

Neuroanatomie chimique révèle le phénotype de co-transmission GABA/Glutamate des neurones du noyau supramammilaire latéral projetant au gyrus denté

MONIQUE ESCLAPEZ

Institut de neurobiologie de la Méditerranée (Inmed), Inserm/amU UMR1249, Parc scientifique et technologique de Luminy, 163 av de Luminy 13273 Marseille France

Neuroanatomie chimique

La neuroanatomie chimique, ou anatomie neurochimique, est une branche des neurosciences qui vise à identifier et localiser les différents types neuronaux ou gliaux en fonction des substances chimiques exprimées (neurotransmetteurs, neuromodulateurs, enzymes, récepteurs, ARNm, etc.) permettant ainsi de cartographier les différentes voies neurochimiques au sein des structures anatomiques du système nerveux. Elle permet également d'étudier la régulation de l'expression de ces composés chimiques en lien avec l'activité neuronale en conditions physiologiques (par exemple, différents états de vigilance) ou pathologiques (épilepsies, Parkinson, Alzheimer, etc.), et de comprendre les bases chimiques des fonctions cérébrales (mémoire, motricité, etc.).

Dans cet article, nous décrivons les trois grandes familles d'approches méthodologiques principalement utilisées en anatomie neurochimique, suivies d'un exemple de leur application.

1. Immunohistochimie (IHC) / Immunohistofluorescence (IHF) (1)

C'est une technique qui permet d'identifier des protéines ou des peptides spécifiques sur des coupes de tissus. Elle repose sur la capacité d'un anticorps à se lier spécifiquement à son antigène dans les tissus biologiques. Elle consiste à révéler les déterminants antigéniques (protéines, peptides, acides aminés) présents au sein d'une structure tissulaire ou cellulaire, en appliquant des anticorps spécifiques sur les tissus. Les anticorps peuvent être polyclonaux (reconnaissent plusieurs sites antigéniques ou épitopes) ou

monoclonaux (spécifiques à un seul épitope). Le complexe anticorps-antigène peut être visualisé de différentes manières, soit par un marquage direct de l'anticorps primaire, soit par un marquage indirect au moyen d'un anticorps secondaire portant le marqueur. Ces méthodes de marquage indirect ont été développées pour augmenter la sensibilité de détection par amplification du marquage. Différents marqueurs permettent de visualiser l'antigène en microscopie optique,

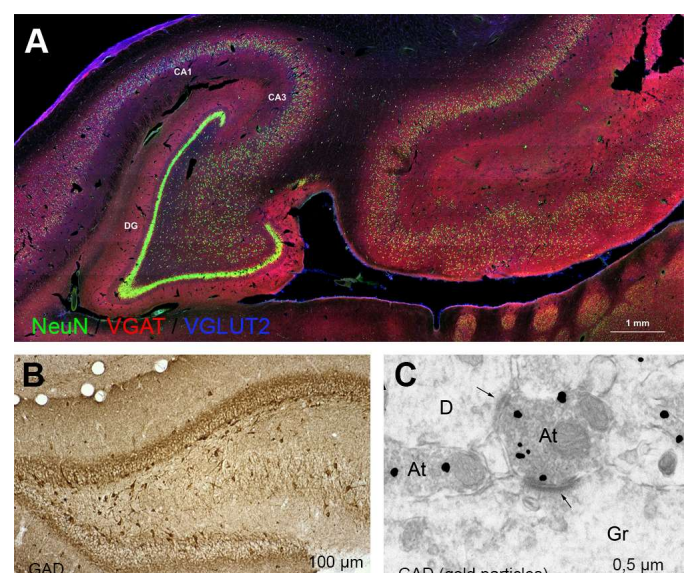


Figure 1 : (A) Marquage multiple en immunohistofluorescence sur coupe d'hippocampe humain. (B) Marquage immunohistochimique (DAB) sur coupe de gyrus denté (DG) de rat. (C) Marquage immunohistochimique (particules d'or colloïdal) pour détection en microscopie électronique.

At, terminaisons axonales ; CA1, CA3, corne d'Ammon, champs 1 et 2 ; GAD : Glutamate décarboxylase ; Gr, cellule Granulaire ; NeuN, antigène Neuronal nucleus ; VGAT transporteur vésiculaire du GABA ; VGLUT2 transporteur vésiculaire du glutamate de type2.

confocale ou électronique. Les marqueurs utilisés sont des fluorochromes (Figure 1A) ou des enzymes (comme la peroxydase) qui induisent une réaction chromogène en présence de leur substrat (formation d'un précipité brun en présence de diaminobenzidine (DAB) + H₂O₂ ; Figure 1B).

En microscopie électronique, des composés denses aux électrons, tels que des particules d'or colloïdal ou le chromogène brun induit par la peroxydase en présence de DAB, sont utilisés pour marquer les anticorps secondaires (Figure 1C).

2. Hybridation in situ (HIS) (2)

L'objectif de ces techniques est la détection d'une séquence spécifique d'acide nucléique dans des cellules, sur des coupes de tissus. L'hybridation in situ permet de visualiser les transcrits d'un gène, et donc de localiser le site potentiel de synthèse de la protéine ou du peptide codé. Elle permet d'identifier les neurones exprimant un

gène codant un neurotransmetteur, une enzyme de synthèse ou de dégradation, ou encore un récepteur.

L'HIS repose sur l'appariement spécifique (hybridation) d'une sonde nucléique (ADN simple brin, ARN ou oligonucléotide) avec une séquence cible, le plus souvent un ARNm. Marquée par un traceur radioactif (³⁵S) ou non radioactif (biotine, digoxigénine), la sonde permet de visualiser le complexe formé par autoradiographie (Figure 2A) ou immunohistochimie (Figure 2B).

La technologie *RNAscope* est une méthode récente et puissante d'HIS permettant la visualisation et la quantification précise de l'ARN cible dans n'importe quel tissu, avec une spécificité et une sensibilité, exceptionnelles. Elle repose sur un système de sondes dites « double Z », nécessitant l'hybridation tandem de deux sondes indépendantes sur l'ARN cible pour que l'amplification du signal se produise. Cette conception évite les faux positifs, car la probabilité que deux sondes se fixent côte à côte sur une séquence non spécifique est

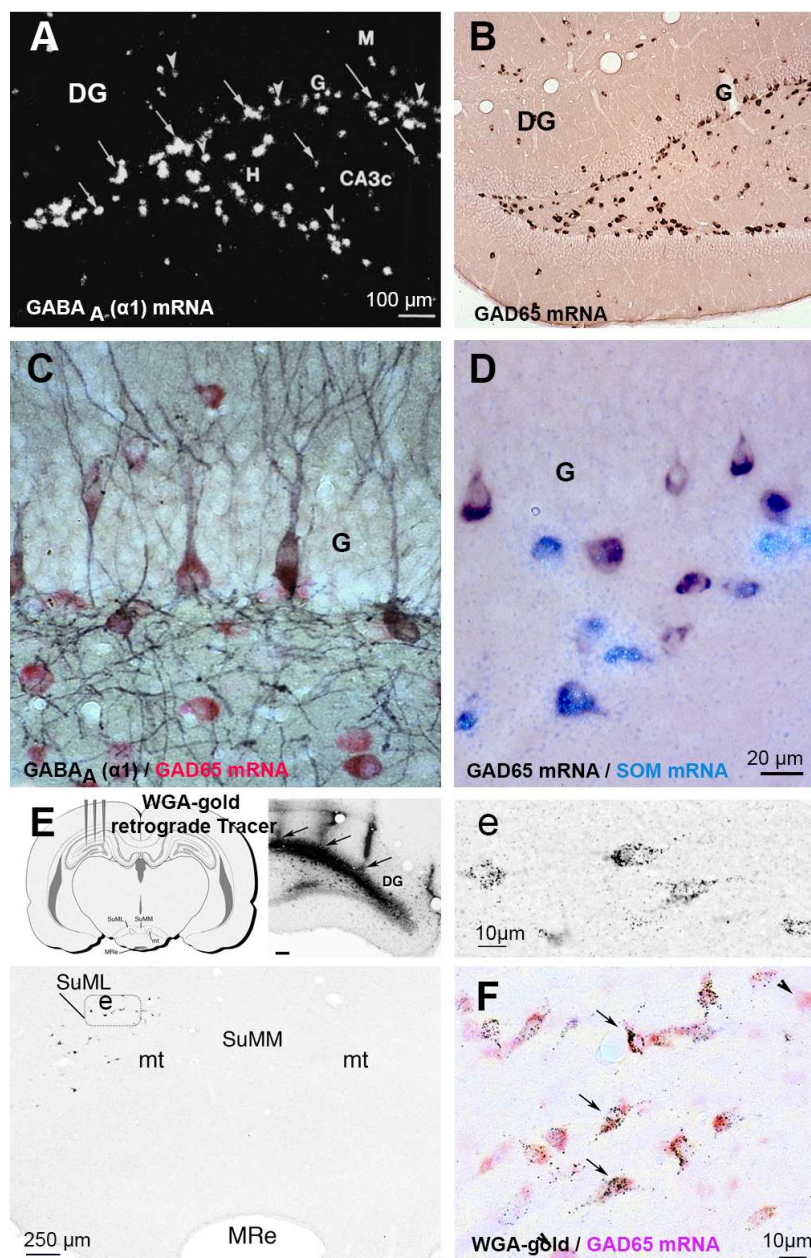


Figure 2 : (A-B) Hybridation in situ (HIS) avec détection en sondes ARN, (A) radioactive (³⁵S), (B) froide (digoxigénine) sur coupe DG de rat. (D) Double marquage associant sondes froide et radioactive. (C) Double marquage associant HIS avec détection en sonde froide et IHC. (E, e, F) Marquage rétrograde (WGA-gold) des neurones du SuML (F) associé au marquage en HIS pour détection de l'ARNm de la GAD.

CA3c, corne d'Ammon, champs 3, sous-région c ; DG, gyrus denté ; G, couche granulaire ; GAD65, glutamate décarboxylase 65 ; H, hile ; M, couche moléculaire ; mre, récessus mamillaire ; mt, tractus mamillothalamique ; SuML, noyau supramammillaire latéral ; SuMM, noyau supramammillaire médian ; SOM, somatostatine ; WGA, wheat germ agglutinine

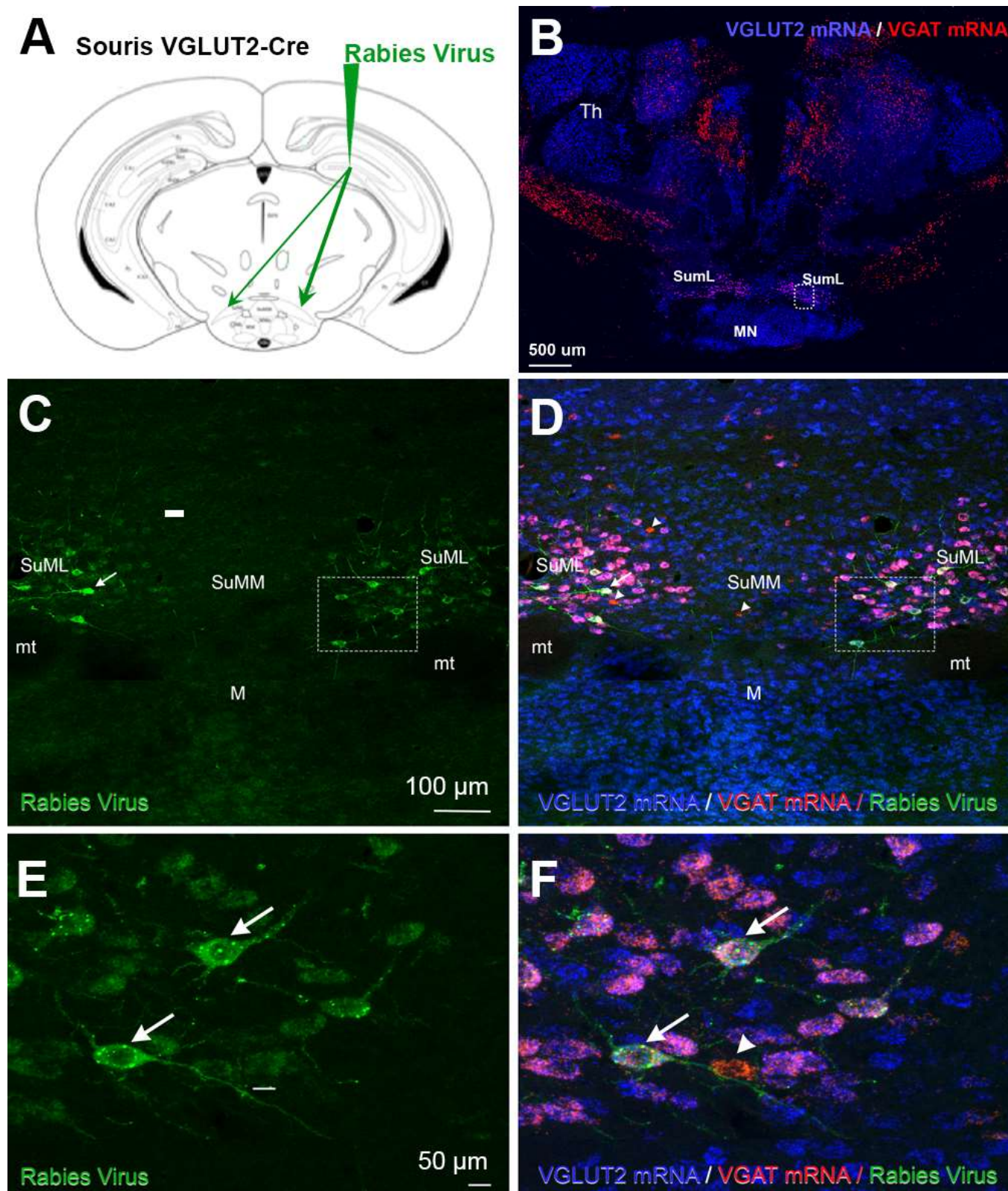


Figure 3 : (A, C, E) Marquage rétrograde des neurones du SuML réalisé avec le virus de la rage chez une souris transgénique VGLUT2-Cre. (B) Double marquage en HIS (technologie RNAScope) pour détection des ARNm de VGAT et VGLUT2. (D-F) Marquage multiple associant IHF pour détection du virus de la rage et HIS (RNAScope) pour détection des ARNm de VGAT et VGLUT2.

GAD : Glutamate décarboxylase ; M, noyau mamillaire médial ; MN, noyau mamillaire médial, partie médiane ; mt, tractus mamillothalamique ; SUML noyau supramamillaire latéral ; SuMM, noyau supramamillaire médian ; VGAT transporteur vésiculaire du GABA ; VGLUT2 transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 ; Th, thalamus.

très faible. Après fixation des sondes « double Z » sur l'ARN, une cascade d'hybridations permet d'amplifier le signal, la dernière étape d'hybridation utilisant des sondes couplées à un chromogène ou un fluorophore. Ce

processus permet de visualiser chaque molécule d'ARN sous forme de points distincts, visibles au microscope à fond clair, à fluorescence ou confocal, selon le type de marqueur utilisé. Cette technologie permet une

cartographie spatiale d'un ARN unique à l'échelle cellulaire et, surtout, la détection simultanée de plusieurs ARNm dans un même tissu grâce à des fluorochromes distincts (Figure 3B, D), les techniques précédentes d'HIS limitant la détection à deux ARNm (Figure 2D). Ces approches d'HIS peuvent être combinées aux techniques d'IHC et d'IHF pour révéler à la fois les ARNm et les protéines dans le même échantillon (Figure 2C). Enfin, ces approches peuvent être combinées aux techniques de connectivité structurale qui permettent de cartographier les circuits neuronaux, c'est-à-dire les connexions physiques entre les populations neuronales des différentes régions cérébrales (Figure 2E, F ; Figure 3D, F).

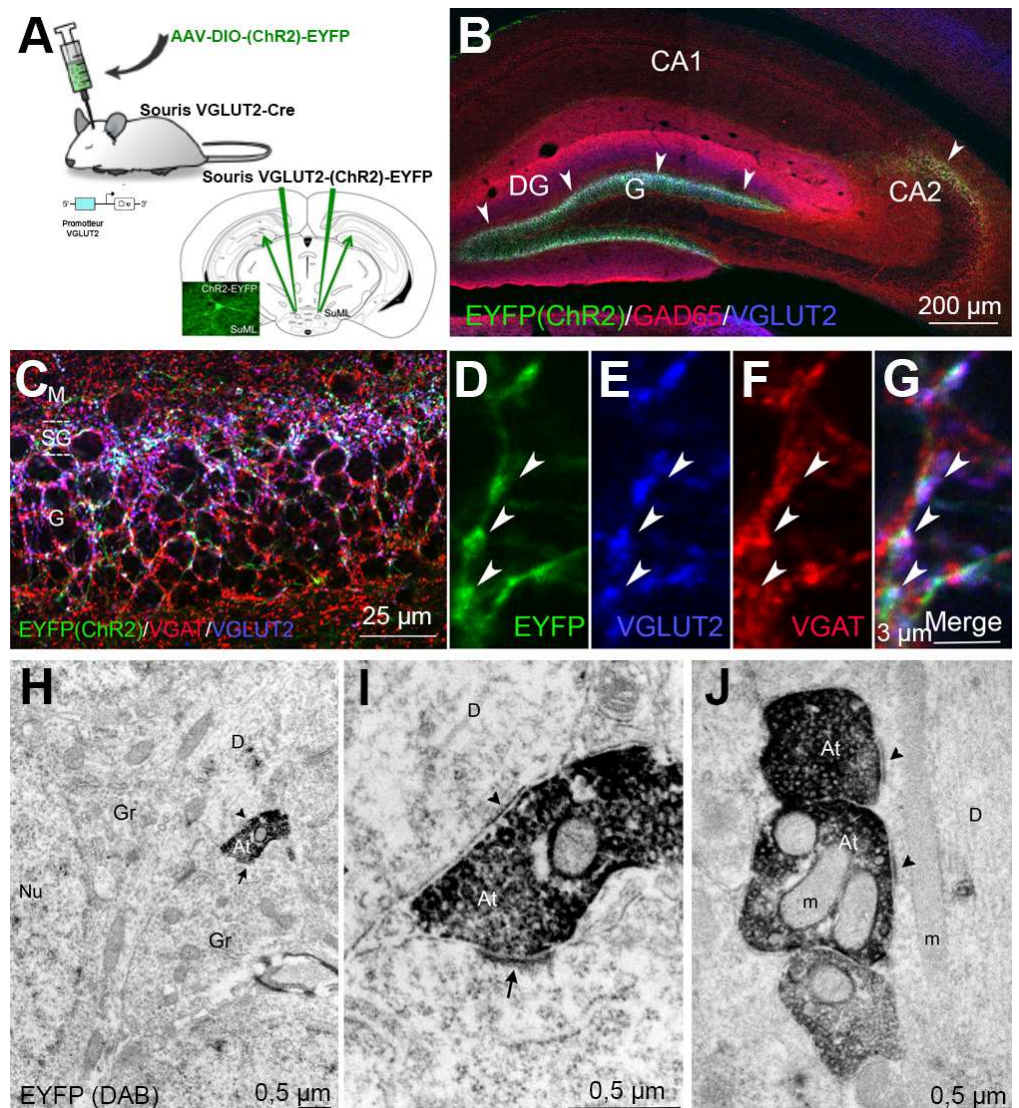
3. Les techniques de connectivité structurale

Plusieurs approches permettent aujourd'hui de cartographier ces circuits, allant des méthodes classiques aux outils moléculaires les plus modernes. Les premières techniques utilisaient des traceurs chimiques non viraux, capables de voyager le long des neurones. Injectés dans une région du cerveau, ils peuvent être transportés de façon rétrograde – des terminaisons vers les corps

cellulaires – pour identifier les régions qui envoient des connexions vers cette zone (Figure 2E), ou antérograde – du soma vers les terminaisons – pour visualiser les régions cibles d'une population neuronale. Ces méthodes offrent une vue d'ensemble des connexions, mais manquent de spécificité, car elles marquent tous les neurones de la zone injectée, sans distinction de type cellulaire. L'avènement de la biologie moléculaire et génétique a introduit l'usage de vecteurs viraux neurotropes et de souris transgéniques. Ces outils permettent de restreindre l'expression des traceurs viraux à un sous-groupe précis de neurones, offrant un niveau de sélectivité et de contrôle inégalé pour cartographier les circuits ([voir l'article de M. Barbier dans ce numéro](#)).

La combinaison de ces approches, permettant un ciblage cellulaire précis jusqu'au niveau synaptique, a profondément transformé les neurosciences en reliant structure et fonction. Elle a notamment révélé des circuits neuronaux uniques, capables de co-transmettre GABA (inhibiteur) et glutamate (excitateur) par une même terminaison axonale (comme décrit ci-dessous).

Figure 4 : (A-G) Marquage antérograde des terminaisons axonales des neurones du SuML innervant la couche supragranulaire (SG) du DG réalisé avec AAV-5 Cre-dépendant avec le gène codant pour la protéine fluorescente EYFP (vert) associé à un double marquage en IHC pour la détection de VGAT (rouge) et VGLUT2 (bleu). (H-J) Détection en microscopie électronique des terminaisons axonales en provenance du SuML formant des synapses symétriques (têtes de flèche) et asymétriques (Flèche) sur les cellules granulaires (Gr) du DG. At, terminaison axonale CA1, CA2, corne d'Ammon, champs 1 et 2 ; D, dendrite ; DG, gyrus denté ; G, couche granulaire ; GAD65, glutamate décarboxylase 65 ; Gr, cellule granulaire ; M, couche moléculaire ; m, mitochondrie ; Nu, noyau ; VGAT transporteur vésiculaire du GABA ; VGLUT2 transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 ;



Co-transmission GABA / Glutamate des neurones du noyau supramammillaire latéral (SuML) projetant sur le gyrus denté de l'hippocampe dorsal (dDG)

Le SuM est une région de l'hypothalamus postérieur située dorsalement aux corps mammillaires. Il comprend une population hétérogène de neurones qui projettent vers de nombreuses régions du système limbique, y compris la formation hippocampique (FH). Bien que l'implication de ce noyau dans la régulation du rythme thêta hippocampique et des fonctions cognitives associées, telles que l'éveil actif et le sommeil paradoxal, ait été rapportée, le substrat anatomo-fonctionnel soutenant cette régulation a longtemps été mal compris.

Chez les rongeurs, les afférences de la FH en provenance du SuM sont principalement issues de la partie latérale de ce noyau (SuML) et innervent le gyrus denté dorsal et latéral (dDG). Les neurones de la partie médiane du SuM (SuMM) projettent exclusivement sur le gyrus denté ventral (vDG) et la région CA2/CA3a.

Nos travaux réalisés chez le rat (3) comme chez la souris (4) montrent que si les neurones du SuMM innervant le vDG et CA2/CA3a sont glutamatergiques les neurones du SuML innervant la couche supragranulaire (SG) du dDG présentent eux un phénotype neurochimique original, exprimant simultanément les marqueurs de la transmission GABAergique (GAD65, VGAT) et de la transmission glutamatergique (VGLUT2). Les corps cellulaires de ces neurones identifiés par l'injection dans le dDG de traceurs rétrogrades classiques (WGA-Gold) chez le rat (Figure 2 E, F) ou du virus de la rage chez la souris transgénique VGLUT2-cre (Figure 3A, C, E) expriment les ARNm de l'enzyme de synthèse du GABA (GAD65) et du transporteur vésiculaire du GABA (VGAT) ainsi que l'ARNm du transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT2 (Figure 2F, Figure 3D, F). Leurs terminaisons axonales, localisées dans la couche SG du dDG révélées par l'injection de traceurs antérogrades classiques (la biotine-dextran amine, BDA) chez le rat ou du vecteur viral (AAV5-Cre dépendant exprimant la protéine fluorescente EYFP) chez la souris VGLUT2-Cre, contiennent à la fois les protéines GAD65 et VGAT, mais aussi le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT2 (Figure 4A-G).

Sur le plan ultrastructural, ces terminaisons axonales établissent à la fois des contacts synaptiques symétriques (Figure 4H-J, têtes de flèche ; synapses inhibitrices GABAergiques) et des contacts synaptiques asymétriques (Figure 4H, I, flèche ; synapses excitatrices

glutamatergiques) sur les cellules granulaires (GC). Ces synapses présentent sur le versant post-synaptique un marquage de récepteurs GABAA-1 et GluN1 respectivement (5). Ce phénotype suggère qu'une seule terminaison axonale est capable de co-transmettre le GABA et le glutamate et que cette co-transmission glutamatergique et GABAergique se produit à des sites de libération fonctionnellement distincts. Une propriété que nous avons démontrée sur le plan fonctionnel combinant stimulation optogénétique et enregistrements électrophysiologiques *in vitro* et *in vivo* (4). Cette co-transmission a été confirmée par plusieurs groupes, y compris une étude récente (5), qui montrent de plus que les transmissions synaptiques glutamatergiques et GABAergiques présentant des propriétés distinctes, conduisent ces synapses SuML-GC à se comporter comme un « filtre passe-bas ». À de faibles fréquences de décharge (5 Hz, dans la gamme thêta), ces afférences GABA/GLU issues du SuML agissent comme des signaux excitateurs, tandis qu'à des fréquences élevées, l'effet excitateur sur les cellules granulaires est éliminé par la libération de GABA.

Ce double phénotype et cette organisation synaptique originale font du SuML un acteur clé dans la régulation de l'excitabilité de l'hippocampe dorsal, permettant le filtrage des informations qui y parviennent aux fréquences thêta (5) participant à l'encodage de la mémoire contextuelle (6), à sa consolidation durant le sommeil paradoxal (4, 7), ainsi qu'aux mécanismes de navigation spatiale (8,9).

monique.esclapez@univ-amu.fr

Références

- (1) Esclapez M. (2001). In Hammond C. Cellular and Molecular Neurobiology – Ed Academic Press, London (Fourth edition)
- (2) Esclapez M. (2023). In Hammond C. Cellular and Molecular Neurophysiology – Ed Academic Press, London (Fifth edition)
- (3) Soussi R., et al. (2010). Eur J Neurosci 32, 771-785
- (4) Billwiller F, et al. (2020) Brain Struct Funct 225, 2643-2668
- (5) Hirai, H., et al. (2024) eLife, 13, 1-27
- (6) Chen S, et al. (2020) Nature 586, 270-274
- (7) Qin, H. et al. (2022) Neuron 110, 4000-4014
- (8) Li, Y.D. (2020) eLife 9, e53129
- (9) Farrell, J.S., et al. (2021) Science, 374, 1492-1496