée en techniques de microscopie électronique telle que le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Henderson *et al.*, 2007). Ainsi, cela expliquerait le fait que les neurones palissent jusqu'à fluorescer autant que le bruit de fond dû à la PFA. Il est à noter que la fixation à la PFA est un point très délicat. Dans le vert, cette molécule émet une grande autofluorescence qui fût utilisée à de nombreuses reprises pour la quantification des dérivés histaminiques (Anderson *et al.*, 1979). En effet, la PFA en se liant aux protéines et plus particulièrement aux monoamines crée une réaction de condensation qui les transforme en fluorophore créant ainsi une « autofluorescence » de l'échantillon (Anderson *et al.*, 1979). Pour y remédier, j'utilise une solution de rinçage contenant l'acide aminé glycine à 1mg/mL dans du PBS après la réaction de fixation. Le but de cette manœuvre est que la PFA résiduelle se condense avec la glycine au lieu des monoamines de mon échantillon et soit donc rincée plus facilement. Malgré cela, la fluorescence verte pâle est encore grandement présente. Elle était aussi présente lors de mon essai de fixation dans le méthanol glacé. Il serait donc intéressant de tenter différentes autres méthodes de fixation pour investiguer si cette autofluorescence est due aux neurones transgéniques D1-TOM/D2-GFP.

Malgré les problèmes mentionnés ci-avant, le comptage cellulaire a quand même été tenté sur 500 neurones (dans des cultures de neurones embryonnaires et adultes). Sur ces 500 neurones, nous avons obtenu un rapport de un tiers de neurones D1-TOM et deux tiers de neurones D2-GFP. D'autres publications font état d'un rapport en faveur du D1R (Gerfen *et al.*, 1990). Beaucoup de neurones semblaient présenter les deux couleurs et avec certitude je peux affirmer que 2% au minimum présentaient la co-expression des deux marquages de façon intense. De plus, l'étude neuroanatomique du cortex préfrontal de ces souris D1-TOM/D2-GFP a montré que la plupart des neurones pyramidaux positifs pour le récepteur dopaminergique de type 1 exprimaient aussi de faibles niveaux de récepteurs D2

à la dopamine (Zhang *et al.*, 2010). Or, dans la littérature, seulement une toute petite population de MSN synthétise à la fois les récepteurs D1R et D2R (Matamales *et al.*, 2009; Valjent *et al.*, 2009; Perreault *et al.*, 2010, 2011). Dans un article paru en 1993, le laboratoire de Maria DiFiglia faisait état de l'existence probable de neurones coexprimant D1R et D2R. Dans cette étude, ils ont utilisé l'hybridation in-situ sur des sections de cerveau afin de voir le niveau d'expression des ARN messagers des récepteurs D1R et D2R et leur localisation. Bien que les récepteurs D1R et D2R soient ségrégués en deux voies de projection striatale différentes et donc ségrégués dans la majorité des neurones de striatum, ils ont trouvé que 26 à 27% des cellules de striatum exprimant un type de récepteur exprimait aussi l'autre type (Lester *et al.*, 1993). Gerfen *et al.* ont montré par hybridation in-situ que 85% des neurones striatonigraux contenaient de l'ARN messenger de récepteur D1R, le reste contenait du D2R (Gerfen *et al.*, 1990). La coexpression des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 a été rapportée après détection par immunohistochimie dans le nucleus accumbens de souris âgées de huit mois (Rashid *et al.*, 2007) mais aussi dans plusieurs endroits des ganglions de la base (Perreault *et al.*, 2010, 2011). Cette question des hétérodimères trouve donc une résonance dans la littérature. Ce phénomène mériterait une investigation plus poussée, en immunohistochimie et génétique sur la lignée D1-TOM/D2-GFP afin de comprendre si les phénomènes que j'ai observés sont bien réels ou dus à un problème technique. Ceci implique de faire des tests de plusieurs anticorps anti-D1R, D2R, GFP et DsRed pour trouver ceux donnant les marquages les plus spécifiques ainsi que travailler en microscopie confocale avec des longueurs d'onde de stimulation spécifique pour chaque fluorophore. L'utilisation d'un logiciel d'imagerie sur lequel on aura déterminé un seuil de détection de fluorescence nous permettrait aussi de décider si un neurone est GFP positif ou non.

Les problèmes évoqués précédemment font écho aux nombreuses publications faisant état d'anomalies phénotypiques des lignées de souris GENSAT et BAC transgéniques utilisées. Ces anomalies étant accompagnées d'un problème de discrimination des voies directe et indirecte dans le modèle utilisé (Shuen *et al.*, 2008; Ade *et al.*, 2011) qui correspondait à la lignée 5 D1R-tdTomato croisé avec les souris D2R-EGFP. Le laboratoire possédait le modèle mentionné ci-avant et effectivement il nous fût

très difficile de voir le marquage GFP sans l'aide d'un anticorps tandis que le marquage tomato était faible mais présent et supérieur en terme d'intensité de fluorescence à EGFP sur un grand nombre de neurones. Conscients de ces problèmes, les chercheurs ayant produit la lignée 5 proposent maintenant, une nouvelle lignée (lignée 6) de souris où ce problème semble avoir été résolu (Ade *et al.*, 2011). Cependant, les souris BAC transgéniques GENSAT D2R-EGFP continuent à souffrir d'altérations phénotypiques avec des récepteurs D2R non-fonctionnels (Kramer *et al.*, 2011). Il serait intéressant de refaire ces expériences avec la nouvelle lignée seule accompagnée d'un marquage enképhaline marquant la voie indirecte enrichie en D2R pour voir si le marquage endogène amélioré change nos résultats concernant la ségrégation des récepteurs dopaminergiques. Bien entendu, les MSNs marqués par tomato contiendraient des récepteurs D1R et ceux marqués enképhaline positifs et non colorés en rouge seraient ceux contenant des récepteurs D2R. Un marquage DARPP32 marquant les MSNs (Shuen *et al.*, 2008) serait aussi une bonne alternative à enképhaline en cas de non disponibilité de ce dernier dans le laboratoire. Une autre possibilité serait de refaire les expériences sur le croisement d'une souris GENSAT A2A-EGFP (Gong *et al.*, 2003; Warre *et al.*, 2011) avec cette lignée 6 D1R-tdTomato et voir si l'anomalie était due aux souris D2R-GFP.

J'ajouterais que la fonctionnalité des neurones issus de souris transgéniques est aussi un problème potentiel de ce genre d'étude. Les neurones sont ici étudiés en deux dimensions sans leurs connexions naturelles et en plus l'insertion du BAC transgène dans le génome peut avoir des effets délétères sur certains gènes puisqu'elle se produit au hasard (Shuen *et al.*, 2008). Ceci pourrait avoir pour conséquence des récepteurs présentant un patron d'expression différent. Des études rapportent que l'introduction du BAC transgène *Drd2-EGFP* dans le génome de souris peut altérer l'expression des récepteurs D2R en surface et causer des comportements locomoteurs aberrants (Ade *et al.*, 2011; Kramer *et al.*, 2011). Cela dénote une possible difficulté à la stimulation : les voies sont-elles activées de façon classiques et pour les mêmes doses? Cela dit, malgré cette réserve émise, lors de ma contribution à l'article de Swift *et al.* 2011 les résultats encourageants ont montré que la stimulation est possible même s'il s'agit d'une lignée transgénique.

En dépit de ces problèmes techniques et forts de ces deux premières validations nous avons décidé d'adapter notre protocole pour la culture en plaque de 96 puits. Ce type de culture permettant de dépenser moins de réactifs et de tester plus de conditions à la fois.

4.3 Adaptation du protocole en plaque de 96 puits

Les molécules investiguées, soit les molécules GSK-3 et AKT, sont impliquées dans la voie de signalisation de l'inflammation via les cyclooxygenases (Jope *et al.*, 2007). En effet, plus une cellule va être enflammée plus elle va contenir de molécules de GSK-3 sous forme déphosphorylées qui seront mobilisées sur le pool de GSK-3 total stable. Ainsi, le résultat d'un contrôle montrant autant de fluorescence que celui stimulé par LY c'est-à-dire autant de GSK-3 activée (rapport DéphosphoGSK-3 sur GSK-3 total) dans les deux cas nous montre que mes cultures sont enflammées à l'état basal. Ajoutons aussi que le problème est que des puits peuvent présenter déjà une plus forte fluorescence due à des conditions de manipulation inadéquates. Lors des premiers essais, l'inflammation de mes cultures en plaque de 96 puits était très importante lorsque j'utilisais des striatum de nouveau-nés. Les neurones étant des cellules très sensibles aux variations de conditions du microenvironnement et aux chocs mécaniques ou thermiques, j'ai décidé de changer mes pratiques (Nault et DeKoninck, 2010). J'ai donc tenté de minimiser les sources de choc mécanique lors du changement de milieu en ne prélevant que la moitié du milieu présent dans le puits avec la micropipette en aspirant très doucement et en ajoutant du milieu délicatement. Malheureusement, avant l'étape de stimulation, j'ai dû procéder en vidant les puits par retournement pour avoir un volume exact de 100 μ L de milieu par puits. Cette façon de procéder avait pour but d'éviter les chocs thermiques ou hypoxiques encore plus nuisibles aux cellules et qui auraient été entraînés par un vidage trop lent des puits à la micropipette multicanaux. Ceci est certainement une grande erreur de ma part mais tous les puits subissaient le même dommage ce qui n'aurait pas été le cas lors d'un prélèvement à la micropipette multicanaux. Après prélèvement, les cellules étaient laissées sans stress pendant plusieurs heures à l'incubateur. J'ai cependant essayé le prélèvement à la pipette multicanaux et je n'ai pas noté de différence dans l'état de santé global des neurones, cependant, au LI-COR je n'obtenais pas de résultats intéressants. La fixation à la PFA peut

être une source d'autofluorescence non négligeable comme vu précédemment et les composés condensés peuvent probablement avoir une structure monamine couplée à un ou plusieurs cycles aromatiques leur permettant, par effet bathochrome, de fluorescer dans un domaine large allant jusqu'aux infrarouges [8] [9]. Notons aussi la présence d'un effet de bord qui déshydrate les puits à la périphérie de la plaque. Ce phénomène peut changer la concentration des anticorps pour le marquage dans les plaques et des drogues en solutions lors de temps d'incubation long. Ceci s'illustrera par des puits plus lumineux sur le pourtour de la plaque. Le seul moyen d'y remédier est de laisser ces puits soit en situation contrôle soit sans cellules et remplis d'eau distillée.

L'âge du prélèvement a également un impact sur les caractéristiques de la culture. En effet, plus les cerveaux prélevés sont jeunes plus le taux de progéniteurs non engagés sur une voie de différenciation est élevé (Ip *et al.*, 1994; Ahlenius *et al.*, 2009). Ceci a pour effet d'entraîner in fine des cultures présentant moins d'astrocytes disponibles pour les antimétabolites. Ces molécules sont des analogues de nucléotides qui vont bloquer la cellule en division et engager celle-ci sur la voie de l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Cette mort cellulaire entraîne le relargage du contenu cytoplasmique des cellules et notamment les lipides très inflammatoires nuisant fortement à l'espérance de vie de ma culture. Il était notable lors du passage en plaque de 96 puits, que mon tapis astrocytaire était très épais puisque je devais augmenter mes temps de perméabilisation et les concentrations de détergents de 20 à 30%. La quantité d'astrocytes, si elle est trop importante, a comme conséquence une réponse cellulaire moins visible puisqu'elle est cachée par le tapis nourricier d'astrocytes adhérent à la polyDlysine. Le défi était d'avoir suffisamment de neurones et peu d'astrocytes. C'est pourquoi je suis passée à la culture embryonnaire pour l'utilisation du LI-COR, forte des résultats obtenus et détaillés précédemment.

Les antimétabolites jouent aussi un rôle puisque lors du changement de la molécule Ara-c pour une association de deux autres molécules disponibles (Uridine 5'-triphosphate U6625 et 5 fluoro 2-deoxyuridine), j'ai noté une diminution dans le niveau de mort cellulaire. Bien que ces différentes molécules soient censées avoir des mécanismes d'action relativement similaires, l'AraC semble plus apoptogène. D'ailleurs, sa toxicité est tellement

documentée qu'elle est principalement utilisée dans les études sur l'apoptose (Chisholm *et al.*, 2012).

Le NGF utilisé dans le milieu Lonza, quant à lui, donne un aspect de regroupement aux neurones car il oriente les progéniteurs vers la différenciation en neurones plutôt qu'en astrocytes. En effet, Le NGF est un facteur de croissance axonale agissant sur les récepteurs TrkA (Sofroniew *et al.*, 2001). Ainsi, puisqu'il était présent dans tout le milieu les axones poussaient dans toutes les directions (Achyuta *et al.*, 2009; Sofroniew *et al.*, 2001). Mais, là où se trouvait un progéniteur qui donnait par division un neurone et une cellule indifférenciée, les neurones se sont accumulés et regroupés en pseudoganglion (Ip *et al.*, 1994; Ahlenius *et al.*, 2009). Autour de chacune de ces zones de prolifération ils bénéficient des facteurs neurotrophiques sécrétés par les autres au lieu de s'étaler pour former une toile d'araignée comme dans le cas de NBC additionné de facteurs B27, de BSA et d'antimitotique. Les astrocytes, de façon notable, sont beaucoup moins développés dans le cas du milieu de culture Lonza à cause de la différence de composition en facteurs nutritifs et de l'utilisation conjointe de NGF.

Il s'agit ici d'une coculture mais le résultat aurait-il été différent dans le cas d'une culture séparée? Dans cette culture, les neurones sontensemencés sur des lamelles et posés sur un coussin d'astrocytes tapissant le fond d'un pétris. Les deux types cellulaires sont face à face, des plots de paraffine les séparant et permettant la circulation du milieu et des facteurs entre eux deux. Il aurait alors été intéressant d'aller investiguer ces deux populations séparément. En effet, nous assumons que la stimulation a un effet sur les neurones et nous partons sur cette hypothèse. La littérature fait cependant état de la présence de récepteurs D2R (Duffy *et al.*, 2011) ainsi que d'AKT (Jiang *et al.*, 2003) et GSK-3 (Beurel *et al.*, 2010) dans les astrocytes. Or, le modèle de la coculture ne nous permet pas de distinguer la composante due aux neurones de celle due aux astrocytes. De même, les médicaments antipsychotiques en agissant sur les neurones doivent aussi inévitablement avoir un impact sur les astrocytes les entourant. Il serait intéressant de tester cette même stimulation sur une culture composée uniquement d'astrocytes.

4.4 Synthèse

Pour conclure cette discussion, les résultats obtenus dans la troisième partie du présent mémoire sont encourageants et semblent montrer une tendance. Seulement, quelques problèmes importants se posent à nous concernant les méthodes mises en œuvre et le matériel utilisé pour l'obtention de ces résultats. Le marquage endogène sur la lignée D1-TOM/D2-GFP a présenté quelques difficultés de validation en microscopie pour moi puisque le marquage de D2-GFP était impossible. Or, différentes études portant sur cette même lignée transgénique font état d'un problème de ségrégation des voies dopaminergiques. Il semble donc y avoir une source de malentendus entre les études qu'il faudrait clarifier afin de savoir comment la signalisation dopaminergique est organisée réellement notamment par rapport à la question des hétérodimères D1R/D2R. Dans la suite de mon étude, le fait de passer en culture en plaque de 96 puits et de devoir adapter le protocole pour cela a soulevé d'autres points litigieux. Le principal problème concernait la possible inflammation de la culture à l'état basal lors de l'étude des molécules AKT et GSK-3 entrant dans la voie de l'inflammation. J'ai aussi pu apprécier combien l'âge de l'animal sur lequel j'effectuais le prélèvement est un facteur crucial dans la survie des neurones et leur santé. Pour finir, une question me semble nécessaire à poser : si nous avons utilisé une autre hypothèse de départ telle que travailler uniquement sur les astrocytes, le résultat aurait-il été différent? La conclusion discutera le potentiel de cette méthode.

Conclusion et Perspectives

La présente étude avait pour objectif la mise au point d'une méthode de criblage de composés pharmacologiques actifs sur la voie D2R-AKT-GSK-3 fréquemment impliquée dans les désordres mentaux. Pour cela, j'ai donc mis au point une méthode de culture de neurones striataux issus de souris transgéniques. La culture fût premièrement entreprise sur lamelles afin de s'assurer de sa viabilité et de sa teneur en différentes sous-populations neuronales. Par la suite, cette dernière fût adaptée en plaque de 96 puits afin de rendre son utilisation plus économique, facile et rentable aussi bien en termes de temps que d'argent.

La culture de striatum issus de souris nouveau-nés se révèle être un franc succès car sa viabilité est plutôt bonne de même que sa composition qui est conforme aux résultats attendus. Son utilisation dans le cadre de l'article de Swift *et al.*, en 2011, a permis de répondre à la question de la transactivation des récepteurs TrkB via la stimulation des récepteurs dopaminergiques. Ainsi, cette expérience prouve la capacité à être stimulés des neurones issus de striatum de souris transgéniques mis en culture dans mon modèle puisqu'ils possédaient des récepteurs dopaminergiques stimulables selon cette même étude. Concernant le même type de culture adapté pour les plaques contenant 96 puits, mes résultats semblent montrer qu'une stimulation par un agoniste dopaminergique pourrait être possible sur la voie D2R-AKT-GSK-3. En effet, j'ai obtenu une différence significative d'intensité de fluorescence entre les puits stimulés et non stimulés dans les deux types de milieu investigués. Les résultats obtenus avec les milieux Lonza et conventionnel montrent la même tendance : la différence entre les résultats de stimulation est maximale pour une culture de 12 jours de striatum prélevés au 18^{ème} jour embryonnaire.

Il serait intéressant de compléter ce projet en utilisant des animaux transgéniques D1R KO afin de prouver définitivement que la voie D2R est réellement impliquée dans les résultats observés et que l'effet était bien réel et non dû à une composante majoritaire de la voie D1R en reproduisant les mêmes tendances. Un résultat contradictoire, bien que possible, serait peu probable puisque nous observions GSK-3 qui n'est impliqué que dans la voie D2R en utilisant une stimulation agissant sur D2R. Une fois cette dernière validation technique effectuée, il serait intéressant de commencer réellement l'investigation

des composés pharmaceutiques en commençant par les plus connus et faire le lien avec l'animal. Ceci permettrait de comparer les cinétiques d'activation en monocompartimental (au niveau du neurone) versus pluri-compartimental (chez l'animal) et trouver éventuellement de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous pourrions aussi aller observer au niveau des astrocytes pour voir la composante astrocytaire dans les résultats observés puisque nous sommes en situation de coculture astrocytes-neurones.

Actuellement, les tests les plus communément utilisés en criblage in-vitro se font de façon régulière sur des cellules HEK 293, HeLa ou CHO qui ne présentent pas la totalité des voies de signalisation neuronales. De plus, la voie de signalisation D2R/ β -arrestine/AKT/GSK-3 présente des molécules intermédiaires qui restent à découvrir. Cette raison nous oriente vers l'idée que seul un modèle physiologique comme le neurone permet une étude fine des différentes régulations effectuées par les drogues au niveau du cerveau. En effet, même transfectées, les cellules immortalisées pourraient ne pas avoir une molécule intermédiaire qui s'avérerait être un maillon essentiel pour une action sur cette voie. De plus, lors du travail chez l'animal, l'étude est pluri-compartimentale puisque l'on doit passer plusieurs barrières lipidiques et diffuser dans plusieurs compartiments alors qu'in vivo on travaillerait sur un modèle monocompartimental au niveau d'un seul neurone. Les avantages seraient un gain de temps et moins d'animaux sacrifiés pour la même information. Actuellement de nombreux laboratoires pharmaceutiques se lancent dans la synthèse de drogues dirigées contre la β -arrestine et le GSK-3, un modèle physiologique monocompartimental est donc d'un grand intérêt dans le cadre de cette étude.

De plus, à l'heure actuelle, aucune méthode d'investigation de la voie D2R-AKT-GSK-3 sans dénaturation des protéines n'est disponible. Une fois mis au point, mon modèle pourrait être utilisé en vue d'établir une méthode de western blot in-situ afin de créer une plateforme de criblage à moyen débit de composés pharmacologiques. Il permettrait d'obtenir plus d'information en utilisant moins de matériel que pour un western-blot classique. Ainsi, l'information de plusieurs western-blot pourrait se retrouver sur la même plaque avec une seule et même culture. La technique est originale puisque les anticorps anti-déphospho GSK-3 utilisés ne sont pas encore commercialisés. Cette méthode, si elle est développée dans le laboratoire, aurait un énorme potentiel de par la multitude de

combinaisons possibles en termes d'animaux transgéniques, de virus désactivant certains gènes ou d'anticorps disponibles pour les études.

Webographie

[1]¹ <http://www.who.int/blindness/economy/fr/>

[2]² http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/

[3] http://www.reactionbiology.com/webapps/main/pages/kinase.aspx?gclid=CL6oj_PZw64CFQoBQAoddUhhWA

[4] http://www.reactionbiology.com/webapps/main/publications/chemicla_array_dpi_June_8.pdf

[5] http://www.panomics.com/index.php?id=product_46

[6] http://biosupport.licor.com/docs/InCell_Western_Kits_1_-_2_101310.pdf

[7] http://www.licor.com/bio/applications/odysseySa_applications/in_cell_western.jsp

[8] <http://old.iupac.org/goldbook/B00618.pdf>

[9] http://en.wikipedia.org/wiki/Bathochromic_shift

Bibliographie

- Achyuta AK, Cieri R, Unger K, Murthy SK (2009) Synergistic effect of immobilized laminin and nerve growth factor on PC12 neurite outgrowth. *Biotechnol Prog* 25:227-234.
- Ade KK, Wan Y, Chen M, Gloss B, Calakos N (2011) An Improved BAC Transgenic Fluorescent Reporter Line for Sensitive and Specific Identification of Striatonigral Medium Spiny Neurons. *Front Syst Neurosci* 5:32.
- Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z (2009) Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29:4408-4419.
- Anderson ME, Paparo AA, Martan J (1979) Paraformaldehyde-induced fluorescence as a histochemical test for 5-hydroxytryptamine in the epididymis of the opossum. *J Anat* 129:141-149.
- Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research*, vol.126 issue 3. Pages 397-425. 13 May 1977.
- Baumann B, Danos P, Krell D, Diekmann S, Leschinger A, Stauch R, Wurthmann C, Bernstein HG, Bogerts B (1999) Reduced volume of limbic system-affiliated basal ganglia in mood disorders: preliminary data from a postmortem study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 11:71-78.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.
- Beaulieu JM, Zhang X, Rodriguiz RM, Sotnikova TD, Cools MJ, Wetsel WC, Gainetdinov RR, Caron MG (2008a) Role of GSK-3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1333-1338.
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2008b) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132:125-136.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol Sci* 28:166-172.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122:261-273.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5099-5104.
- Beurel E, Jope RS (2010) Glycogen synthase kinase-3 regulates inflammatory tolerance in astrocytes. *Neuroscience* 169:1063-1070.
- Bolam JP, Ingham CA, Smith AD (1984) The section-Golgi-impregnation procedure--3. Combination of Golgi-impregnation with enzyme histochemistry and electron microscopy to characterize acetylcholinesterase-containing neurons in the rat neostriatum. *Neuroscience* 12:687-709.
- Bowden CL (2000) Efficacy of lithium in mania and maintenance therapy of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 9:35-40.

- Carlsson A (2001) A paradigm shift in brain research. *Science* 294:1021-1024.
- Chisholm SP, Cervi AL, Nagpal S, Lomax AE (2012) Interleukin-17A Increases Neurite Outgrowth from Adult Postganglionic Sympathetic Neurons. *J Neurosci* 32:1146-1155.
- Cicchetti F, Prensa L, Wu Y, Parent A (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 34:80-101.
- Creese I, Sibley DR, Hamblin MW, Leff SE (1983) Dopamine receptors in the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 36:125-134.(2012)
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245-256.
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30:14610-14618.
- Duffy AM, Fitzgerald ML, Chan J, Robinson DC, Milner TA, Mackie K, Pickel VM (2011) Acetylcholine alpha7 nicotinic and dopamine D(2) receptors are targeted to many of the same postsynaptic dendrites and astrocytes in the rodent prefrontal cortex. *Synapse* 65:1350-1367.
- Eisenberg DP, Berman KF Executive function, neural circuitry, and genetic mechanisms in schizophrenia.(2010) *Neuropsychopharmacology* 35:258-277.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36:131-137.
- Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacon BJ, Tapia D, Bargas J, Galarraga E (2010) Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci* 4:15.
- Folstein MF, Robinson R, Folstein S, McHugh PR (1985) Depression and neurological disorders. New treatment opportunities for elderly depressed patients. *J Affect Disord Suppl* 1:S11-14.
- Gainetdinov RR, Mohn AR, Caron MG (2001) Genetic animal models: focus on schizophrenia. *Trends Neurosci* 24:527-533.
- Geddes JR, Goodwin GM, Rendell J, Azorin JM, Cipriani A, Ostacher MJ, Morriss R, Alder N, Juszczak E (2010) Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomised open-label trial. *Lancet* 375:385-395.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 15:285-320.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N (2003) A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 425:917-925.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244-254.

- Guzman RG, Kendrick KM, Emson PC (1993) Effect of substance P on acetylcholine and dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. *Brain Res* 622:147-154.
- Henderson JN, Ai HW, Campbell RE, Remington SJ (2007) Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6672-6677.
- Howes OD, Montgomery AJ, Asselin MC, Murray RM, Valli I, Tabraham P, Bramon-Bosch E, Valmaggia L, Johns L, Broome M, McGuire PK, Grasby PM (2009) Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 66:13-20.
- Husain MM, McDonald WM, Doraiswamy PM, Figiel GS, Na C, Escalona PR, Boyko OB, Nemeroff CB, Krishnan KR (1991) A magnetic resonance imaging study of putamen nuclei in major depression. *Psychiatry Res* 40:95-99.
- Ip NY, Boulton TG, Li Y, Verdi JM, Birren SJ, Anderson DJ, Yancopoulos GD (1994) CNTF, FGF, and NGF collaborate to drive the terminal differentiation of MAH cells into postmitotic neurons. *Neuron* 13:443-455.
- Jiang Z, Zhang Y, Chen XQ, Lam PY, Yang H, Xu Q, Yu AC (2003) Apoptosis and activation of Erkl/2 and Akt in astrocytes postischemia. *Neurochem Res* 28:831-837.
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32:577-595.
- Jorm AF, Henderson AS, Scott R, Korten AE, Christensen H, Mackinnon AJ (1995) Factors associated with the wish to die in elderly people. *Age Ageing* 24:389-392.
- Kandel, Schwartz, Jessel, (2000). *Principle of neural science* 4^{ème} edition.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kimura H, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG (1981) The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J Comp Neurol* 200:151-201.
- Kramer, P. F., Christensen, C. H., Hazelwood, L. A., Dobi, A., Bock, R., Sibley, D. R., Mateo, Y., and Alvarez, V. A. (2011). Dopamine D2 receptor overexpression alters behavior and physiology in *Drd2-EGFP* mice. *J. Neurosci.* 31, 126–132.
- Krantis Anthony et Staines William présentation par affiche à la 42^{ème} rencontre de la Société de Toxicologie du 21 au 25 Mars 2003, Nashville, Tennessee USA San Diego en 1998.
- Krishnan KR, McDonald WM, Escalona PR, Doraiswamy PM, Na C, Husain MM, Figiel GS, Boyko OB, Ellinwood EH, Nemeroff CB (1992) Magnetic resonance imaging of the caudate nuclei in depression. Preliminary observations. *Arch Gen Psychiatry* 49:553-557.
- Krishnan KR, McDonald WM, Doraiswamy PM, Tupler LA, Husain M, Boyko OB, Figiel GS, Ellinwood EH, Jr. (1993) Neuroanatomical substrates of depression in the elderly. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 243:41-46.
- Lachowicz JE, Sibley DR (1997) Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol Toxicol* 81:105-113.
- Lee M, Schwab C, McGeer PL (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59:152-165.
- Le Roy V, Delmas Y, Verdoux H (2009) [Chronic renal complications induced by lithium]. *Encephale* 35:605-610.

- Lester J, Fink S, Aronin N, DiFiglia M (1993) Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Res* 621:106-110.
- Lipsky MS, Sharp LK (2001) From idea to market: the drug approval process. *J Am Board Fam Pract* 14:362-367.
- Lobo MK (2009) Molecular profiling of striatonigral and striatopallidal medium spiny neurons past, present, and future. *Int Rev Neurobiol* 89:1-35.
- Mackay AV, Iversen LL, Rossor M, Spokes E, Bird E, Arregui A, Creese I, Synder SH (1982) Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 39:991-997.
- Matamales M, Bertran-Gonzalez J, Salomon L, Degos B, Deniau JM, Valjent E, Herve D, Girault JA (2009) Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic mice. *PLoS One* 4:e4770.
- Melzer D, Fryers T, Jenkins R, Brugha T, McWilliams B (2003) Social position and the common mental disorders with disability: estimates from the National Psychiatric Survey of Great Britain. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 38:238-243.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Murray AM, Hyde TM, Knable MB, Herman MM, Bigelow LB, Carter JM, Weinberger DR, Kleinman JE (1995) Distribution of putative D4 dopamine receptors in postmortem striatum from patients with schizophrenia. *J Neurosci* 15:2186-2191.
- Nault F and DeKoninck P (2010) Protocols for neural cell culture, Chapter 8, Springer Protocols Handbooks. Humana Press.
- Oertel WH, Mugnaini E (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* 47:233-238.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91-127.
- Perreault ML, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2011) The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 5:31.
- Perreault ML, Hasbi A, Alijaniam M, Fan T, Varghese G, Fletcher PJ, Seeman P, O'Dowd BF, George SR (2010) The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *J Biol Chem* 285:36625-36634.
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* 238:286-307.
- Phelps PE, Vaughn JE (1986) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat ventral striatum: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 15:595-617.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:654-659.

- Ribak CE, Vaughn JE, Roberts E (1979) The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J Comp Neurol* 187:261-283.
- Seeman P, Guan HC, Van Tol HH (1993) Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature* 365:441-445.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567-1572.
- Sharp FR, Tomitaka M, Bernaudin M, Tomitaka S (2001) Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci* 24:330-334.
- Shuen JA, Chen M, Gloss B, Calakos N (2008) *Drd1a-ttdTomato* BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *J Neurosci* 28:2681-2685
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24:1217-1281.
- Swift JL, Godin AG, Dore K, Freland L, Bouchard N, Nimmo C, Sergeev M, De Koninck Y, Wiseman PW, Beaulieu JM (2011) Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:7016-7021.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G, Girault JA (2009) Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* 32:538-547.
- Warre, R., Thiele, S., Talwar, S., Kamal, M., Johnston, T. H., Wang, S., Lam, D., Lo, C., Khademullah, C. S., Perera, G., Reyes, G., Sun, X. S., Brotchie, J. M., and Nash, J. E. (2011). Altered function of glutamatergic cortico-striatal synapses causes output pathway abnormalities in a chronic model of Parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* 41, 591–604.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.
- Zhang ZW, Burke MW, Calakos N, Beaulieu JM, Vaucher E (2010) Confocal Analysis of Cholinergic and Dopaminergic Inputs onto Pyramidal Cells in the Prefrontal Cortex of Rodents. *Front Neuroanat* 4:21.

Annexe 1 : Protocoles détaillés

❖ PROTOCOLE D'IMMUNOCYTOCHIMIE :

Le protocole à suivre en immunocytochimie est le suivant :

- Fixation des cellules dans la paraformaldéhyde 15-20mn
- rinçage avec PBS 3X10mn
- Si épitopes antigéniques intracellulaires étape de perméabilisation blocage avec Triton X-100 0.1% et goat serum 2% dans le PBS 45 mn
- Si épitopes antigéniques extracellulaires étape de blocage seul avec goat serum 2% dans le PBS 45 mn
- Mise en contact avec l'anticorps primaire dans la même solution que précédemment pendant toute la nuit (O/N)
- Rinçage avec PBS 3X10mn
- Mise en contact avec l'anticorps secondaire dans la solution de perméabilisation/blocage ou solution de blocage en fonction de l'épitope à taguer pendant 45-60mn
- Rinçage avec PBS 3X10mn
- Montage lamelle sur lame avec vectashield

-Anticorps primaires utilisés : anti-**NeuN** MAB 361 Chemicon au 1/2000, lapin polyclonal anti-**ChAT** au 1/200, lapin anti-**GAD** Millipore au 1/250, anti-**DARPP32** CST au 1/500, rat anti-**DAT** Chemicon au 1/200, souris anti-**VMAT2** Chemicon au 1/500, anti-**TyrOHase** au 1/200, rat anti **TrkB** R&D system au 1/20, souris anti-**GFP** Santa Cruz Biotechnology au 1/50, polyclonal anti-**GFP** lapin abcam au 1/200, monoclonal anti-**DsRed** clontech au 1/300, lapin polyclonal anti-**D2R** millipore au 1/100, monoclonal rat anti-**D1R** au 1/100

-Anticorps secondaires utilisés : **Alexa Fluor 647**, chèvre anti souris ou lapin ou rat en fonction de l'anticorps primaire utilisé, au 1/1000 InVitrogen

❖ CULTURE EN PLAQUES DE 96 PUIITS :

Les embryons sont prélevés dans une femelle gestante sous anesthésie par isoflurane. La femelle est ensuite tuée par dislocation cervicale. Puis, on place les embryons dans le HBSS glacé. Il convient d'extraire les embryons du sac vitellin et de couper les têtes. La peau du crâne est alors coupée en 2 en position sagittale, même chose pour l'os du crâne en passant par le canal de la moelle épinière. Le cerveau est prélevé puis coupé en 2 dans le sens sagittal. Prélèvement cortico-striatal. Ces prélèvements sont ensuite coupés en petits morceaux avec un scalpel. Incubation dans une solution de papaïne pendant 5 à 10 minutes. Cette solution contient de la papaïne et de la DNase. Seuls les morceaux sont récupérés et placés dans une solution de trituration contenant de la BSA et de la DNase. On procède ensuite à une trituration avec une pipette pasteur dont la pointe a été préalablement passée dans la flamme (pour la rendre mousse) jusqu'à ce que le milieu devienne trouble (< 20 fois). Le tube est laissé à sédimenter pendant 2 minutes puis le surnageant est prélevé et mis dans un nouveau tube. L'opération est recommencée deux fois à l'aide de 2 ml de milieu de trituration. Le surnageant est séparé en 4 tubes puis centrifugé à 300G pendant 5 minutes. Après centrifugation, le surnageant est retiré et les culots cellulaires sont resuspendus très doucement dans du milieu de culture. Après dilution au 1/5^{ème} dans le bleu trypan les cellules sont comptées sur un Hémacytomètre ou une cellule de Mallassez. Le Comptage se fait sur 4 carreaux avec le calcul suivant : $(N/4) \times 5 \times 10\ 000$. On procède ensuite à l'ensemencement à 100 000 cellules par puits. Chaque puits est complété avec du milieu de culture Lonza ou Neurobasal additionné de 5% de sérum de veau foetal à 200 µlitre de volume final. Solutions issues de Nault et Dekoninck, 2010.

Le protocole suivi est le suivant :

A - MISE EN CULTURE ET ENTRETIEN : adapté de Nault et Dekoninck, 2010

- prélèvement des embryons entre E14 et E18 sur une femelle enceinte sous anesthésie par isoflurane
- mise à mort de la mère par dislocation cervicale
- embryons dans HBSS glacé
- retrait des embryons du sac vitellin

- couper les têtes
- couper en 2 en position sagittale la peau du crâne
- même chose pour l'os du crâne en passant par le canal de la moelle épinière
- prélever le cerveau
- le couper en 2 dans le sens sagittal
- prélèvement cortico-striatal
- couper en petits morceaux avec un scalpel
- incubation dans une solution de papaïne 5-10 mn (composition : papaïne, DNase, HBSS,)
- récupérer seulement les morceaux et les placer dans une solution de trituration contenant BSA, DNase, 2 ml
- triturer avec une pipette pasteur dont pointe préalablement passée dans une flamme jusqu'à ce que le milieu devienne trouble (<20 fois)
- laisser sédimenter
- prélever le surnageant et le mettre dans un tube
- Remettre 2 ml de milieu de trituration et recommencer l'opération (X2)
- Séparer le surnageant en 4 tubes
- Centrifuger à 300G pendant 5mn
- Urgent mettre du milieu de culture pour resuspendre les culots
- réhomogénéiser de façon douce
- compter avec cellules de mallasez (diluer au 1/5 avec du bleu trypan)
- 4 carreaux $(N/4) \times 5 \times 10000 =$ nombre de cellules
- ensemencer à 10000 cellules par puits
- Changer le milieu tous les 3 jours avec le milieu Lonza contenant du NGF ou du NBC contenant 5% de FBS additionné de 242 μ L de U5'TP à 10 mg/mL et 123 μ L de 5 FdU à 10 mg/mL (antimitotiques)
- Solutions selon Nault et Dekoninck, 2010 :
- NBC, Neurobasal media, B-27 supplement 50 \times , au 1/50, pen/strep, au 1/200, Glutamax-1 (200 mM), au 1/400
- Solution de dissection, 40 mL dissection solution sans 40 \times solution, 1 mL 40 \times solution
- Solution de trituration, 47.8 mL neurobasal media, 332.5 μ L, BSA stock (300 mg/mL), 1.25 mL 40 \times solution, 660 μ L, DNase I solution

-Solution de Papaine, 4.5 mL 6.67× solution, 300 µL L-cystéine 100×, 750 µL 40× solution, 400 µL DNase 1 solution, 24 mL H₂O distillée

B - STIMULATION ET MARQUAGE PLAQUE de 96 PUIITS :

-changer le milieu des cellules 6 heures avant la stimulation avec 100µL de NBC sans serum par puits

-stimulation de certains puits avec 100µL de NBC contenant les drogues (LY ou BpVphen) concentration X2 : LY294002 (Sigma) à 100 µM et BpVphen (Sigma) à 60 µM

-fixation avec PFA 16% ou 8% dépendant du volume restant dans le puits

-rinçages avec acide okadaïque (Tocris) dilué à une concentration finale de $30 \cdot 10^{-3}$ µM dans le PBS 3X 5mn

-perméabilisation/blocage avec Triton X-100 0.1%, goat serum 2% tween 0.1% dans PBS acide okadaïque pendant 30 minutes 100µL par puits

-incubation avec anticorps primaire toute la nuit dans cette solution (50µL par puits)

-rinçage 5X <5mn dans PBS

-incubation anticorps secondaire dans solution de perm/block (50µL par puits)

-rinçage 5X <5mn dans PBS

-sécher les puits complètement

-lecture au ***LI-COR*** (mise au point du focus pour éviter le dédoublement ou flou dans les 2 canaux 680 et 800 nm)

-Anticorps primaires utilisés : mouse anti-**GSK3 total** CST au 1/200, rabbit anti-**Déphospho-GSK3** clone 293 Phosphosolutions au 1/50

-Anticorps secondaires utilisés : anti-mouse **LI-COR 680** au 1/200, anti-rabbit **LI-COR 800** au 1/800

-Dans le cadre de ***l'étude en microscopie***

-Anticorps primaires utilisés : souris monoclonal anti-**Tau** Chemicon au 1/200, lapin anti-tau au 1/200 InVitrogen, souris monoclonal anti-**Map2** Sigma au 1/250, souris monoclonal anti-**GFAP** Sigma au 1/200

-Anticorps secondaires utilisés : **Alexa Fluor 488** et **Alexa Fluor 568**, chèvre anti-lapin ou souris ou rat en fonction des anticorps primaires Invitrogen au 1/1000