

# Utilisation des marqueurs d'activation précoce, avantages et contraintes

AMARINE CHANCEL, JUSTIN MALCEY, PIERRE-HERVÉ LUPPI

INSERM, U1028; CNRS, UMR5292; Lyon Neuroscience Research Center, Team "Physiopathologie des réseaux neuronaux responsables du cycle veille-sommeil", Lyon, France, University Lyon 1, Lyon, France.

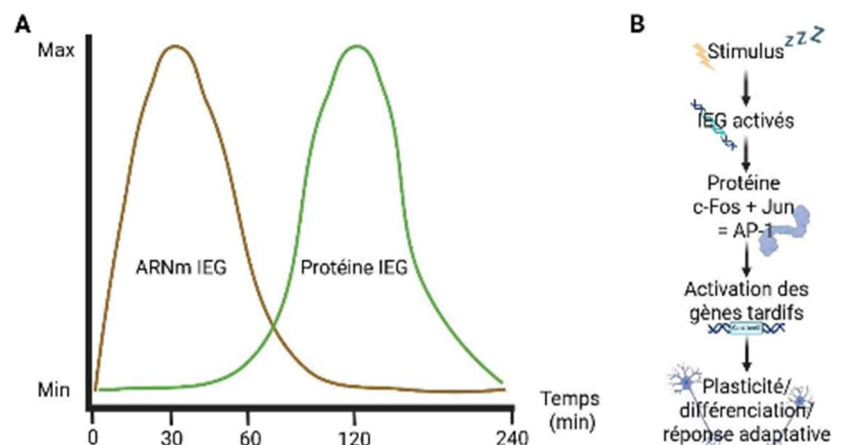
## c-Fos, un marqueur de l'activation neuronale

Le gène viral v-fos et son homologue cellulaire c-fos ont été découverts dans les années 1980 (1). En 1984, il est montré que le gène c-fos est un gène à réponse précoce (IEG, immediate early gene) dont la transcription est activée en quelques minutes par des facteurs de croissance (1). La transcription du c-fos est pilotée par l'élément de réponse au  $\text{Ca}^{2+}$ /AMPc ( $\text{Ca}^{2+}$ /cAMP response element) de son promoteur, lequel est activé par l'afflux intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  via des kinases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que par le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein). La protéine c-Fos est un facteur de transcription qui va activer l'expression de gènes tardifs par exemple des récepteurs synaptiques (1).

Les premières utilisations majeures en Neurosciences sont publiées avec la cartographie de neurones exprimant dans leurs noyaux la protéine c-Fos (1). A la suite d'un stimulus, l'expression de l'ARN messager atteint son pic après 30 minutes et celle de la protéine après 120 minutes

**Figure 1 :** Courbe de production de l'ARNm et de la protéine c-Fos. A. Le graphique présente le profil temporel d'expression du gène c-fos précoce (IEG), avec une expression maximale de l'ARNm 30 minutes après le début du stimulus et une expression maximale de la protéine 120 minutes après le début de la stimulation. B. Cascade d'activation transcriptionnelle du c-fos. Induction d'une stimulation neuronale (ex. activité synaptique, neurotransmetteur, facteur de croissance) qui active les voies de signalisation intracellulaires  $\text{Ca}^{2+}$ , MAPK/ERK, CREB... Ce qui induit les IEG comme c-Jun, Egr1, Arc, Npas4, c-Fos (ARNm produit rapidement, en 5–15 min) se traduisant en protéine qui va agir comme un facteur de transcription. c-Fos s'associe avec c-Jun pour former le complexe AP-1. Celui-ci se fixe sur l'ADN (séquences promotrices TRE/CRE) ce qui va activer les gènes tardifs comme le BDNF, la tyrosine hydroxylase, les récepteurs synaptiques, la prodynorphine... Enfin, cela induit la plasticité synaptique, la mémoire, la différenciation, l'adaptation cellulaire.

(2) (Figure 1). La demi-vie de la protéine Fos est d'environ 40 minutes et moins de 5 % de la protéine subsiste 3 heures après stimulation (2). Depuis ses premières applications expérimentales (2), la protéine c-Fos est devenu le marqueur neuroanatomique fonctionnel le plus utilisé pour identifier les neurones activés, et ce pour plusieurs raisons : 1) il est exprimé à de faibles niveaux dans le cerveau en condition basale (nous reviendrons sur ce concept de condition basale plus bas), 2) son expression neuronale est induite de manière stéréotypique en réponse à plusieurs signaux extracellulaires, notamment l'entrée de calcium, la libération de neurotransmetteurs, la sécrétion de facteurs de croissance et l'effet de substances pharmacologiques. De même, sa réponse est transitoire, sa détection est simple par immunohistochimie et elle peut être facilement combinée à celle d'autres marqueurs, notamment celle de neurotransmetteurs ou de leurs enzymes de synthèse, de neuropeptides par immunohistochimie ou par hybridation *in situ*. Le marquage c-Fos peut aussi être combinée avec celui de traceurs rétrogrades et d'autres marqueurs

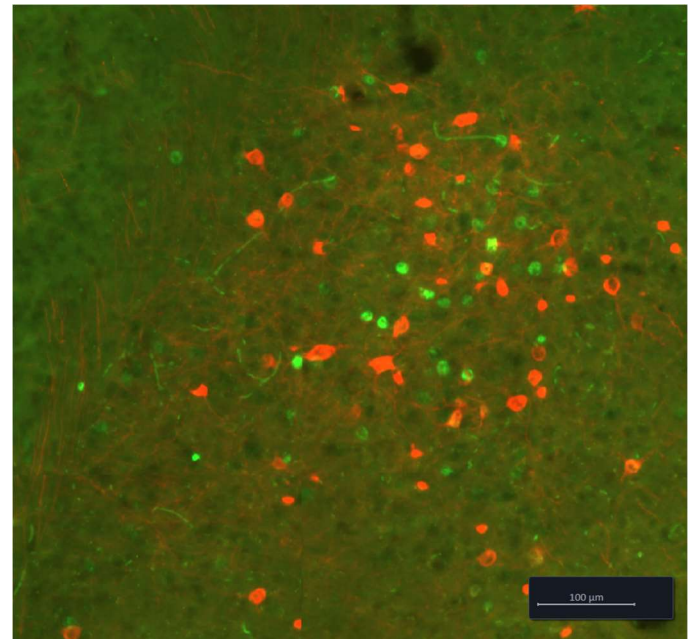


d'activité (3, 4). Il constitue un outil unique pour identifier sans a priori dans l'ensemble du cerveau les neurones activés en réponse à des stimuli pharmacologiques et physiologiques ponctuels.

Il existe d'autres IEG pour imager l'activation neuronale tel que Arc/Arg3.1 jouant un rôle clé dans la modification synaptique dépendante de l'activité, dans la potentialisation à long terme et la formation de la mémoire (2), mais son expression est limitée aux zones télencéphaliques du cerveau et n'existe pas dans les neurones de l'hypothalamus dans des conditions basales ou en réponse à différents facteurs de stress. Homer1a reflète davantage la plasticité synaptique que l'activation neuronale, Egr-1/Zif268 est associé à la plasticité synaptique et à la mémoire à long terme, JunB, c-Jun, Fra-1, Fra-2 sont des membres de la famille AP-1 souvent coexprimés avec c-Fos, mais ils ont des cinétiques différentes (3). Ainsi, c-Fos est le marqueur fonctionnel le plus adapté à l'identification de neurones activés par un stimulus. Plus récemment, le développement de transgènes avec un promoteur c-Fos a permis l'émergence de nouvelles stratégies pour étudier les neurones qui expriment c-Fos. Par exemple, le modèle de souris transgéniques (TRAP2-red) exprime CRE-ERT2 sous le promoteur c-Fos (ERT2, deux gènes du récepteur des œstrogènes T2). L'administration de tamoxifène permet au CRE-ERT2 de rentrer dans le noyau des neurones et d'enlever le codon stop d'un autre transgène qui peut être un gène rapporteur comme le tdTomato [5]. (Tous les détails de cette technique sont décrits dans la Lettre n° 60, page 36).

Dans l'équipe, nous avons utilisé de façon extensive l'analyse de l'expression du c-Fos depuis plus de trente ans (6). Depuis ce papier, nous avons utilisé le méthode c-Fos dans de très nombreuses études. Notre principal objectif au cours de ces trois décennies a été d'identifier les réseaux neuronaux activés pendant le sommeil paradoxal à l'origine de sa genèse et de ses fonctions. Dans cette optique, nous avons couplé le marquage c-Fos avec 1) le traçage rétrograde avec la sous-unité B de la toxine cholérique (4), 2) l'immunohistochimie de neurotransmetteurs ou de leur enzymes (7) 3) l'hybridation *in situ* de marqueurs des neurones GABAergiques (transporteur vésiculaire du GABA, vGAT) ou glutamatergiques (transporteur vésiculaire du glutamate, vGlut2) (8, 4) la lésion, l'activation ou l'inactivation pharmacologique locale (4, 9 et 5), le marquage Tdtomato chez la souris TRAP2 (Figure 2) (5, 10). Ce qui fait la force de la méthode c-Fos c'est qu'il permet l'exploration initiale du rôle potentiel de neurones dans une fonction donnée. Il ouvre la porte à l'identification de la fonction de ces neurones mais afin d'apporter une preuve définitive, il doit être couplé avec

des méthodes d'enregistrement électrophysiologique unitaire couplées à l'optogénétique ou à la chémogénétique pour prouver l'implication des neurones identifiés dans une fonction donnée.



**Figure 2 :** Microphotographie montrant des neurones du claustrum immunofluorescents au c-Fos (noyaux verts) et exprimant le gène rapporteur Tdtomato (cytoplasme rouge) sur la souris TRAP2. La souris a été exposée à une période de deux heures d'éveil puis une semaine après, à un rebond de sommeil paradoxal de deux heures après 48h de privation sélective automatique. La plupart des neurones ne sont pas doublement marqués (de couleur jaune) ce qui indique que différents neurones sont actifs pendant l'éveil et le sommeil paradoxal. Notez également le marquage des neurones c-Fos qui montre un spectre de marquage progressif du très faible au très fort.

### Les multiples pièges à éviter avec le c-Fos

La technique c-Fos est donc la méthode de choix pour révéler le rôle de neurones dans une fonction mais pour ce faire de nombreux pièges doivent être évités. Le premier piège est la nécessité de définir une condition basale et une condition expérimentale. L'erreur classique est de penser qu'il existe une condition basale ou l'expression du c-Fos est quasi inexistante. Une telle condition n'existe tout simplement pas puisque prélever le cerveau d'un rongeur pendant la journée (période de travail des expérimentateurs) c'est le faire dans la phase de repos et donc la période de sommeil majoritaire de l'animal de laboratoire. Or, même si l'expression du c-Fos est inférieure pendant le sommeil à celle observée pendant l'éveil, elle n'est pas négligeable. De plus, une demi-heure d'éveil pendant cette période est suffisante pour induire une activation de c-Fos très importante dans tout le cerveau. En théorie, un enregistrement des états de vigilance devrait donc être réalisé pour toute expérience de c-Fos. La deuxième difficulté est la variabilité interindividuelle du marquage c-Fos couplée à

l'intensité du marquage chez un même animal qui s'étend d'un marquage très faible à un marquage intense. Cette caractéristique rend assez subjective la sélection des neurones marqués lors de l'analyse.

A notre connaissance, il n'y a pas de méthodes miracles pour résoudre ce problème et sélectionner de façon objective les neurones marqués chez les animaux d'un même groupe. En effet, réaliser les expériences aux mêmes moments ne permet malheureusement pas d'éliminer cette variabilité. Une possibilité est d'effectuer un grand nombre de marquages sur un grand nombre d'animaux mais on se heurte alors à la difficulté de réaliser une analyse de qualité dans un temps acceptable (comme une thèse par exemple) d'autant plus si on fait une étude du cerveau entier. Une autre caractéristique jamais mise en avant et que nous avons constaté à de multiples reprises sur différents types neuronaux comme les neurones à MCH et à Oréxine, est qu'une population connue pour être active dans un état donné n'exprime jamais à 100% le gène c-fos. On est plutôt en moyenne autour de 40% des neurones. De même en utilisant le double-marquage c-Fos-Tdtomato chez des souris TRAP, soumis à une semaine d'intervalle à la même condition, aucune population ne dépasse 60% de réactivation. A notre connaissance, aucune explication n'a été apportée à ce jour sur la raison sous-jacente à cette absence de marquage d'une partie des neurones. Il est possible que ces neurones n'expriment pas assez de protéine pour qu'elle soit détectable à l'aide de l'immunohistochimie. La troisième difficulté est l'analyse des données. De grands progrès ont été réalisés avec l'introduction de logiciels libres (Qpath et ABBA par exemple) ou payants (Neuroinfo, MBF) permettant une analyse automatique des neurones exprimant le c-Fos et l'alignement automatique des structures avec l'atlas de l'Allen Institute. Ce type d'analyse a également été rendu possible par l'utilisation de l'immunofluorescence à la place de la diaminobenzidine (DAB) pour réaliser des marquages combinés avec d'autres marqueurs. En effet, dans nos études précédentes utilisant l'immunohistochimie, le double marquage était réalisé avec la DAB-nickel pour le premier marquage et la DAB pour le deuxième marqueur. L'addition de nickel permet l'obtention d'un précipité de couleur noire au lieu de marron. L'analyse de ces doubles marquages n'était possible que parce que les marqueurs étaient dans des compartiments cellulaires différents : le c-Fos est nucléaire à l'opposé du marquage cytoplasmique des neurotransmetteurs ou des traceurs. De plus, les logiciels d'analyse automatique ne sont pas encore assez performants pour distinguer simultanément les marquages marrons et noirs. En revanche, l'analyse en fluorescence se fait sur chaque canal fluorescent de façon indépendante et avec l'apparition du deep learning

la reconnaissance automatique est assez performante même si se pose la question des seuils fixés vu la variabilité interindividuelle notée plus haut. En revanche, aucun logiciel ne réalise un recalage automatique des structures satisfaisant. En effet, les méthodes d'immunohistochimie sur coupes individuelles ou sur cerveau entier après clarification induisent toutes des déformations du cerveau (voir [Chloé Chaumeton et collaborateurs dans ce numéro](#)) et donc des erreurs de positionnement des structures en particulier celles de petites tailles ou dans le cas des cortex, des différentes couches. Une correction manuelle est donc obligatoire et elle ne peut être faite correctement que par un expert en neuroanatomie avec une connaissance très complète dans le cas d'analyse du cerveau entier. Dans la littérature scientifique, nous avons constaté à de nombreuses reprises, quelle que soit la qualité des journaux, des problèmes d'erreurs de dénominations des structures. Enfin, la dernière difficulté est l'analyse des données obtenues. Le développement de Python permet aujourd'hui de réaliser des analyses sur des centaines de structures mais il requiert une expertise sur le langage et les statistiques. Malheureusement, il n'existe à notre connaissance aucun logiciel d'analyse utilisable par tous les chercheurs qui réalisent ce type d'étude.

En conclusion, la méthode c-Fos est toujours indétrônée 40 ans après sa découverte pour étudier l'implication de populations de neurones dans une fonction donnée. Cette longévité atteste de la qualité de cette méthode face à la diversité et à la multiplicité des méthodologies d'exploration du cerveau. Elle nécessite cependant une connaissance approfondie de ses limites et de la neuroanatomie pour être utilisée avec discernement. Sur ce, longue vie au c-Fos et longue vie à la neuroanatomie de qualité !

[chancelamarine@yahoo.fr](mailto:chancelamarine@yahoo.fr)

[justin.malcey@gmail.com](mailto:justin.malcey@gmail.com)

[luppi@sommeil.univ-lyon1.fr](mailto:luppi@sommeil.univ-lyon1.fr)

### Références

- (1) Sheng, M. and M.E. Greenberg (1990) *Neuron* 4(4): p. 477-85.
- (2) Kovacs, K.J. (1998) *Neurochem Int.* 33(4): p. 287-97.
- (3) Cullinan, W.E., et al. (1995) *Neuroscience* 64(2): p. 477-505.
- (4) Boissard, R., et al. (2002) *Eur J Neurosci.* 16(10): p. 1959-73.
- (5) Lee, H.S., et al. (2020) *J Sleep Res.* p. e12976.
- (6) Ledoux, L., et al. (1996) *Brain Res.* 735(1): p. 108-18.
- (7) Verret, L., et al. (2003) *BMC Neurosci.* 4(1): p. 19.
- (8) Sapin, E., et al. (2009) *PLoS ONE* 4(1): p. e4272.
- (9) Renouard, L., et al. (2015) *Science Advances* 1(3).
- (10) Maciel, R., et al. (2021) *Biochem Pharmacol.* 191: p. 114514.