

Unité d'enseignement de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire

Première session année 2021-22

VOUS DEVEZ COMPOSER LES DEUX SUJETS SUR DEUX COPIES DIFFÉRENTES

Sujet de Micaela Galante (durée conseillée : 45min)

Synaptic function and plasticity in identified inhibitory inputs onto VTA dopamine neurons. Polter A. M., Barcomb K., Tsuda A. C. and Kauer J. A.

Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA) reçoivent des afférences inhibitrices à partir de neurones situés dans la VTA (35% de la totalité des cellules contenues dans cette structure) mais également de la part du noyau tegmental rostro-médian (RMTg) autrement connu comme la 'queue' de la VTA (Figure 1A). L'étude vise à disséquer ces deux types d'afférences de nature GABAergique : intrinsèque à la VTA (VTA→VTA) et extrinsèques à cette structure, notamment à partir du RMTg (RMTg→VTA).

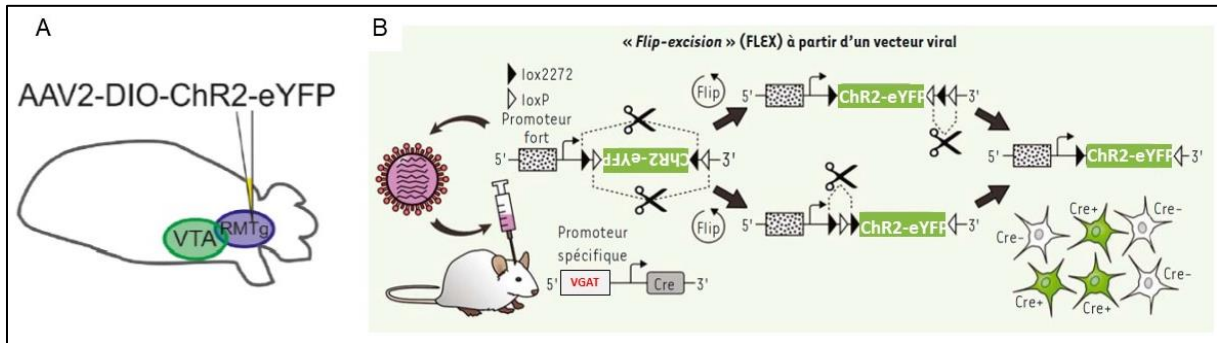


Figure 1. A. Schéma représentant la localisation de la VTA et du RMTg dans une coupe parasagittale de cerveau de souris. La pipette indique l'application du virus AAV2-DIO-ChR2-eYFP dans le RMTg. Cette injection se fait par stéréotaxie *in vivo* chez la souris VGAT-Cre anesthésiée. La présence de la protéine fluorescente eYFP permettra de visualiser les neurones qui ont été infectés par le virus. **B.** Principe de fonctionnement du virus sur la souris transgénique VGAT-Cre.

Les auteurs utilisent des approches multiples incluant l'optogénétique, l'injection de virus par stéréotaxie et le patch-clamp. Les expériences sont effectuées sur des tranches de cerveau de souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase sous un promoteur spécifique des neurones GABAergiques (VGAT, transporteur vésiculaire du GABA). L'injection dans la région d'intérêt (VTA ou RMTg) d'un adénovirus portant le gène pour la channelorhodopsine-2 (ChR2) est effectuée sur des souris adultes et les expériences d'optogénétique sont effectuées 3-4 semaines après application du virus (Figure 1).

Les chercheurs réalisent des expériences en patch-clamp, configuration cellule entière, sur coupes de cerveau de souris injectées avec le virus AAV2-DIO-ChR2-eYFP dans la VTA (Figure 2a). Ils ciblent les neurones de la VTA qui ne sont pas fluorescents. La figure 2c montre un exemple de la réponse d'un neurone de la VTA en réponse à des stimuli de lumière bleue (durée de chaque stimulus : 2ms, fréquence : 20Hz).

Q1. Rappeler synthétiquement le principe de l'optogénétique.

Q2. Pourquoi les chercheurs enregistrent en patch-clamp les neurones de la VTA qui ne sont pas fluorescents ?

Q3. Comment définiriez-vous le type de réponse aux stimuli lumineux du neurone en figure 2c ?

Q4. Dans quelle modalité du patch-clamp le neurone en Figure 2c a été enregistré ?

Q5. D'après les résultats de la Figure 2a-g, est-ce qu'on peut dire que l'approche virale effectuée *in vivo* a été efficace ? (Justifier la réponse)

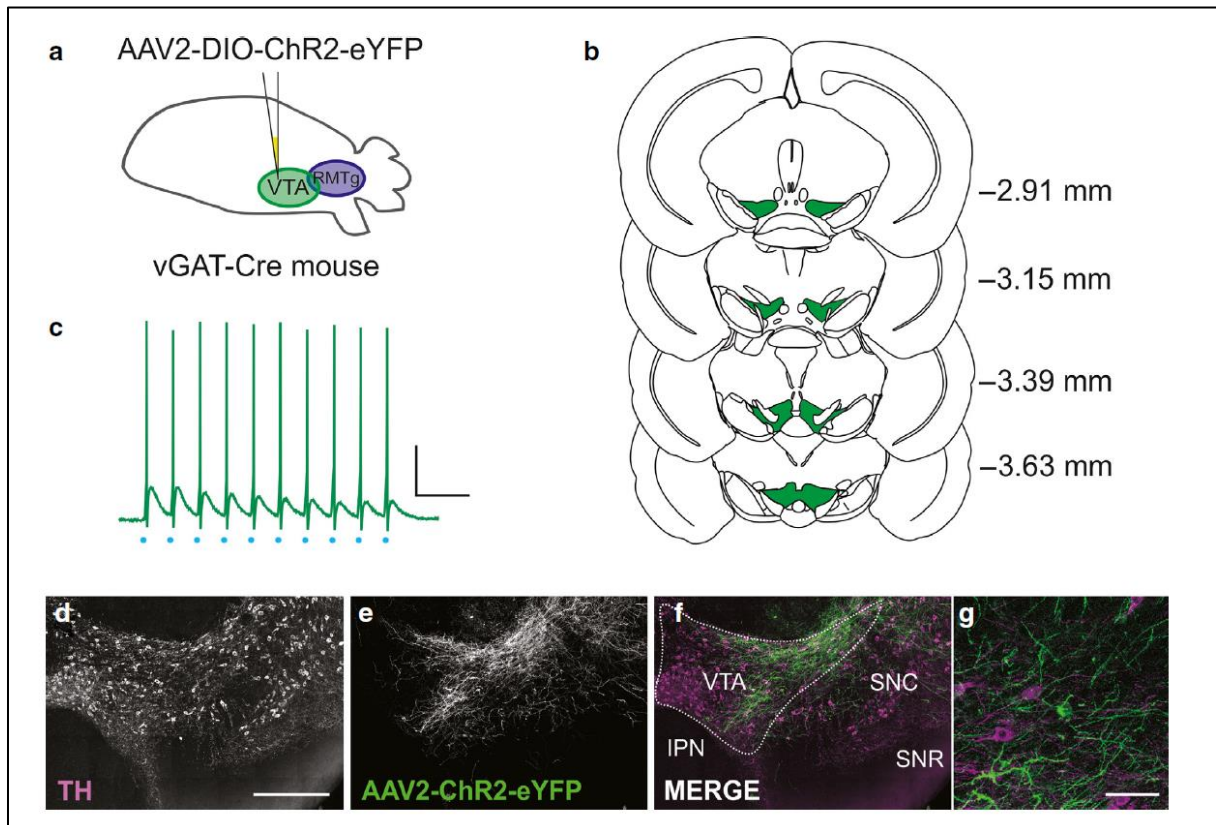


Figure 2. **a.** Schéma de la région d'injection. **b.** Sections coronales illustrant la position de la VTA (en vert) dans l'axe rostro (en haut)-caudal (vers le bas). **c.** Réponses d'un neurone de la VTA à des stimuli de lumière bleue (représentés en bas du tracé, en bleu. Echelles : 20mV, 100ms. **d-g.** Section coronale de la VTA 3 semaines après l'injection d'AAV2-ChR2-eYFP. **d.** Marquage avec anticorps dirigé vers la Tyrosine hydroxylase (TH) un marqueur classique des neurones dopaminergiques (gris); échelle 500 μ m. **e.** Expression du virus AAV2-ChR2-eYFP (gris) dans la même région qu'en **d.** **f.** Superposition des images **d** et **e** avec marquage TH (violet) et AAV2-ChR2-eYFP (vert) ; IPN, noyau interpedunculaire; SNC, substance noire pars compacta ; SNR, substance noire pars reticulata. **g.** Image à plus haut grossissement montrant des fibres et des corps cellulaires exprimant l'AAV2-ChR2-eYFP (vert). On remarque aussi des corps cellulaires TH+ (violet). Echelle: 25 μ m.

Dans la figure 3, les courants post-synaptiques inhibiteurs évoqués par l'activation optogénétique des fibres GABAergiques (IPSCs) sont étudiés à partir des neurones dopaminergiques de la VTA (synapse VTA→VTA ou synapse RMTg→VTA).

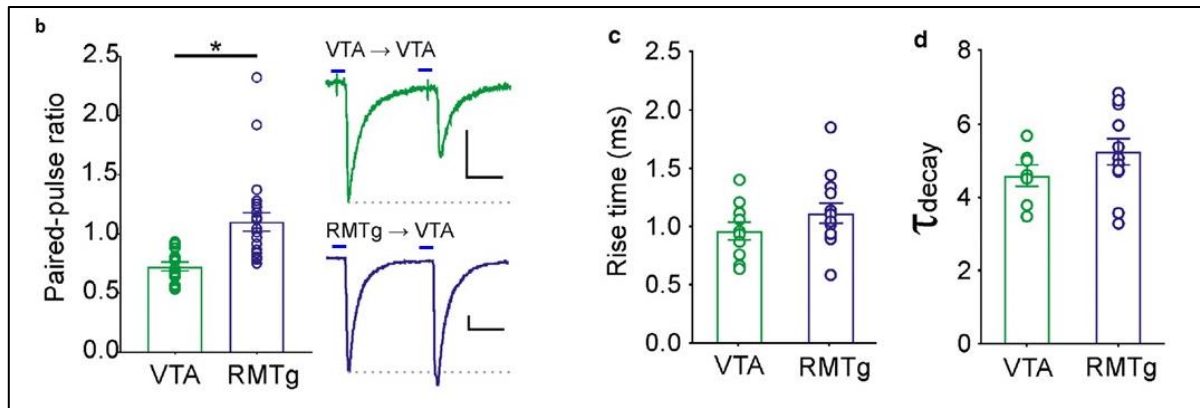


Figure 3. b. Les traces représentent les IPSCs induits par l'activation optogénétique des synapses VTA→VTA (en haut) ou des synapses RMTg→VTA (en bas) en imposant un potentiel de -60mV. Deux pulses successifs de lumière, séparés de 50 ms, sont appliqués et le rapport entre l'amplitude du 2^{ème} IPSC et l'amplitude du 1^{er} IPSC est calculée et représentée à gauche (*P = 0.01, Mann-Whitney U test; VTA inputs: n = 13 cellules/11 souris; RMTg inputs: n = 23 cellules/19 souris). Echelles: 100 pA, 20 ms. **c-d.** Valeurs individuelles (cercles) et moyennes (histogrammes) du temps de montée et du temps de décroissance des IPSCs enregistrés aux deux types de synapse (VTA→VTA : n = 7 cellules/6 souris et VTA→RMTg: n = 11 cellules/9 souris). Dans ces expériences, les tranches de cerveau baignent dans une solution extracellulaire contenant 126mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.4mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 11mM glucose, 21mM NaHCO₃. La solution contenue dans la pipette de patch clamp contient : 125mM KCl, 2.8 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2mM Na₂ATP, 10mM HEPES.

Q5. Les IPSCs enregistrés dans les neurones de la VTA sont dus à l'activation des récepteurs de type GABA_A. En vous appuyant sur vos connaissances théoriques, citez trois propriétés marquantes de ce type de récepteur.

Q6. Est-ce que les IPSCs montrés dans ces figures sont entrants ou sortants ?

Q7. Comparez les propriétés des IPSCs montrés en Figure 3b-d. Quelle est la différence la plus remarquable ? Qu'est-ce qu'on peut déduire à propos de la libération de GABA à ces deux types de synapses ?

Des articles publiés avant celui de *Polter et al.*, ont montré que certains neurones GABAergiques de la VTA projetant vers d'autres structures cérébrales, libèrent le GABA et le glutamate (on parle de co-libération de neurotransmetteurs). Pour tester si une telle co-libération aurait lieu également au niveau des synapses VTA→VTA, les auteurs de cet article effectuent les expériences de la Figure 4a et 4b.

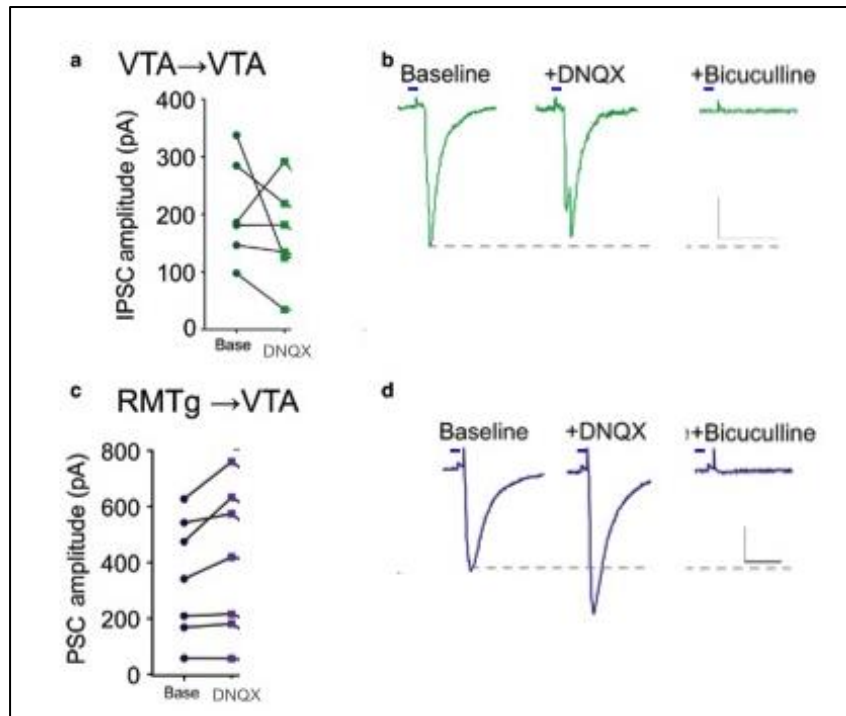


Figure 4. *a, c.* Amplitudes maximales des Courants Post-Synaptiques (PSCs) enregistrés dans les neurones de la VTA en absence ('base') et en présence de DNQX (10 μ M) pour les synapses VTA→VTA (en haut) ou RMTg→VTA (en bas). Les PSCs sont induits par la photostimulation des afférences GABAergiques, de la même manière que dans les autres figures. Les tests statistiques comparant les amplitudes avant et après l'ajout de DNQX montrent qu'il n'y pas de différence significative entre la situation contrôle et l'ajout de NBQX ($P>0.05$). *b, d.* Exemples de CPSs avant l'ajout de NBQX et en présence de cette drogue. Les tracés à droite montre le PSC en présence de NBQX et Bicuculline (30 μ M). Echelles : 20ms et 100pA.

Q8. Quel type de récepteurs sont ciblés par le NBQX et la Bicuculline ? Est-ce que ces agents pharmacologiques sont des agonistes, antagonistes, ... ?

Q9. Expliquez les résultats en Figure 4a et 4b.

Q10. Est-ce qu'ils démontrent la présence de co-libération de GABA et glutamate à la synapse VTA→VTA? (Justifier la réponse)

Q11 (bonus). La figure 4c et 4d, répète le même protocole pharmacologique qu'en 4a et 4b sur les PSCs enregistrés à la synapse RMTg→VTA. Comment pourriez-vous expliquer l'augmentation de l'amplitude du CPS parfois observée en présence de NBQX ?

Imaginez d'être parmi les auteurs du papier *Polter et al.* et de vouloir étudier plus à fond la transmission glutamatergique au sein de la VTA (on laisse la co-libération GABA-glutamate d'à côté dans cette partie).

Q12. Compte-tenu que vous disposez des outils techniques décrits jusqu'à présent, proposez au moins une expérience visant à démontrer la présence de récepteurs AMPA dépourvus de la sous-unité GluR2 sur les neurones de la VTA.

Sujet d'Eric Schwartz

(Durée conseillée : 45min, notation sur 10pts).

Q1) Dessinez une synapse glutamatergique. Indiquez les protéines et les flux ioniques nécessaires à la transmission synaptique glutamatergique en commençant par l'invasion d'un potentiel d'action dans le terminal présynaptique. Précisez les emplacements sub-synaptiques de chaque protéine. Indiquez la perméabilité ionique et la direction du flux ionique pour tous les canaux et récepteurs ionotropiques. Indiquez 1 vésicule présynaptique accostée (« docked ») et 1 vésicule présynaptique non-accostée. Indiquez également les localisations typiques et les cibles possibles en aval (au moins 2) des récepteurs métabotropiques du glutamate (4 pts. 15-20 min).

Q2) Les réponses synaptiques ont été enregistrées dans les neurones de deux noyaux différents en configuration de voltage imposé, cellule entière. Les afférences de ces neurones ont été activées en augmentant progressivement la stimulation électrique (Stim V sur l'axe des x) tout en enregistrant les courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs) évoquées. L'amplitude des EPSCs est représentée en fonction de l'intensité relative de la stimulation électrique pour ces deux synapses, « Synapse A » et « Synapse B » (**Figure X1**).

Interprétez les données. Indiquez ce que ces résultats suggèrent en termes d'anatomie de cette synapse. (2 pts, 5 à 10 minutes).

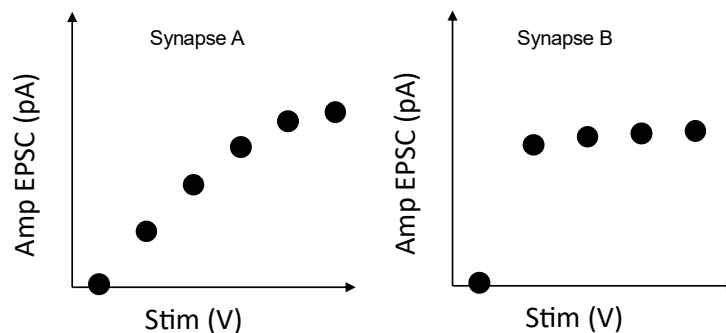


Figure X1.

Q3) D'après...Jeong et al. 2013. *Cholinergic modulation of primary afferent glutamatergic transmission in rat medullary dorsal horn neurons. J. Neuropharmacology.*

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, ou mAChR, sont des récepteurs de l'acétylcholine couplés aux protéines G. Les agonistes muscariniques sont connus pour leurs effets analgésiques dans des modèles animaux de douleur trigéminal. Dans cette étude, les chercheurs ont cherché à savoir si l'activation sélective des récepteurs cholinergiques muscariniques (mAChR) pouvait moduler la transmission synaptique glutamatergique entre les afférences sensorielles primaires et les neurones de la corne dorsale médullaire dans des tranches horizontales *ex vivo* du tronc cérébral. Pour ce faire, ils ont enregistré les EPSCs dans les neurones de la corne dorsale tout en stimulant électriquement les afférences sensorielles primaires dans des conditions de contrôle et pendant l'application de muscarine. Leurs résultats sont présentés dans la **figure X2**.

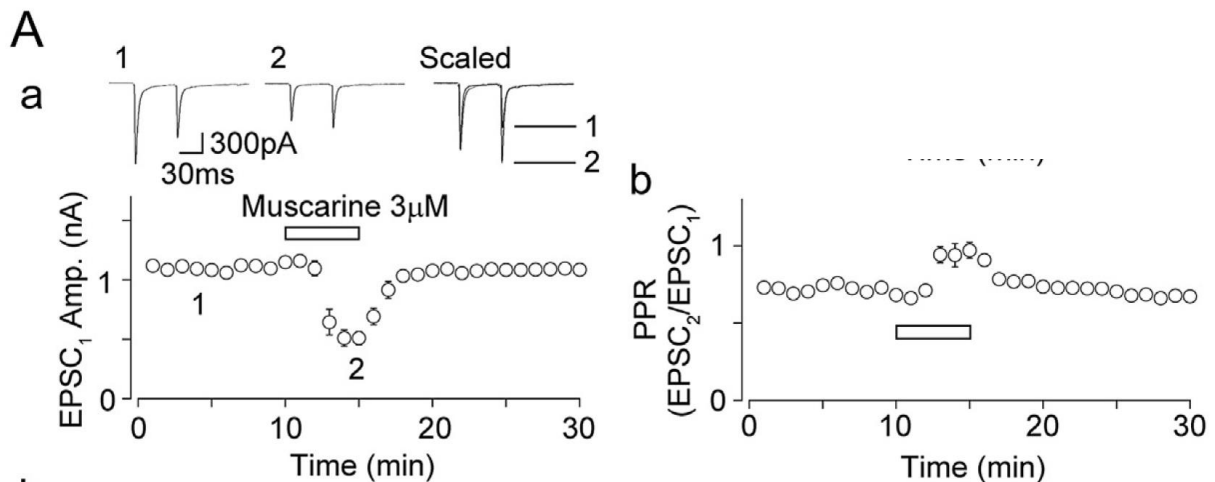
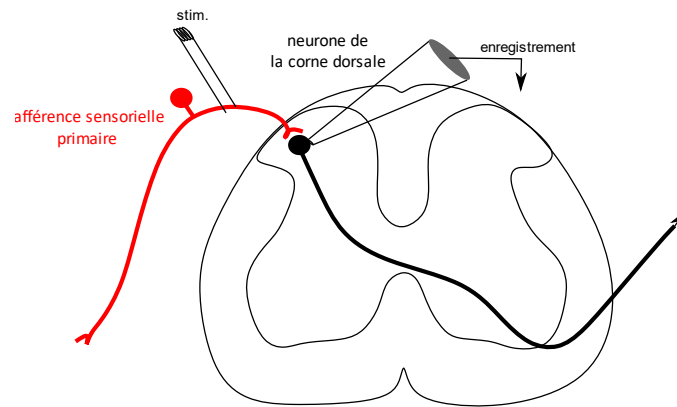


Figure X2. A) Des EPSCs sont évoqués en stimulant électriquement les afférences primaires présynaptiques 2 fois de suite avec un intervalle de 50 ms. Ces deux EPSCs sont indiqués comme EPSC1 et EPSC2. Cette double stimulation est répétée une fois par minute pendant 30 minutes. Pour isoler la réponse glutamatergique des récepteurs AMPA, l'activité des récepteurs GABAergiques, Glycinergiques et NMDA a été bloquée par l'application d'antagonistes spécifiques. a) en haut : exemples d'EPSCs enregistrés en contrôle (point temporel "1"), pendant l'application de muscarine (point temporel "2"), et mises à l'échelle de sorte que EPSC1 ait la même amplitude pour les deux conditions (« scaled »). En bas : l'amplitude maximale de l'EPSC1 est représentée en fonction du temps. b) Le PPR calculé comme le rapport entre l'amplitude de l'EPSC2/ l'amplitude de l'EPSC1, est représenté en fonction du temps.

La barre blanche en a) et en b) indique l'application de la muscarine à une concentration de $3\mu\text{M}$.

Q3b) En appuyant sur l'équation qui décrit la transmission synaptique quantique interprétez ces résultats et donnez une explication possible pour les changements dans les réponses synaptiques en contrôle et pendant l'application de muscarine. (4 pts. 15 min).