

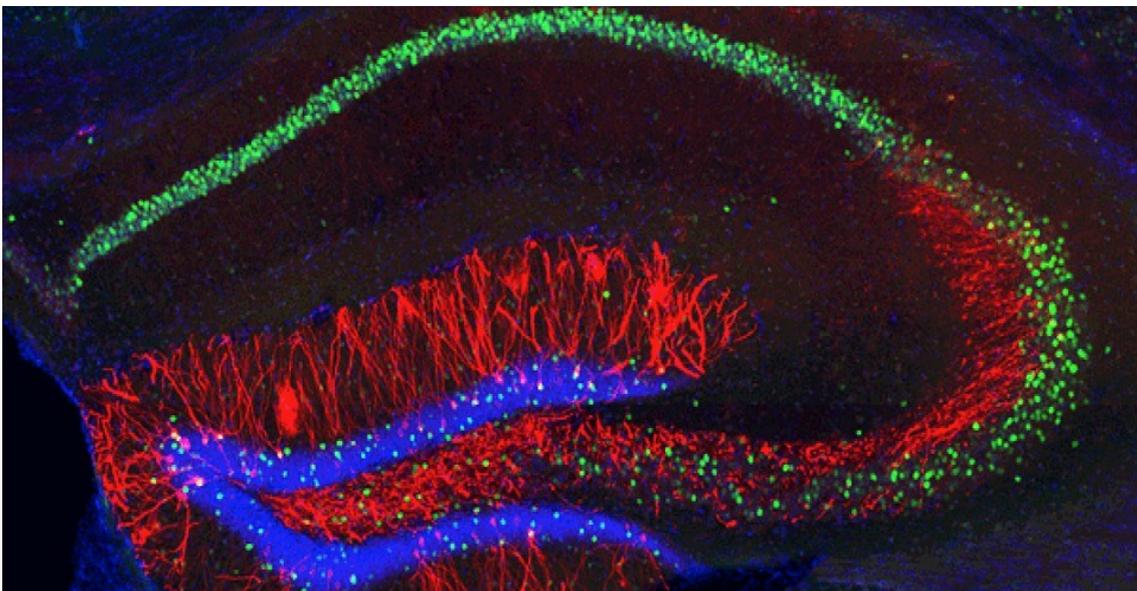
# Influence de la délétion du récepteur sérotoninergique 5-HT1a et du genre sur la fonction de l'hippocampe de la souris : expression du c-Fos comme marqueur de l'activité neuronale

Samuel Nyffeler

Responsable: Prof. Jean-Pierre Hornung (avec la supervision de Christine Fülling et Alexandre Pinault)

1

FACULTE DE MEDECINE ET BIOLOGIE  
Département des neurosciences fondamentales (DNF), Université de Lausanne  
Rue du Bugnon 9, 1005 Lausanne, Suisse



Mars 2016

## TABLE DES MATIERES :

Résumé	3
Introduction	4
– anatomie hippocampique	4
– système sérotoninergique et anxiété	6
– description des marqueurs PV, CB, c-Fos ainsi que GFPm	7
– influence du sexe et des gènes et but du projet	9
Méthode	10
– animaux	10
– tests comportementaux	10
– perfusion et fixation	11
– préparation des coupes de cerveaux	11
– immunocytochimie	11
– acquisition des données	11
– analyse des données	12
Résultats	14
– série 1 :	15
– 1ère analyse	15
– 2ème analyse	15
– 3ème analyse	15
– 4ème analyse	16
– 5ème analyse	16
– série 2 :	18
– 1ère analyse	18
– 2ème analyse	20
– 3ème analyse	20
– 4ème analyse	20
– 5ème analyse	20
Discussion	22
– partie 1	22
– partie 2a	23
– partie 2b	24
– partie 3a	25
– partie 3b	28
Conclusion	29
Bibliographie	30
Remerciements	32

**RESUME :**

Le rôle des récepteurs sérotoninergiques dans la physiopathologie de l'anxiété est de nos jours indiscutable. En effet, la délétion du gène du récepteur 5-HT1a durant la vie postnatale précoce a une influence sur la morphologie des neurones de l'hippocampe d'une part, et d'autre part induit chez les individus un comportement anxieux. Ces changements comportementaux sont corrélés à une activation augmentée des gènes immédiats précoces, tels que c-Fos. La question centrale de cette étude est dans quelle mesure le niveau d'activation de c-Fos est influencé par le genre et le génotype *wild-type* vs *knock-out* en condition de stress élevé ?

Le projet vise dans un premier temps à caractériser chez des souris *wild-type* (WT), la sous-population de neurones hippocampiques par l'utilisation de marqueurs immunocytochimiques connus de sous-populations d'interneurones et de neurones. En outre, étant donné qu'il y a une différence entre les sexes (effet plus important chez les mâles que chez les femelles) dans l'exubérance de l'arborisation dendritique des neurones CA1 hippocampiques, nous analyserons dans cette même série l'impact des récepteurs 5-HT1a sur l'expression de c-Fos à la fois chez des souris mâles et femelles. Dans un deuxième temps, ce projet profitera de la disponibilité de souris transgéniques exprimant la GFP dans un sous-ensemble de neurones de projection (principalement) dans le cerveau antérieur. Ce projet utilise deux souches de souris. La souche (GFPm) possède une expression normale du récepteur 5-HT1a, et une souris double transgéniques exprimant la GFP est dépourvue du récepteur 5-HT1a (souche 5-HT1a-KO/GFPm). L'activation des circuits de l'hippocampe est visualisée par la localisation immunocytochimique du gène précoce c-Fos dans une situation basale ou après un conditionnement stressant (test de nage forcée). La combinaison des marquages d'activité et de marquage des sous-populations neuronales permet de déterminer si une ou l'autre sous-population est plus impliquée dans la réponse au conditionnement par le test de nage forcée.

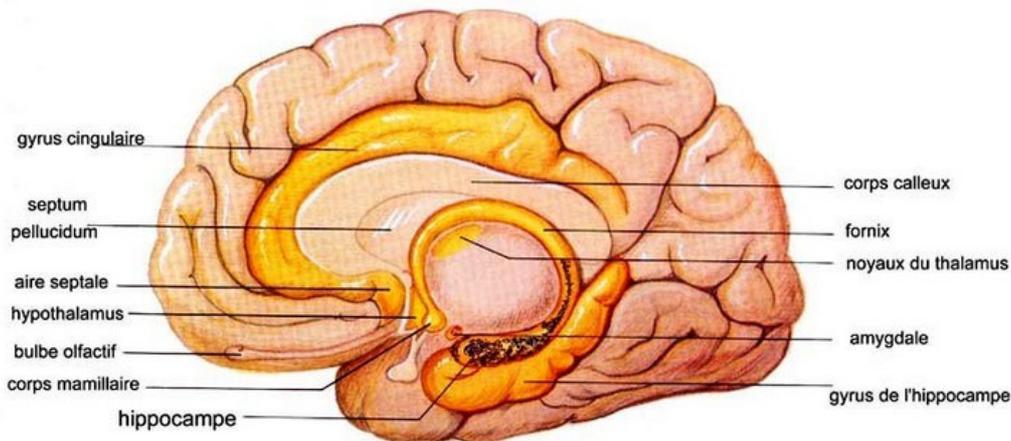
Nous tenterons, grâce aux diverses expérimentations réalisées au cours de cette étude, de mieux comprendre l'implication des récepteurs sérotoninergiques, ainsi que de corréliser nos résultats avec les connaissances actuelles en ce qui concerne les maladies liées à l'anxiété et ses influences sur la fonction et structure du système limbique.

Mots clés : sérotonine, récepteur 5-HT1a, anxiété, gène précoce c-Fos, genre, *knock-out* mouse

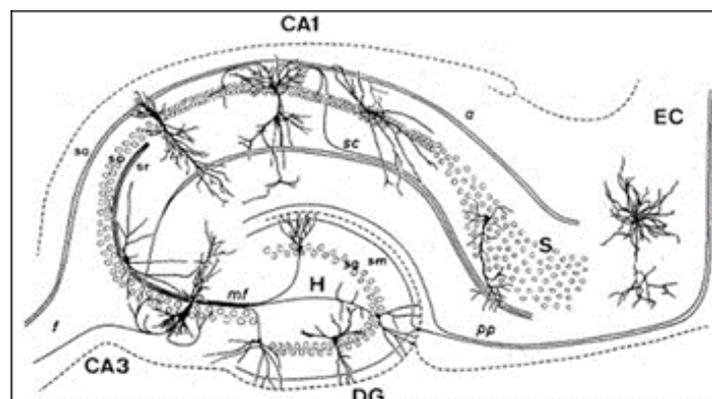
## INTRODUCTION

### ANATOMIE HIPPOCAMPIQUE :

L'homme ainsi que les mammifères supérieurs possèdent un système limbique constitué des différentes structures fortement connectées et qui incluent l'hippocampe. L'amygdale, le septum pellucidum, le thalamus, gyrus cingulaire, le cortex préfrontal et le cortex olfactif ainsi que l'hippocampe composent ce système complexe. L'hippocampe est une structure paire lamellaire enroulée sur lui-même, présente à la face médiale de chaque hémisphère et située sous la surface du cortex cérébral. Chez l'homme, il est positionné dans le lobe temporal médian et est recouvert non totalement par la circonvolution parahippocampale. Notons que l'hippocampe ainsi que la circonvolution parahippocampale sont en communication via le subiculum et le cortex entorhinal. Ces deux structures parahippocampales ainsi que l'hippocampe forment ce que nous appelons communément la formation hippocampique. Finalement, les afférences et efférences de l'hippocampe passent par la matière blanche sous-jacente, la fimbria, qui se prolonge par un tractus, le fornix, qui relie l'hippocampe à la région septale et au corps mamillaire de l'hypothalamus, ainsi qu'à l'hippocampe de l'hémisphère opposé par une commissure [16, 18, 19]. (voir **figure 1**).



**Figure 1 : coupe sagittale médiane du cerveau avec mise en évidence des structures du système limbique<sup>1</sup>**



**Figure 2 : Schéma laminaire hippocampique**

<sup>1</sup> . Source : <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/biologie-marcher-plus-apprendre-plus-31170/>

En coupe transversale, il est possible de distinguer 3 parties dans la formation hippocampique : la Corne d'Ammon (CA) et le Gyrus Dentatus (GD) et le subiculum ; les 2 premières structures constituant à proprement parler l'hippocampe sont en forme de « U » tandis que la 3ème constitue une voie d'entrée à l'hippocampe depuis le cortex entorhinal. D'un point de vue neuromorphologique, la CA est divisible en 4 aires ; la CA1, 2, 3 et 4. Dans ce travail de recherche, nous ne prendrons en compte que les parties 1 et 3, les aires 2 et 4 étant structurellement difficiles à définir. La CA compte au total 3 couches cellulaires fondamentales contrairement au cortex, qui lui en compte 6. L'*alveus*, la couche la plus profonde qui contient les axones des projections afférentes et des efférences issues des corps cellulaires des neurones pyramidaux et les axones du GD. Le *stratum oriens*, la couche située entre l'alveus et la couche pyramidale, contient les corps cellulaires des cellules en corbeille, les cellules trilaminaires horizontales ainsi que les dendrites basales des neurones pyramidaux. Le *stratum pyramidalis*, contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux et également ceux de quelques interneurons, incluant les cellules axo-axoniques, bistratifiées et trilaminaires radiales. A noter que dans les neurones pyramidaux du CA3, reçoivent les synapses provenant des fibres moussues du GD. Le *stratum lucidum* est décrit comme étant la plus fine des couches de l'hippocampe. Retrouvé uniquement dans le CA3, il est traversé sur sa longueur par les fibres moussues, qui naissent des neurones granulaires du GD. Le *stratum radiatum*, contient les segments proximaux de l'arbre dendritique de la dendrite apicale des cellules pyramidales et les fibres collatérales de Schaffer (les unes faisant synapse avec les autres), se projetant du CA3 au CA1; quelques interneurons (cellules en corbeille, bistratifiées et trilaminaires radiales) peuvent également être distinguées dans la couche la plus superficielle du stratum radiatum.. Le *stratum lacunosum et moleculare*, couche la plus superficielle, contient les voies (fibres) perforantes ainsi que les segments distaux dendritiques des cellules pyramidales (les segments faisant synapses avec les voies perforantes). **Voir figures 2 et 3.**

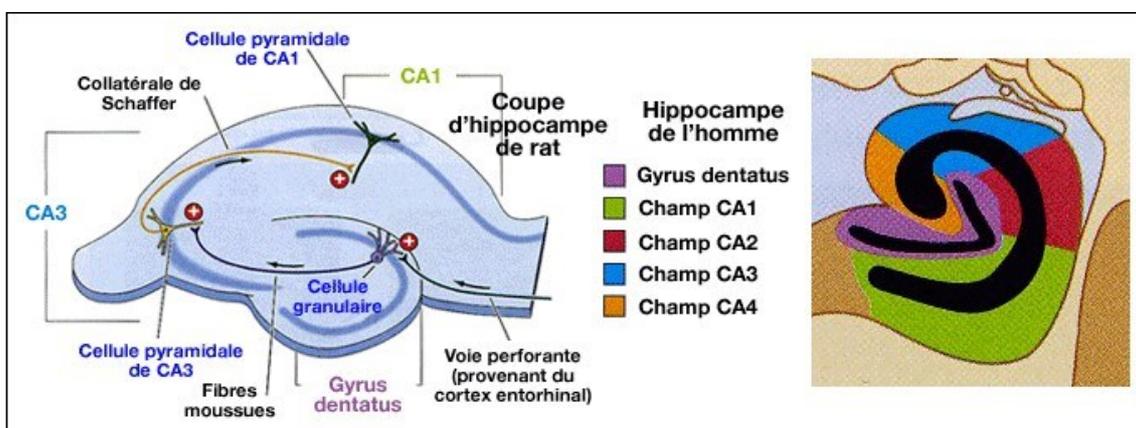


Figure 3, lobe temporal interne<sup>2</sup>

Le GD est une région laminaire composée quant à lui de 3 couches principales (polymorphique, granulaire et moléculaire), ressemblant à l'organisation de la CA. Le *stratum polymorphique* est la couche la plus interne du GD et contient principalement les segments initiaux des axones des cellules granulaires. Ces derniers se rassemblent et forment ainsi les fibres moussues, traversant en aval le *stratum lucidum* du CA3. A noter que cette région, également nommée hile, est considérée par certains auteurs comme la région du CA4. Le *stratum granulosum*, situé entre le stratum moléculaire et la couche polymorphique, contient les corps cellulaires des cellules granulaires. Le *stratum moleculare*, est divisé en deux parties, une partie inférieure qui représente le 1/3 de l'épaisseur et une

<sup>2</sup> . M. F. Bear, B. W. Connors, M. Paradiso, Neurosciences à la découverte du cerveau, Traduction et adaptation française André Nieoullon, Editions Pradel, 1997

extérieure qui représente les 2/3. Ces deux régions contiennent les dendrites apicales proximales et distales respectivement des cellules granulaires ainsi que leurs afférences [19, 20, 21,22, 23]. **Voir figure 3.**

Plusieurs types cellulaires composent le système nerveux central, et de ce fait l'hippocampe. Les neurones principaux sont les cellules pyramidales, qui comme leur nom l'indique, sont en forme de pyramide. La majeure partie de ces cellules sont concentrées dans les couches pyramidales de la CA, et dans le CA1 spécifiquement. A noter qu'elles varient en taille et en nombre selon leur localisation, CA1, 2 ou 3. Ces neurones émettent des signaux excitateurs type glutamatergiques et communiquent avec diverses autres cellules hippocampiques et corticales. Dans le GD, les cellules principales sont appelées granulaires et leur morphologie est distincte de celles constituant la CA; elles ne possèdent en effet pas de dendrites basales. Les interneurons sont le deuxième type de cellules composant le SNC, elles sont dites cellules non-pyramidales ou bipolaires, horizontales, étoilées, en fonction de la morphologie de leur arbre dendritique. Ces cellules sont morphologiquement différentes des cellules granulaires et pyramidales. Elles sont classées selon leurs caractéristiques morphologiques et leur localisation dans l'hippocampe. Pouvant être retrouvées dans chacune des régions hippocampiques, leur densité est moindre dans les couches pyramidales et granulaires. Il existe de nombreux types d'interneurones: parmi les principales, les cellules en corbeille situées dans le *stratum oriens* et négligemment dans le *stratum radiatum*, les neurones fusiformes, dans la région du hile, les cellules en corbeille de type pyramidal dans le *stratum granulosum* du GD et les cellules bipolaires/multipolaires, principalement situées dans le *stratum pyramidalis*. Le neurotransmetteur utilisé par ces cellules est le GABA, qui agit comme substance inhibitrice sur les cellules nerveuses interconnectées [16].

#### ANXIÉTÉ, LE SYSTÈME SÉROTONINERGIQUE ET LE RÉCEPTEUR 5-HT<sub>1A</sub> :

L'anxiété est un état émotionnel considéré comme une réponse physiologique et comportementale à une menace potentielle. Un comportement adaptatif à la vigilance et une réaction appropriée à la fuite permettent à l'individu de se protéger d'un quelconque danger. Cet état de préparation cognitive et comportemental semble être un mécanisme adaptatif propre aux mammifères supérieurs, l'homme en faisant partie intégrante. De nos jours, il est possible de déterminer très tôt dans la vie d'un individu s'il a une susceptibilité élevée ou non à un troubles de l'humeur. Certains mécanismes développementaux sont des indices quant au degré de sensibilité réactionnelle d'un individu à un autre face à un stimulus menaçant. Une réactivité excessive et prolongée conduit à un comportement pathologique. Des études actuelles sur les rongeurs prouvent que ces mécanismes sont déterminés d'une part par l'environnement et d'autre part par la génétique et que ces derniers interagissent entre eux durant la vie humaine. La littérature distingue deux formes d'anxiété : l'état et le trait anxieux. La première, constituant physiologique de l'expérience humaine, est caractérisée par une réponse aiguë et passagère tandis que la deuxième, est une tendance à développer à long terme une réponse anxieuse anormalement augmentée. La forme pathologique ne permet pas à l'individu de générer une réponse appropriée à l'environnement stressant [1, 2].

Des expériences précédentes ont démontré que la sérotonine et son récepteur 5-HT<sub>1a</sub> sont impliqués dans la régulation des troubles de l'humeur, incluant entre autres l'anxiété et la dépression [3, 4, 5, 6] . En outre, il existe une évidence de la contribution de récepteurs 5HT<sub>1a</sub> présynaptiques au niveau des neurones sérotoninergiques du raphé, qui régulent l'activité neuronale et par conséquent la quantité de sérotonine relâchée dans la zone cible [7, 8, 9, 10]. Ainsi, la régulation de la sérotonine au niveau des neurones sérotoninergiques du raphé et au niveau des neurones postsynaptiques des structures limbiques contribuent à la physiopathologie des troubles de l'humeur. Le projet-ci se focalise sur les composantes postsynaptiques.

La délétion du gène du récepteur 5-HT<sub>1a</sub> provoque chez la souris un comportement de type anxieux [10]. Les récepteurs à la sérotonine 5-HT<sub>1a</sub> commencent à être exprimés pendant la dernière semaine du développement embryonnaire et leur nombre augmente continuellement jusqu'à l'âge adulte. Les dendrites ainsi que les connexions synaptiques des neurones pyramidaux CA1 se forment pendant les premières semaines de vie postnatale [11, 12,13]. La période postnatale est une période critique dans la modulation du comportement et de la morphologie cérébrale de l'adulte. C'est en effet à ce stade du développement que la génétique ainsi que divers facteurs environnementaux ont le plus d'influence sur le système limbique, et plus précisément sur l'expression de ses récepteurs sérotoninergiques [14, 15]. Il est intéressant de constater que le sauvetage de l'expression du récepteur 5-HT<sub>1a</sub> dans le cerveau antérieur des souris à l'âge adulte ne restore pas un comportement normal, tandis que la restauration de l'expression et ce uniquement pendant le développement périnatal abolit le comportement de type anxieux, combien même le récepteur n'est plus présent dans le cerveau de la souris au moment de tester le comportement à l'âge adulte [16].

Ce récepteur est fortement exprimé dans l'hippocampe, et en particulier dans les neurones pyramidaux du secteur CA1. L'arborisation dendritiques de ces cellules montre une exubérance significative des branches des dendrites proximo-apicale, qui sont la cible d'une voie intra-hippocampique via les collatérales de Schaffer. La stimulation de cette voie montre une hyperexcitabilité sélective des neurones pyramidaux CA1 [17]. Le laboratoire a démontré récemment que les récepteurs glutamatergiques NMDA, et en particulier sa sous-unité NR2B, régulent de façon développementale la croissance dendritique de ces neurones [18, 19, 20].

En plus de l'hippocampe, l'humeur est étroitement régulée par l'amygdale. Ce noyau contribue aux composantes émotionnelles du comportement. Parmi les autres subdivisions de ce noyau, le noyau baso-latéral de l'amygdale (BLA) est un relais important entre les entrées corticales des différentes modalités sensorielles et le contrôle des fonctions viscérales du tronc cérébral et de la moelle épinière par le système nerveux autonome. Une étude préliminaire dans le laboratoire caractérise les changements structurels et fonctionnels qui pourraient survenir dans le BLA de l'animal, dépourvus du récepteur 5-HT<sub>1a</sub> [18].

**MARQUEURS INTERNEURONAUX:** la calbindine (CB), la parvalbumine (PV)

La calbindine D-28 ainsi que la parvalbumine appartiennent à une famille de protéines nommées « protéines à motif EF » impliquées dans la régulation du calcium, via ses propriétés de tampon et senseur au calcium. Cette large famille, comme son nom l'indique possède toutes des caractéristiques structurelles communes. Elles peuvent être subdivisées en trois domaines, contenant chacun un même motif « helix-loops-helix » liant un ion calcium. La concentration en calcium dans l'espace extracellulaire permet ainsi grâce à la liaison protéine-Ca<sup>2+</sup> la transduction en cascade d'un message intracellulaire. Le rôle de cette famille ne se limite pas à celui de messenger secondaire, elle joue également un rôle dans de nombreux autres processus physiologiques ; citons parmi eux la régulation du cycle cellulaire et contraction musculaire [24, 25].

Dans l'hippocampe, la parvalbumine et la calbindine, toutes deux exprimées par des interneurons GABAergiques, ont une distribution cellulaire spécifique suggérant une évolution fonctionnellement distincte. Il est possible de classer ces deux types de protéines en deux catégories définies par des critères biophysiques binaires, selon si leurs décharges sont rapides ou lentes, définissant une potentialisation à court ou à long terme, respectivement. Dans les couches hippocampiques, les interneurons à la PV, présents dans les couches pyramidales et dans les couches occupées par les cellules non-pyramidales, sont subdivisés en cellules à panier (basket cell), neurones axo-axoniques, intercouches, cellules O-LM, innervant des domaines différents des cellules pyramidales, tandis que les interneurons à la CB, sont majoritairement présents dans les couches non-pyramidales de la corne d'Ammon. Nous retrouvons également l'expression de la calbindine dans toutes les cellules

principales du GD, dites granulaires, contrairement à la parvalbumine, qui quant à elle, est très faiblement exprimée par les cellules principales, que ce soit dans le GD ou dans la CA. C'est grâce à l'utilisation de l'immunocytochimie via des anticorps liant spécifiquement ces protéines (calbindine, parvalbumine et calrétinine), exprimées au sein de types cellulaires différents, que nous avons pu définir l'architecture laminaire de l'hippocampe [25, 27, 28, 29].

#### MARQUEUR NEURONAUX : le c-Fos et la GFP.

La protéine c-Fos est définie comme un facteur de transcription nucléaire de cellules eucaryotes. Découvert à l'origine grâce à l'oncogène rétroviral du virus murin sarcomateux retrouvé dans des fibroblastes de rongeur, il forme avec FosB, Fra-1 et Fra-2 une grande famille de facteurs transcriptionnels appelée fos. Le gène qui détermine cette protéine appartient aux gènes de réponse précoce. Cela signifie que lors de la division cellulaire (ou autre stimulation de l'activité cellulaire), ce gène se manifeste comme l'un des premiers facteurs de transcription. Ce gène est fort peu sollicité lors d'états excitateurs basaux. Alors qu'en présence de stimuli avec un fort impact, tels le stress, promoteur tumoral, facteur de croissance, sérum, cytokine par exemple, l'activité du gène et donc de la protéine c-Fos augmente fortement son expression avec un pic à 2 ou 3 heures après le début de la stimulation. Le mécanisme de la protéine est basé sur la phosphorylation de plusieurs kinases, permettant la transduction d'un message en aval de la protéine. Son activité est de plus associée à de nombreux tissus et cellules humaines, les neurones en sont des exemples. En effet, lorsque des potentiels d'actions sont déclenchés par cette population de cellules nerveuses, ces dernières expriment la protéine c-Fos, faisant d'elle, un marqueur indirect de l'activité neuronale. Dans l'hippocampe des rongeurs, les neurones qui expriment le c-Fos sont principalement les cellules principales, c'est-à-dire les cellules granulaires pour la région du GD et les cellules pyramidales pour la CA [30, 31, 32, 33, 34].

La GFP est une protéine intrinsèquement fluorescente, de couleur verte, découverte originellement dans un organisme marin, la méduse, *Aequorea victoria*. A partir de cette espèce, une protéine GFP mutante a été créée et améliorée grâce à une modification de sa stabilité conformationnelle, de ses caractéristiques photochimiques et spectroscopiques, rendant ainsi son utilisation plus aisée en biologie moléculaire. Cette protéine est structurellement composée de 238 acides aminés, rendu fluorescents sous condition d'être exposés à une longueur d'onde déterminée. En effet, par l'exposition de la GFP sauvage à son pic d'excitation maximale correspondant à une longueur d'onde d'environ 395 nm et une longueur d'émission de 509 nm qui peut être perçue à l'aide d'un microscope à fluorescence standard ou confocal. La GFP fait appartient à une large famille de protéines fluorescentes, ayant toutes des caractéristiques qui leur sont propres (structure et mécanisme de formation du chromophore, couleur de la fluorescence, sensibilité de longueur d'onde, etc.). En génétique, elle joue un rôle crucial de biomarqueur, permettant de mettre en évidence dans un environnement naturel l'activité d'un ou de plusieurs gène et de leurs protéines associées. Ceci est rendu possible grâce à la fusion du gène à l'origine du chromophore à un gène ou promoteur d'intérêt. Le gène GFP est lié au promoteur Thy1.1 et inséré dans le génome d'une cellule ES. Ces cellules sont placées dans des blastocystes et la descendance est sélectionnée pour les animaux exprimant le transgène dans les cellules germinales. Parmi ces souris, une est à l'origine de la lignée GFPm avec l'expression de la GFP dans 1-2% des cellules principales du télencéphale et en particulier des cellules pyramidales du CA1 de l'hippocampe [38]. A titre d'exemple, les neurones hippocampiques des lignées de souris transgéniques, qu'ils soient de type pyramidale ou granulaire, incluant leurs dendrites et axones ont été marqués à la protéine fluorescente GFP dans le but de mieux définir l'architecture cellulaire et laminaire de l'hippocampe [37]. De plus, son activité fluorescente n'interfère pas avec les différentes réactions métaboliques cellulaires et permet une détection directe sans l'aide d'anticorps secondaires, au contraire de la PV et la CB qui sont des protéines intrinsèques, non fluorescentes détectées par immunofluorescence [33, 34, 35, 37].

Cette étude, qui est une étape critique dans l'identification d'une population de neurones dans l'hippocampe, contribue, en association avec l'amygdale, tous deux affectés par l'absence de récepteur 5-HT1a au cours du développement, au phénotype comportemental complexe de cette souche de souris avec un phénotype de type anxieux. Ces données pourraient également contribuer à la compréhension du processus de développement des troubles de l'humeur survenant de manière similaire chez les humains. Comme les études précédentes dans le laboratoire démontrent que les oestrogènes exprimés pendant le cycle ovarien rétablit dans la période de la puberté le développement normal des dendrites et les propriétés électrophysiologies des neurones hippocampiques de la région CA1, cette étude compare les réponses au stress des souris mâles et femelles pour vérifier si il y a une différence en fonction du genre.

## MATERIEL ET METHODES

**Animaux** : Les souris du laboratoire du Département des Neurosciences Fondamentales utilisées dans cette étude constituent deux séries expérimentales, chacune correspondant à une population de rongeurs. La première comprend des souris sauvages avec un fond génétique mélangé C57 BL6. La seconde est une souris mâle C57 BL6 (souche GFPm), souris noires transgéniques exprimant la GFP dans un sous-ensemble de neurones du cerveau antérieur et plus spécifiquement de l'hippocampe, sous le promoteur Thy1.1. La seconde population est divisée en deux sous-groupes, l'une avec l'expression du récepteur 5-HT1a, l'autre sans le récepteur. Les croisements entre les souris GFPm et les souris 5-HT1a *knock-out* (de fond génétique mixte 129SV/C57 BL6) se sont répétés sur plusieurs générations avec des souris C57 BL6. Plus il y a de croisements et donc de générations, plus les souches de souris tendent à devenir homogènes, c'est-à-dire qu'elles acquièrent un patrimoine non codant, homologue à celui de la C57 BL6, tout en conservant le gène recombinant d'intérêt. Il y a eu un total de 6-7 générations de redérivation (après 10 générations, la souche redérivée est dite «pure»). Pour la 1ère population de souris, nous avons utilisés 29 animaux, caractérisés par une différenciation en genre, masculin (15) et féminin (14), possédant chacun d'eux une expression normale du récepteur 5-HT1a (wild type). Concernant la 2ème population de souris mâles, deux souches de souris GFPm ont été utilisées, une 1ère ayant également une expression normale du récepteur 5-HT1a et une seconde exprimant d'une part ledit gène GFPm et dépourvu de l'expression du récepteur 5-HT1a. Cette 2ème population comprend 12 individus, de génotype 5HT1a wild type et 12 de génotype knockout. Il est également important de noter que, chacune des souris, mentionnées ci-dessus, ont été élevés dans les mêmes conditions, bien qu'à des intervalles de temps différents, au laboratoire du DNF. En outre, les expériences qui en découlent sont toutes en accord avec la société suisse de protection des animaux et conformément avec la réglementation institutionnelle et les directives en ce qui concernent l'expérimentation animale.

**Tests comportementaux** : Plusieurs modèles animaux basés sur la reproduction artificielle d'environnements anxio-gènes ont été décrits dans la littérature. Ces modèles, impliquant préférentiellement les rongeurs tels que la souris ou le rat, sont considérés comme des outils de dépistage de comportements anxieux ou dépressifs. L'« *elevated plus maze* », l'*open field* ainsi que le « *forced swim test* » en sont des exemples ; la première expérience, se basant sur le postulat que les espaces ouverts déclenchent chez l'animal de l'anxiété et que ces derniers ont tendance à être thigmotaxiques, permettent d'apprécier et de comparer, au sein de population de phénotypes sexuels différents ainsi que de génotypes wild type et knockout les réactions comportementales anxieuses. Il a en effet été démontré que le rongeur présentait des comportements anxieux divergents selon son phénotype sexuel et son génotype, face à une menace de stress. La deuxième expérience, permet quant à elle, d'apprécier d'une part les déplacements physiques du rongeur en termes de localisation centrale (zone ouverte) ou périphérique (zone protégée) du champ, d'autre part les niveaux d'anxiété de ce dernier en lien avec son activité physique et sa position. Le troisième test susmentionné, le « forced swim test » (FST), réalisée pour cette étude, nous indique comment le rongeur réagit face à une menace de noyade. Ce comportement traduit le niveau d'état dépressif par une immobilité face à la menace de mort. Pour ce faire, deux groupes de souris mâles et femelles sont tour à tour placés dans un cylindre de verre contenant de l'eau à une température de 25°degré Celsius. Pour chaque phénotype, un groupe « contrôle » est formé, subissant le même protocole que le groupe « FST ». Ces dernières sont ensuite déposées dans le cylindre pendant 6 minutes. Il est important de noter que l'animal se trouve dans l'impossibilité de toucher le sol ou de se sauver du cylindre. Après le test, les animaux sont conservés dans leur cage pendant 2 heures avant d'être sacrifiés (pic d'expression de c-Fos qui suit l'épisode de nage forcée).

**Perfusion et fixation :** Après que les deux groupes de souris (contrôle (Ctrl) et FST) aient été gardées pendant 2 heures après le test, ces dernières sont ensuite sacrifiées grâce à une injection anesthésiante de pentobarbital (150 mg/kg, i.p.). L'animal est ensuite fixé sur une plaque et la peau du thorax ainsi que la partie supérieure de l'abdomen y sont incisées, comprenant également les différentes enveloppes organiques, péritoine, plèvre, diaphragme et péricarde. Dans un deuxième temps, nous incisons l'oreillette droite, insérons une canule dans le ventricule gauche et injectons 50-70 ml de paraformaldéhyde à 4%. La perfusion de l'animal dure entre 10 et 15 min. Ensuite, nous incisons le crâne et retirons délicatement le cerveau de la souris qui est plongé dans la paraformaldéhyde à 4% pendant 2 heures. Le tout est rincé 3 fois dans un tampon de phosphate 0.1 M à un pH de 7,4, puis conservé au minimum durant 24 heures dans le même tampon. L'étape finale consiste en une cryoprotection à l'aide de sucrose à 30%, ajouté au tampon phosphate durant 12-24 heures.

**Préparation des coupes de cerveau :** Après cryoprotection, les cerveaux de souris sont découpés coronalement à la hauteur de l'hippocampe en vue de former de fines tranches, observables au microscope. A noter que chacune des coupes mesurent 50 microns d'épaisseur et l'appareillage est un cryotome, Microm HM440E. Les tranches sont ensuite conservées dans de l'éthylène glycol à -20°degré Celsius. Cette étape s'inscrit dans la réalisation de l'immunocytochimie.

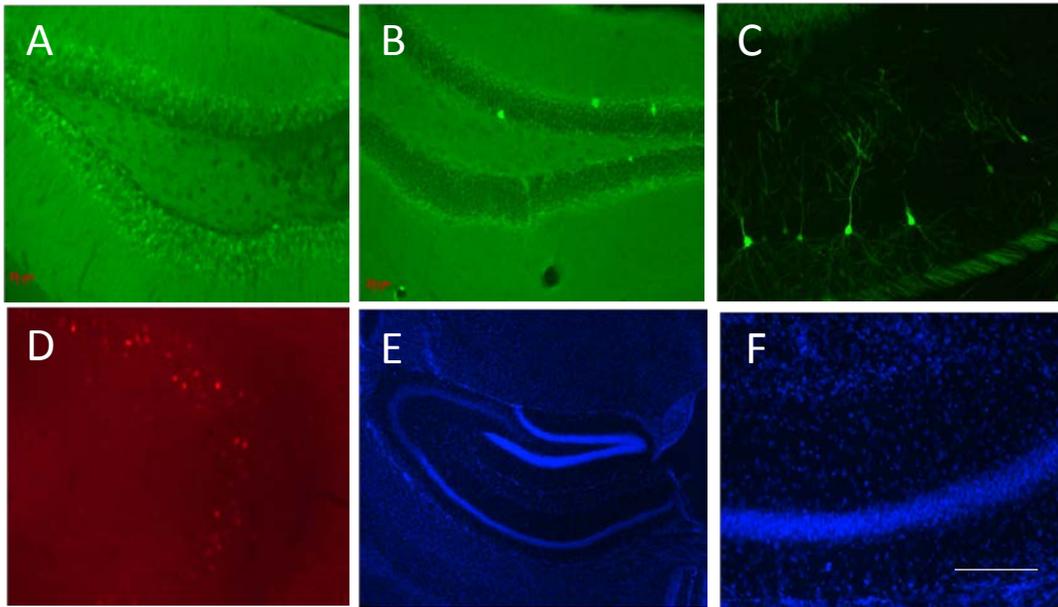
**Immunocytochimie :** Le descriptif du protocole de laboratoire se décompose comme suit : les coupes coronales à hauteur de l'hippocampe sont tout d'abord rincées avec la solution tampon de phosphate (PBS), puis incubé avec ce dernier et du triton à 0.3%. Vient s'ajouter le serum normal de cheval pour bloquer les liaisons non-spécifiques (2%, NHS). Dans un deuxième temps, nous y associons les anticorps primaires, AC polyclonaux anti-CB (Swant), AC polyclonaux anti-PV (Swant) tout deux dilués à 1:5000 et AC polyclonaux anti-c-Fos (Chemicon) dilués à 1:1000 dans le PBS, le triton à 0.3%, le NHS à 2%, et azide 1g/L. Nous laissons incuber la préparation à 4°degré au minimum 1 nuit. Après rinçage avec du PBS et du triton à 0.3%, nous y associons cette fois-ci des anticorps secondaires, AC Alexa 488 anti-rabbit révélant l'anticorps PV et CB et AC Alexa 594 anti-rabbit révélant l'anticorps c-Fos, anticorps développés chez la chèvre, (Molecular Probes), dilués à 1:300 pour chacun d'eux. Après 1 heure laissé à température ambiante, la coupe est rincée avec un tampon phosphate 0.1 M à un pH de 7.4, contrastée avec du Hoeschst 0,1% durant 10 minutes dans une solution tampon de phosphate 0.1 M, pour y être à nouveau rincée par un tampon phosphate 0.1 M à un même pH. Les coupes sont par la suite déposées sur des lames gélatinée 4% dans du tampon phosphate 0.1 à pH 7.4. Le tout est recouvert d'un milieu de montage (Mowiol) et d'une lamelle pour l'observation au microscope à fluorescence. Le produit final correspond à un lame coronale, révélant soit l'activité de la protéine PV ou CB (marquage vert), et le c-Fos (marquage rouge), contrasté avec du colorant Hoechst (marquage bleu). Concernant les souris GFPm, nous avons suivi le même protocole, sauf l'utilisation des anticorps pour révéler le contour des neurones d'intérêt (cellules principales), ces dernières étant révélées par leur expression de la protéine verte fluorescente (GFP).

**Acquisition d'images :** afin d'acquérir une multitude d'images, représentant l'activité neuronale de l'hippocampe, nous nous sommes servi d'un microscope Zeiss Imager Z1. L'observation de ces divers marqueurs fluorescents associés aux cellules hippocampales, qu'elles proviennent de souches wild type ou knockout, a été rendue possible grâce à différents filtres, tous associés à une longueur d'onde spécifique. En effet, selon cette dernière émise par le microscope, le fluorochrome est capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Le GFP réagit avec le filtre eGFP à un lambda de 488 nm, le c-Fos, avec Alexa 594 ( $\lambda=591$ ), le PV et CB, avec Alexa 488 ( $\lambda=488$ ) et le Hoechst, avec DAPI ( $\lambda=345$ ). Important de noter que le programme servant à acquérir les images est « Axo Vision », de Carl Zeiss AG, 8714 Feldbach. Les images ont été réalisées à partir de trois régions différentes de l'hippocampe, la région du GD, du CA1 et CA3. Nous avons utilisé pour chacune de ces régions, un objectif à 20x (pour les détails d'une région) et 5x (pour la vue d'ensemble d'un

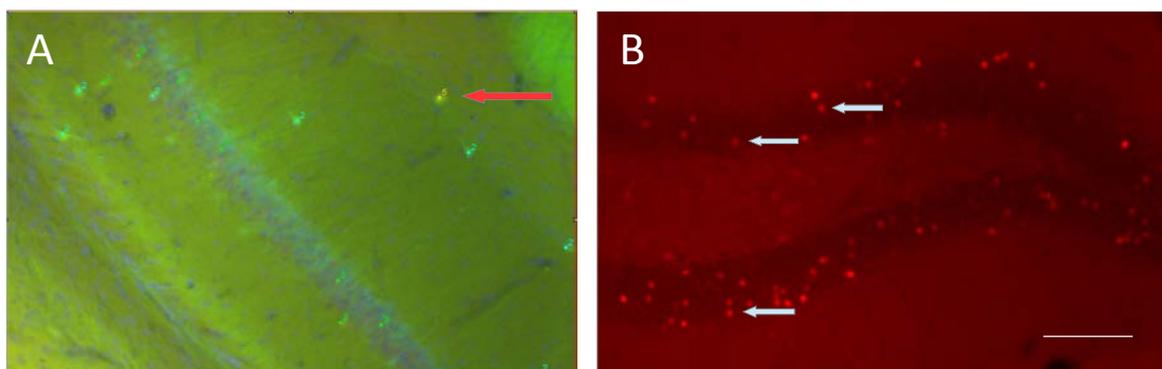
hippocampe dans un hémisphère). Précisons que chaque coupe cérébrale compte deux hémisphères et par conséquent deux hippocampes, résultant en l'acquisition de 6 images par fluorophore. Un hémisphère de souris marqué PV (par ex.) représente donc 18 prises de vue. Chaque prise de vue est calquée sur un modèle topographique précis, permettant de normaliser les données et de ce fait une utilisation comparative des résultats. Ce même modèle implique une quantité de cellules par  $\mu\text{m}$  comparativement comparable entre chacune des coupes. Au sein de la région du GD, nous devons distinguer la couche moléculaire de part et d'autre de l'image, enveloppant la couche granulaire, composée, en majeure partie des corps neuronaux des cellules principales. La séparation des couches granulaire doit être visible sur l'image acquise. Le hile du GD (CA 4) quant à lui n'est pas pris en compte (voire à titre d'exemple les **figures 1a/b**). Pour le CA3, 4 couches doivent être visibles, la *stratum oriens*, le *stratum pyramidale*, le *stratum radiatum*, le *stratum lucidum moleculare*. La couche pyramidale, composée par les corps neuronaux des cellules principales formant un arc d'approximativement  $45^\circ$  est positionnée centralement à l'image (voir illustration 1d). Il en va de même pour le CA1, les 4 couches hippocampales sont visibles. La couche pyramidale servant de point de repère est excentrée de l'image (voir **figures 1c et 1f**).

**Analyse des données :** une fois que les images acquises au microscope, nous avons utilisé le plugin, Cell Counter, via le programme ImageJ, National Institut of Mental Health, USA, nous permettant d'analyser le nombre de cellules, exprimant soit PV ou CB et c-Fos soit GFPm et c-Fos pour les séries 1 et 2 respectivement. Le Hoechst ayant uniquement la fonction de colorer l'ADN permet ainsi de contraster les diverses stratifications hippocampiques. A noter que, par cellule, nous sous-entendons les cellules identifiées par les protéines exprimées par cette dernière. Il a été possible grâce à ImageJ, de superposer 3 images, les 2 premières étant caractérisées par un marquage cellulaire, la troisième par le produit de contraste Hoechst. Les combinaisons d'images ainsi formées se présentent comme suit : CB, c-Fos et HOECHST ; PV, c-Fos et HOECHST ainsi que GFPm, c-Fos et HOECHST. Les figures 1a, b, c, et d représentent indirectement les différents marqueurs cellulaires aux 3 régions de l'hippocampe, les figures 1e et f quant à elles, représentent un hippocampe et une région CA1, successivement, toutes deux colorées à l'Hoechst. Les cellules une fois quantifiées, nous avons voulu déterminer le nombre de cellules avec une co-localisation de marquage, c'est-à-dire si une même cellule pouvaient être marquées à la fois par CB, PV ou GFPm et à la fois avec c-Fos (**voir figures 2a et b**). Nous avons ensuite reporté les données dans une tabulation EXCEL, en spécifiant la localisation et les marqueurs neuronaux concernés. Cette localisation comprend les couches du CA1 et CA3 (en regroupant en 2 catégories : couche pyramidales et « autres » contenant les cellules non-pyramidales), et les couches granulaires (cellules principales) et moléculaires (cellules non-pyramidales) du GD. Le comptage de cellules n'est pas une opération facile, car l'intensité du marquage fluorescent est variable. Nous avons par conséquent uniquement pris en compte les sources fluorescentes nettes et circulairement bien définie (**voir figure 2**). Nous avons finalement comparé les résultats quantitatifs selon diverses variables telles que le phénotype sexuel ♀/♂, le génotype WT/KO, stimulation stressante (FST)/contrôle (Ctrl). Il est important de noter que l'immunofluorescence des deux séries a été réalisé à des temps différents. Comme la 2ème série a été faite plus récemment et que l'immunofluorescence s'estompe au cours du temps, elle présente une immunofluorescence plus marquée que la 1ère série. Nous avons par conséquent dans le comparatif des séries 1 et 2 (voir chapitre « discussion ») tenu compte de cette variable.

Les tests statistiques ne montrent pas de différences significatives compte tenu d'une part du nombre d'échantillons et de la variabilité. Compte tenu de la taille de l'échantillonnage qui a pu être étudié dans le cadre de cette étude, les analyses sont limitées à une comparaison qualitative.



**Figure 1.** **A:** Immunofluorescence de la CB dans la région du DG (lame C5), noter le marquage de nombreuses cellules dans la couche granulaire ; **B :** Immunofluorescence de la PV dans la région DG (lame S16), noter la présence de quelques interneurons de part et d'autre de la couche granulaire ; **C :** Localisation des neurones pyramidaux exprimant la GFP (souche des souris GFPm) dans la région CA1 (lame 493.37) ; **D :** Cellules immunoreactives pour le c-Fos dans la couche pyramidale dans la région CA3 (lame S2) ; **E :** Division cytoarchitectonique de l'hippocampe visualisée par le marquage de Hoechst (lame S2) ; **F :** Micrographie à plus fort grossissement de la région CA1 colorée avec le Hoechst (lame S2). Echelle : A-D et F : 100  $\mu$ m, E : 400  $\mu$ m.



**Figure 2.** **A :** exemple de co-localisation (flèche rouge) entre les marqueurs cellulaire CB et c-Fos (en orange, combinaison de rouge et vert) ; CB présent dans plusieurs cellules non-pyramidales dans le *stratum oriens* et *radiatum*, CA1 avec la superposition des 3 filtres. (lame C5) ; **B :** exemples de cellules fluorescentes pour le marqueur c-Fos dans la couche granulaire du DG ; lame S1, aucune superposition. Echelle (A-B) : 100  $\mu$ m.

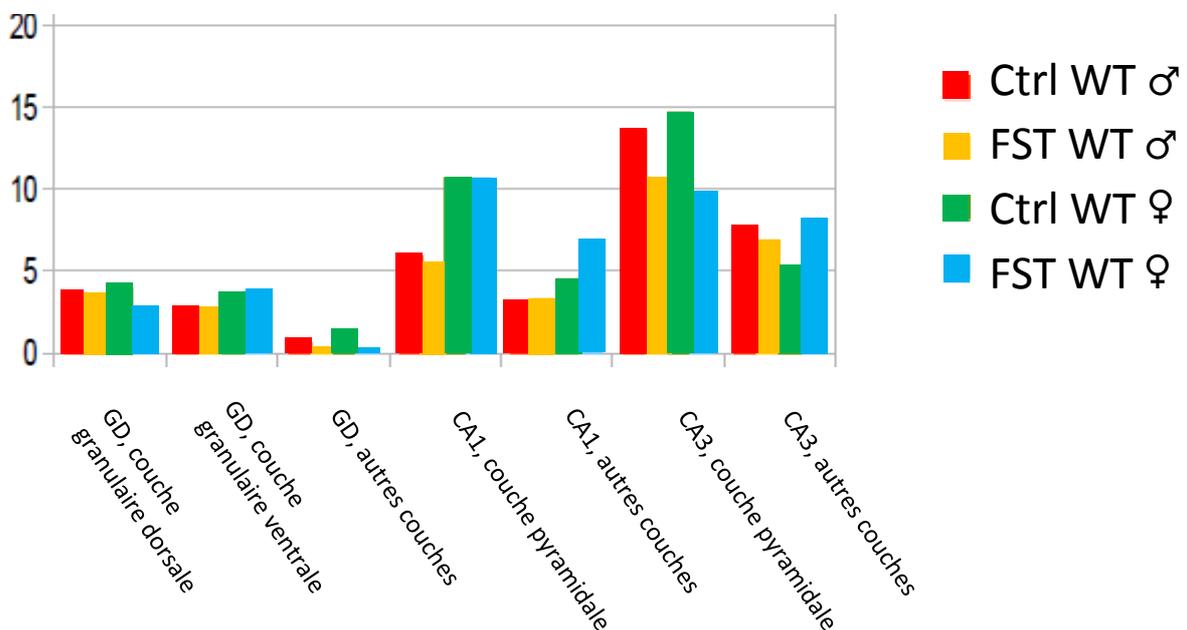
**RESULTATS :**

Les données exposées dans les tableaux de la première et deuxième série représentent un résultat moyenné du nombre de cellules appartenant à 8 hippocampes de 4 souris différentes. Chaque nouveau marqueur cellulaire est systématiquement introduit par un tableau global lui correspondant. De même, à chaque analyse est associé un tableau illustrant les résultats sous forme d'histogramme. Par «global», nous entendons qu'il inclut toutes les couches hippocampiques. Chacun de ces tableaux est ensuite spécifiquement analysé afin d'en discuter des résultats probants. Gardons à l'esprit que, dans la première et la deuxième série, l'objectif est de mesurer, respectivement, l'impact de sexe et la délétion du gène d'intérêt (récepteur 5-HT1a). L'analyse introductive rédigée ci-dessous nous permet grâce aux marquages neuronaux PV et CB, de mieux appréhender la composition cellulaire hippocampique ainsi que sa structure lamellaire.

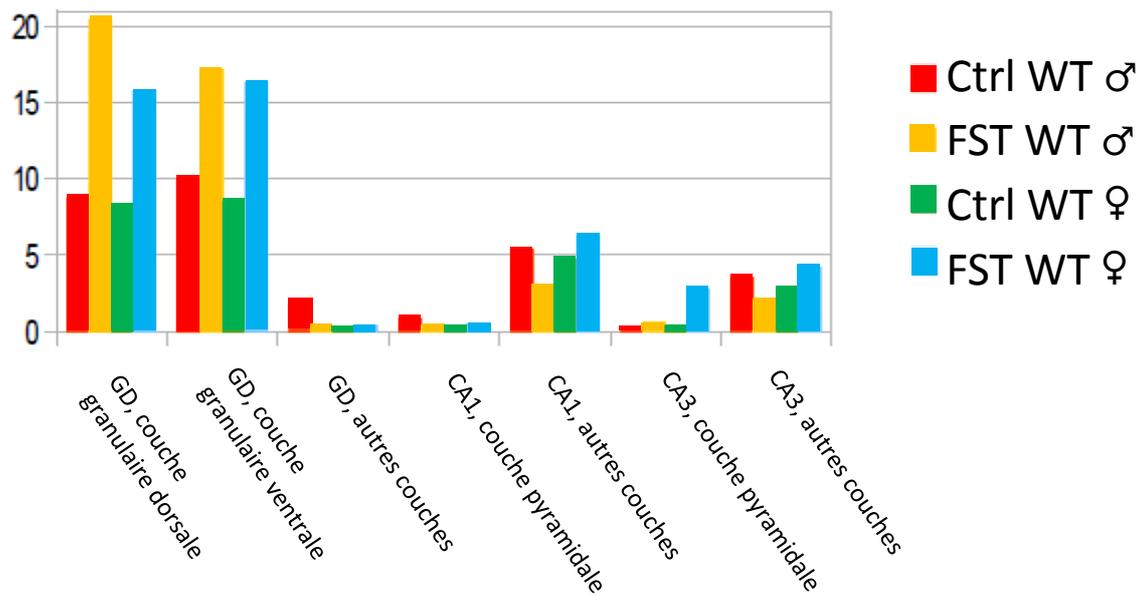
*Analyse introductive* : les interneurons marqués à la CB sont présents en majorité dans les couches autres que pyramidales du CA1 et CA3, nommées « autres », traduisant un nombre largement supérieur de cellules marquées dans ces couches. Les interneurons exprimant la CB dans les couches pyramidales sont quasiment inexistantes. Ceux exprimant la PV sont présents et dans les couches « autres » du CA1 et CA3 et largement dans les couches pyramidales, traduisant un nombre de cellules marquées plus élevé dans ces mêmes couches. Les résultats inscrits dans le **tableau 1A et 1B** en témoignent. De plus, les cellules marquées à la CB sont quantitativement augmentées dans les couches du GD dorsal et ventral en comparaison avec les cellules marquées à la PV. Cette observation soutient la thèse que la calbindine est exprimée dans les interneurons d'une part, et les cellules principales, dites granulaires dans les couches dorsales et ventrales du GD. En conséquence, les images du GD acquises au microscope avec des cellules marquées à la CB se différencient aisément des autres ; nous distinguons les dendrites des cellules granulaires dans la couche moléculaire, leur corps dans les couches granulaires et leur axones, destinés à faire synapse sur les neurones du CA3, formant un voie de projection appelée « fibres moussues ».

**Tableau 1 : Distribution du nombre de cellules immunoreactives par coupe pour le marquage avec la PV (A) et la CB (B)**

**A : Nombre de cellules PV-IR (par coupe) – Série 1**



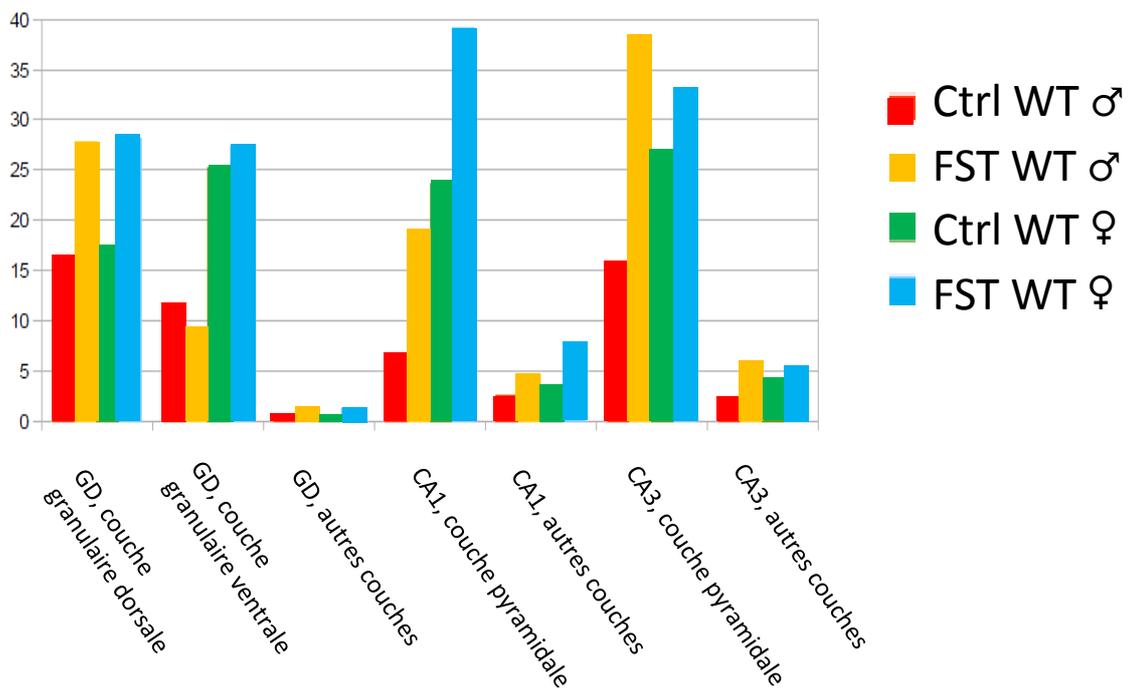
## B : Nombre de cellules CB-IR (par coupe) – Série 1



Dans la **première série**, nous avons analysé les données selon qu'elles soient associées au c-Fos, à la parvalbumine, à la calbindine, focalisant sur les interneurons (à l'exception des cellules granulaires du GD). Nous avons ensuite décrit et analysé leur co-localisations, c'est-à-dire celle du c-Fos avec les autres types de marqueurs d'interneurons.

**Tableau 2, vue globale, c-Fos :**  
toutes couches et populations confondues

## Nombre de cellules c-fos (par coupe) – Série 1



*1ère analyse, c-Fos* : en confrontant les populations de souris Ctrl et FST ♂, nous observons dans les parties dorsales du GD une augmentation du nombre de cellules exprimant le c-Fos suite à l'exposition au stress, et dans les parties ventrales, une absence d'effet. Cette observation est partiellement comparable à la population de souris Ctrl et FST ♀. En effet, nous observons également dans la région ventrale du GD une absence d'effet de l'exposition au stress, mais des valeurs basales supérieures chez les ♀ (voir **tableau 2**). Les données du **tableau 2** peuvent être également présentées sous la forme d'un rapport entre les parties dorsales et ventrales du GD. Dans la population de souris Ctrl ♂, le ratio dorso-ventral est de 1.3 et pour la FST ♂ de 3.1. Cette forte augmentation du ratio D/V provient de la conjonction de l'augmentation importante du nombre de cellules exprimant c-Fos dans la partie dorsale et une légère diminution dans la partie ventrale suite au conditionnement de stress. Dans la population de souris Ctrl ♀, le ratio dorso-ventral est de 0.72 et pour la FST ♀ de 1.03. Ce rapport différent est dû à la valeur basale haute d'expression de c-Fos dans la région ventrale chez la femelle et l'absence d'effet de la condition stressante sur cette expression de c-Fos.

*2ème analyse, c-Fos* : dans les couches pyramidales du CA1 des populations de souris mâles et femelles, on constate une forte augmentation du nombre de cellules c-Fos entre les Ctrl et FST (2.71 et 2.05, respectivement) avec un niveau basal entre les Ctrl ♀ et ♂ de 3.73. Il y a une augmentation importante du nombre de cellules c-Fos chez les mâles suite à la stimulation stressante (facteur de 2.38), alors que chez les femelles, le niveau basal de c-Fos est élevé et il n'y a pas d'effet net de la stimulation stressante.

*3ème analyse, c-Fos* : dans le **tableau 2**, nous y observons deux caractéristiques ; d'une part, une activité liée à c-Fos considérablement augmentée après FST dans les couches de cellules principales, correspondant aux neurones pyramidaux. Au contraire les couches contenant les cellules non pyramidales, dites « autres » ou moléculaires, présentent une expression de c-Fos basse mais non nulle. Pour les interneurons, il y a aussi une légère augmentation de l'expression de c-Fos après FST, mais dans des proportions beaucoup plus réduites, probablement peu significatives.

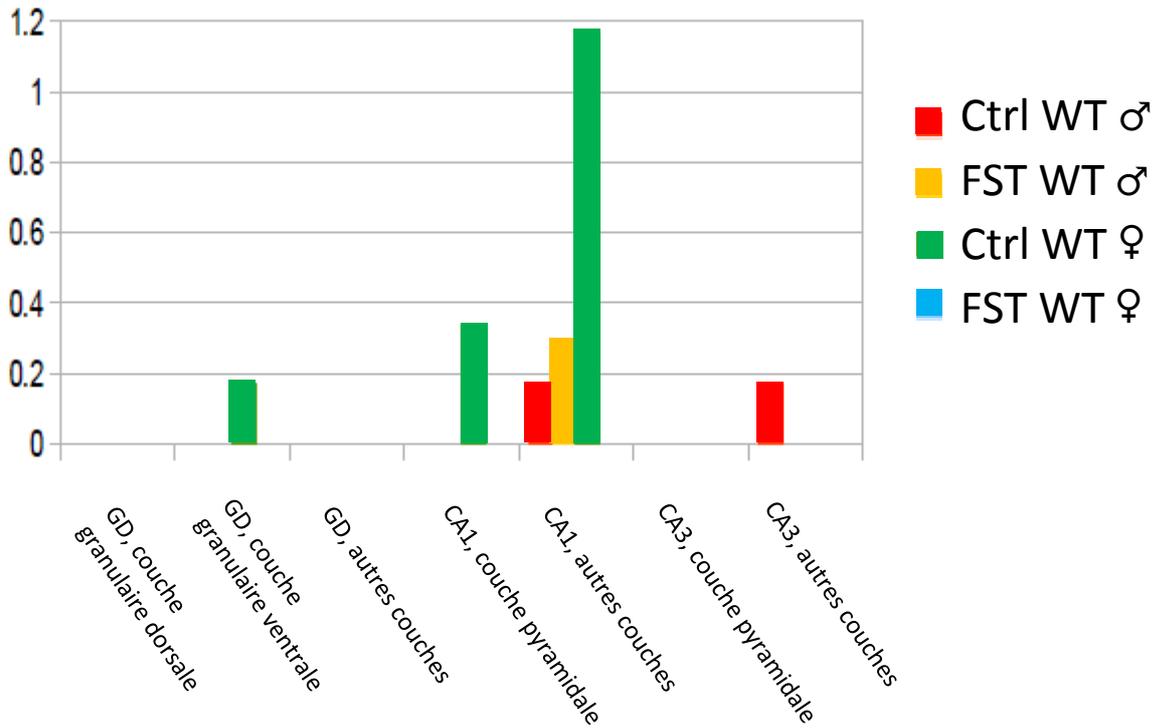
*4ème analyse, PV et CB* : comme précédemment exprimé, la proportion de neurones entre les couches pyramidales et « autres » varient pour un même marquage. Cette variation est fortement prononcée pour la CB et moins pour la PV. La raison de cette différence est discutée au paragraphe « analyse introductive ». La divergence quantitative ne se retrouve pas uniquement au sein d'une population de neurones (« intra-marquage ») entre couches et secteurs de l'hippocampe, mais également entre les deux populations de neurones (« inter-marquage ») pour une même couche et secteur d'hippocampe (voir **tableaux 1A et 1B**). Dans le DG, il y a un rapport de 1:2 environ entre le nombre de cellules CB dans les couches « autres » par rapport aux couches pyramidales, et une proportion inverse pour les cellules PV. Cette même différence se retrouve dans les secteurs CA1 et CA3. On constate aussi que le nombre moyen de cellules CB dans le DG est globalement double chez les souris FST ♂ et ♀ par rapport aux souris Ctrl.

*5ème analyse, co-localisations* : les co-localisations PV et CB/c-Fos sont hasardeuses du fait de valeurs comprises entre 0 et 0,4. Néanmoins, nous observons deux faits intéressants. Le premier est que, au sein de la population de souris CTRL ♀, les co-localisations sont plus nombreuses, que ce soit entre PV/ c-Fos ou CB/ c-Fos. Notons également que, dans la couche « autres » du CA1, les co-localisations PV/ c-Fos sont 5 fois supérieures aux autres, toutes populations de souris confondues.

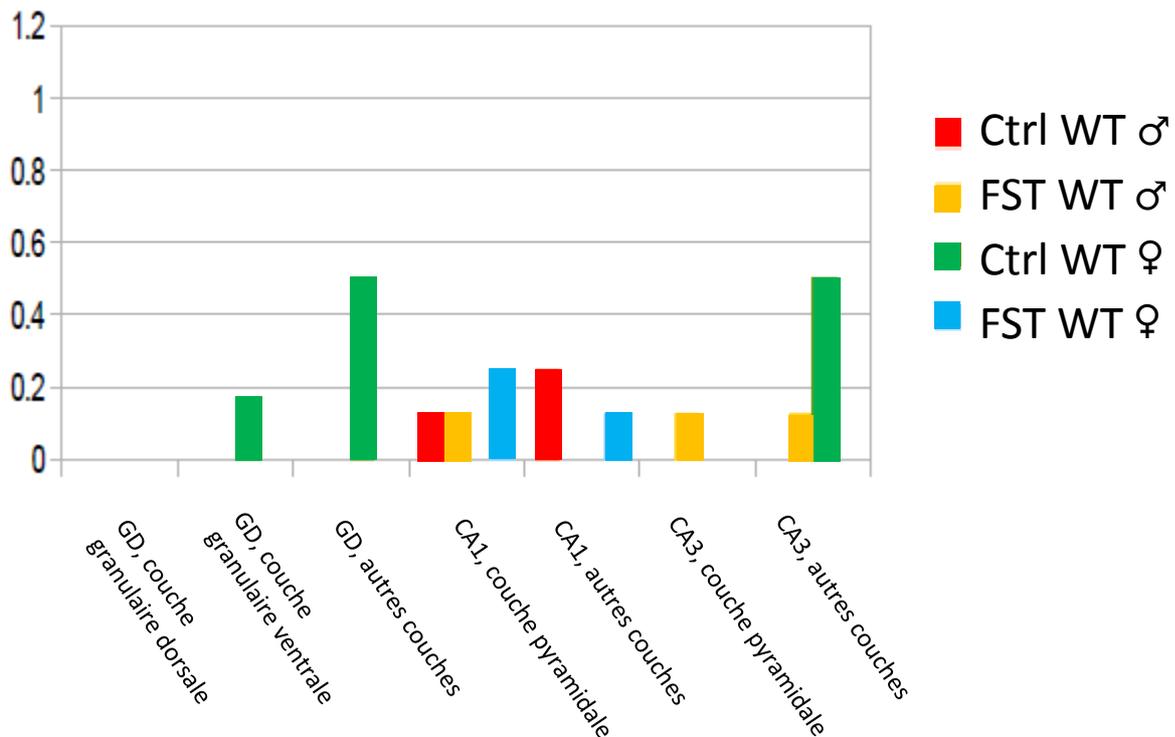
Le deuxième, est que les marqueurs CB et c-Fos co-localisent plus fréquemment, dans plus de couches et de secteurs.

**Tableaux 3 (A et B) : co-localisation PV/ c-Fos (A) et CB/ c-Fos (B) :**  
toutes couches et populations confondues

**A : Nombre de cellules avec colocalisation  
c-fos/PV-IR (par coupe) – Série 1**



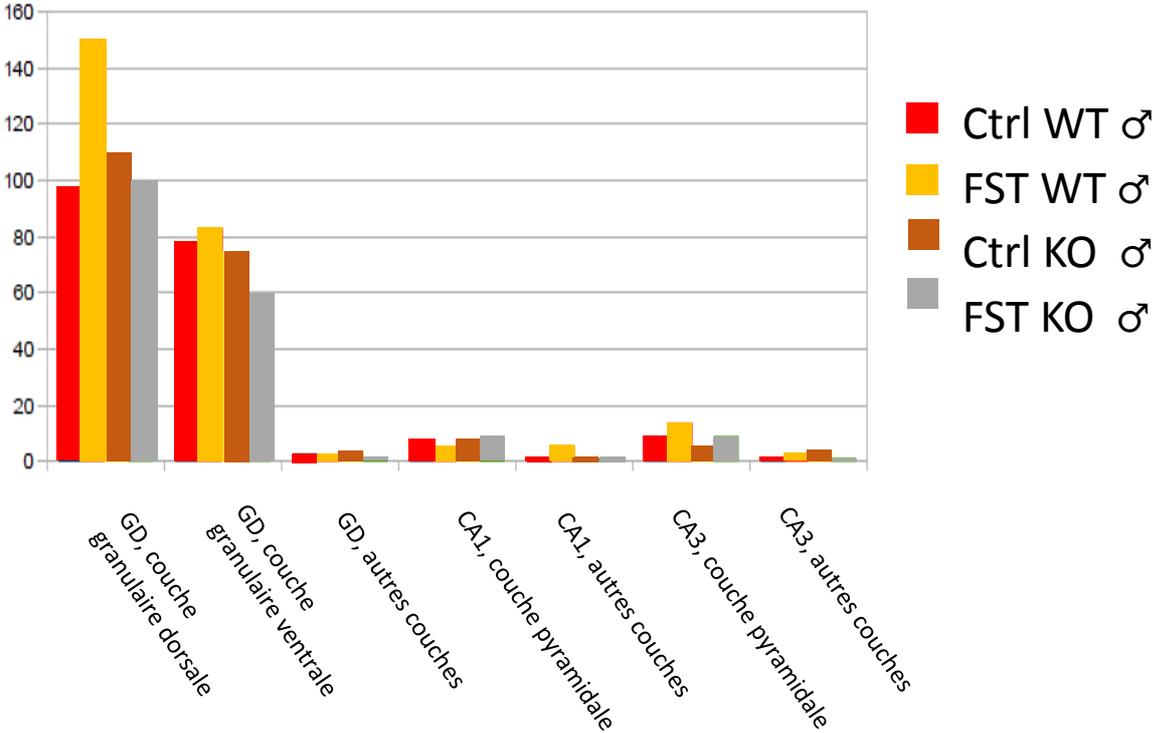
**B : Nombre de cellules avec colocalisation  
c-fos/CB-IR (par coupe) – Série 1**



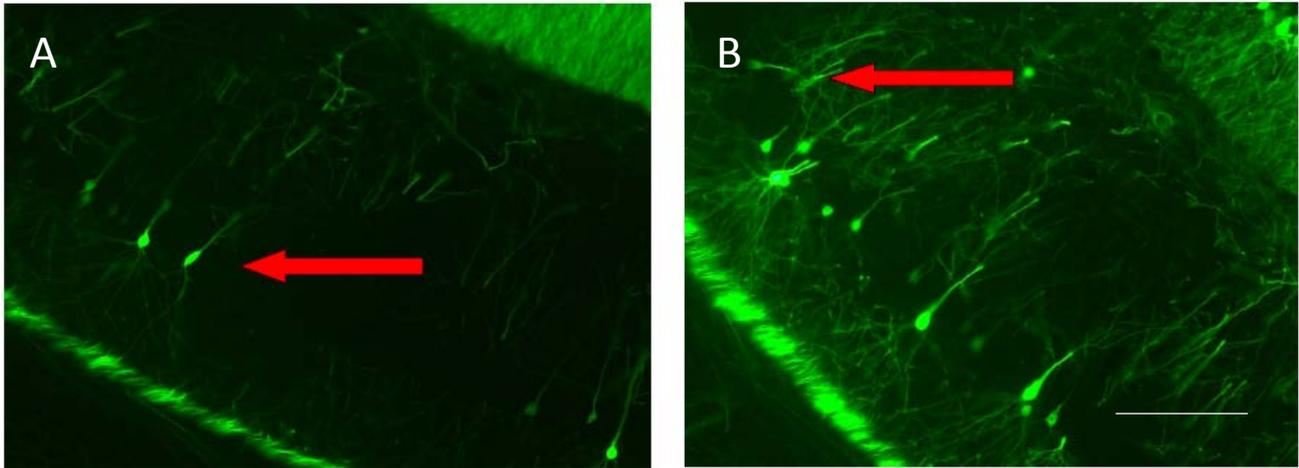
Pour les résultats de la **2ème série**, contenant les types de cellules marquées GFPm, c-Fos ainsi que leur co-localisation, ils représentent également des résultats moyennés du nombre de ces mêmes cellules, appartenant non plus à 8, mais à 6 hippocampes de 3 souris différentes par condition. Rappelons que tous les animaux analysés dans ce chapitre possèdent un phénotype mâle comparant les animaux KO et WT ayant subi ou non le forced swim test.

**Tableau 4, vue globale, GFPm :**  
toutes couches et populations confondues

Nombre de cellules GFP (par coupe) – Série 2



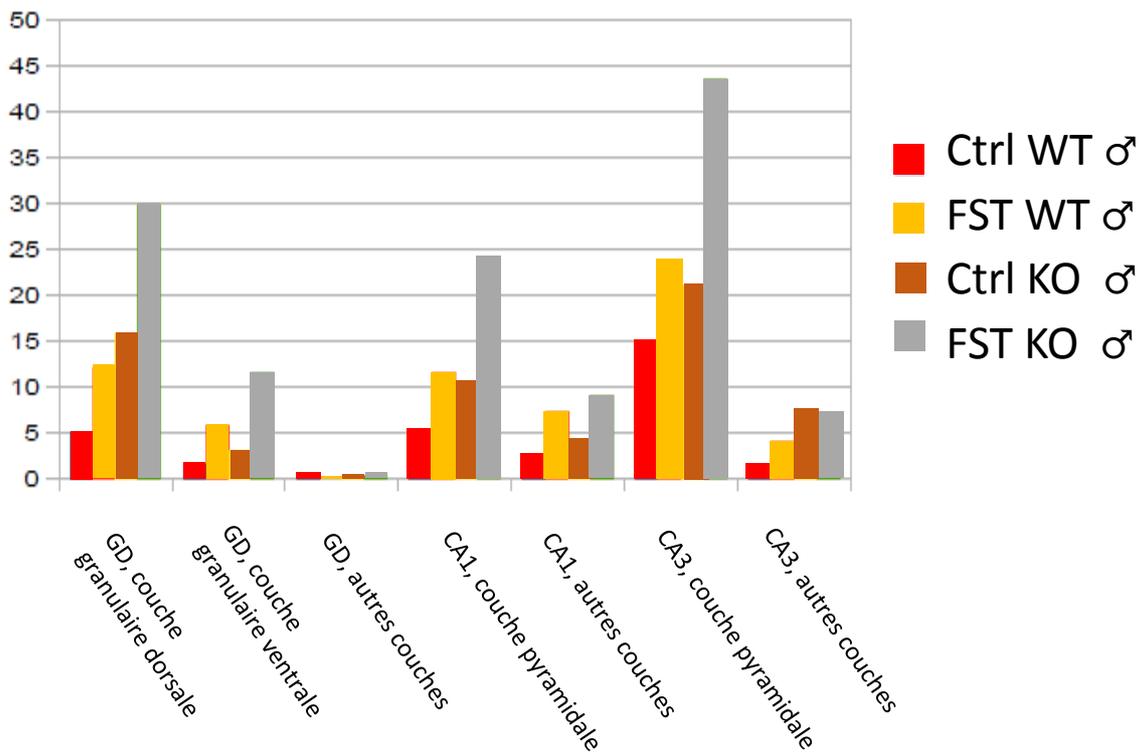
1<sup>ère</sup> analyse - GFP : La souris GFPm a un patron d’expression de la GFP dans les cellules du cortex cérébral avec une proportion de 95% dans les neurones de projection, 3% dans les interneurons et 2% dans les astrocytes [38]. Cependant la proportion de cellules exprimant la GFP parmi les neurones de projection varie en fonction du type cellulaire. Dans l’hippocampe dorsal, il y a une grande proportion de cellules granulaires du DG et une faible proportion des neurones pyramidaux des secteurs CA1 et CA3 qui expriment la protéine GFP.



**Figure 3 (A et B) :** A : Exemple d'une cellule pyramidale (flèche rouge) dans la couche pyramidale du CA1; B : Exemple d'un interneurone (flèche rouge) dans le *stratum radiatum* du CA1. Echelle (A et B) : 100 µm.

**Tableau 5, vue globale, c-Fos :**  
toutes couches et populations confondues

Nombre de cellules c-fos (par coupe) – Série 2



Nous retrouvons sur le **tableau 5** dans chacune des couches de l'hippocampe un même patron d'expression de c-Fos. Autrement dit, la proportion du nombre de cellules c-Fos positives pour chaque population de souris est conservée dans toutes les couches, excepté la couche moléculaire. Les données ont été divisées en deux sous-chapitres ; le GD et la CA, afin de analyser plus spécifiquement chacune des régions.

*2ème analyse, c-Fos GD* : Contrairement à la première série, nous n'observons aucune diminution du nombre de cellules marquées dans la partie ventrale du GD au sein des populations de souris FST, par rapport à leur population Ctrl (voir **Tableau 5**). En effet, les données nous indiquent que le nombre de cellules des populations de souris WT ou KO, une fois les souris stimulées (FST), augmente dans les couches granulaires des GD dorsal et ventral. Le rapport du nombre de cellules exprimant le c-Fos dans les couches dorsales des souris FST WT sur celles des Ctrl WT est de 2.09 et de 2.9 pour les couches ventrales des mêmes populations de souris. Concernant les populations FST KO et Ctrl KO respectivement, le rapport des cellules exprimant c-Fos dans la partie dorsale est de 1,94, et de 3,83 pour la partie ventrale.

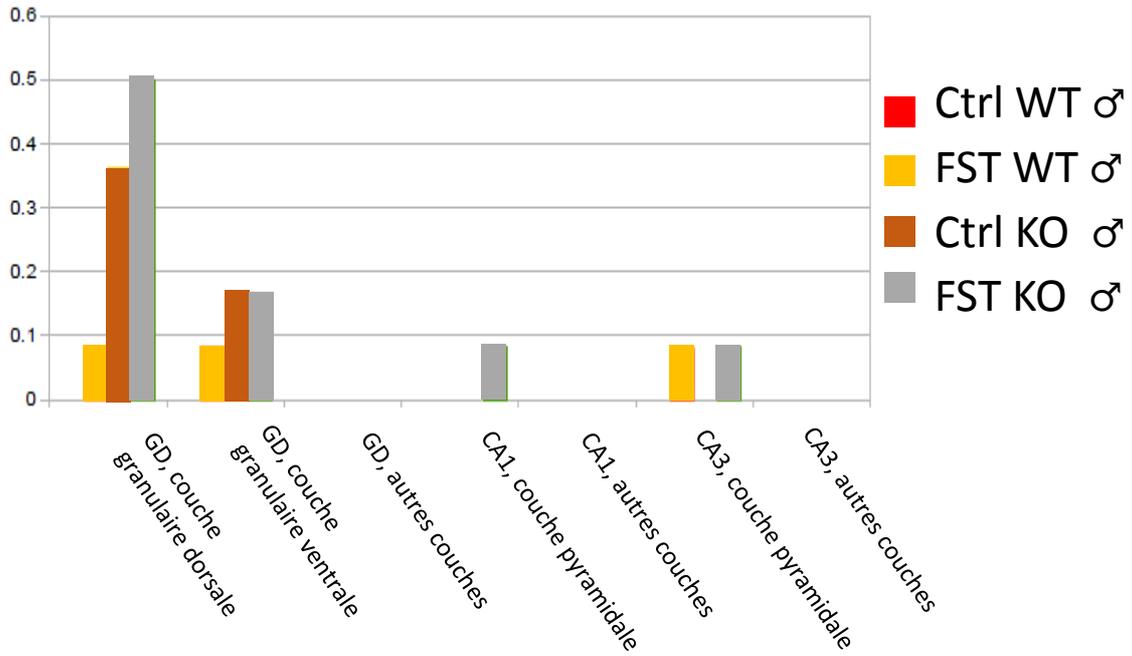
*3ème analyse, c-Fos CA cellules pyramidales*: Nous observons que dans les couches pyramidales du CA1 et CA3, une augmentation de nombre de cellules c-Fos entre Ctrl et FST ceci autant pour les souris WT et KO, voir **tableau 5**. Le rapport du nombre de cellules exprimant le c-Fos dans le *stratum pyramidalis* des souris FST WT sur celles des Ctrl WT est de 2.46 pour CA1 et de 1,6 pour CA3. Concernant les populations FST KO et Ctrl KO respectivement, le rapport des cellules exprimant c-Fos dans le CA1 est de 1,94, et de 2,05 dans le CA3. Ces valeurs recourent celles de la 1<sup>ère</sup> série, voir **tableau 2** pour comparaison..

*4ème analyse, c-Fos CA interneurons*: De manière analogue à la 1<sup>ère</sup> série de souris, nous observons également une activité liée à c-Fos augmentée dans les couches pyramidales comparées aux couches « autres ». A noter que l'augmentation de l'activité c-Fos de cette série-là n'est pas aussi importante. ; voir **tableau 5**. Tout comme dans la première série de souris, nous obtenons dans les couches CA1 et CA3 « autres » un nombre de cellules exprimant c-Fos similaire. Ces valeurs sont proches du zéro sans pour autant être nulles. En outre, l'activité c-Fos des populations de souris FST WT comparée à celle des souris Ctrl WT est 2,8 fois supérieure dans le CA1 et de 2,25 dans le CA3 ; celle des populations FST KO et Ctrl KO est égale à 2.11 dans le CA1 et 0.93 dans le CA3. Ces chiffres représentent des valeurs pouvant être mises en corrélation avec ceux de la 1<sup>ère</sup> série (voir tableau 2).

*5ème analyse, co-localisation GFPm/ c-Fos* : nous observons dans le GD granulaire dorsal et ventral davantage de co-localisation que dans les couches du CA ; voir **tableau 6**. Les couches moléculaires du GD, CA1 « autres », et CA3 « autres » ne contiennent aucune co-localisation, ce qui reflète le faible nombre de cellules exprimant la GFP dans ces couches. Les populations de souris impliquées dans les co-localisations sont, en ordre décroissant, FST KO, Ctrl KO et FST WT, respectivement. En outre, les données indiquent qu'au sein de la population de souris Ctrl WT, nous ne retrouvons aucune co-localisation. Après comparaison avec le nombre de cellules c-Fos et GFPm, nous observons que les résultats obtenus dans le tableau 6 une proportion relative plus importante dans le CA3 et CA1, ce qui reflète que l'augmentation de c-Fos en relation avec la stimulation (FST) est croissant du DG, au CA3, et au CA1.

**Tableau 6, co-localisation GFPm/ c-Fos :**  
toutes couches et populations confondues

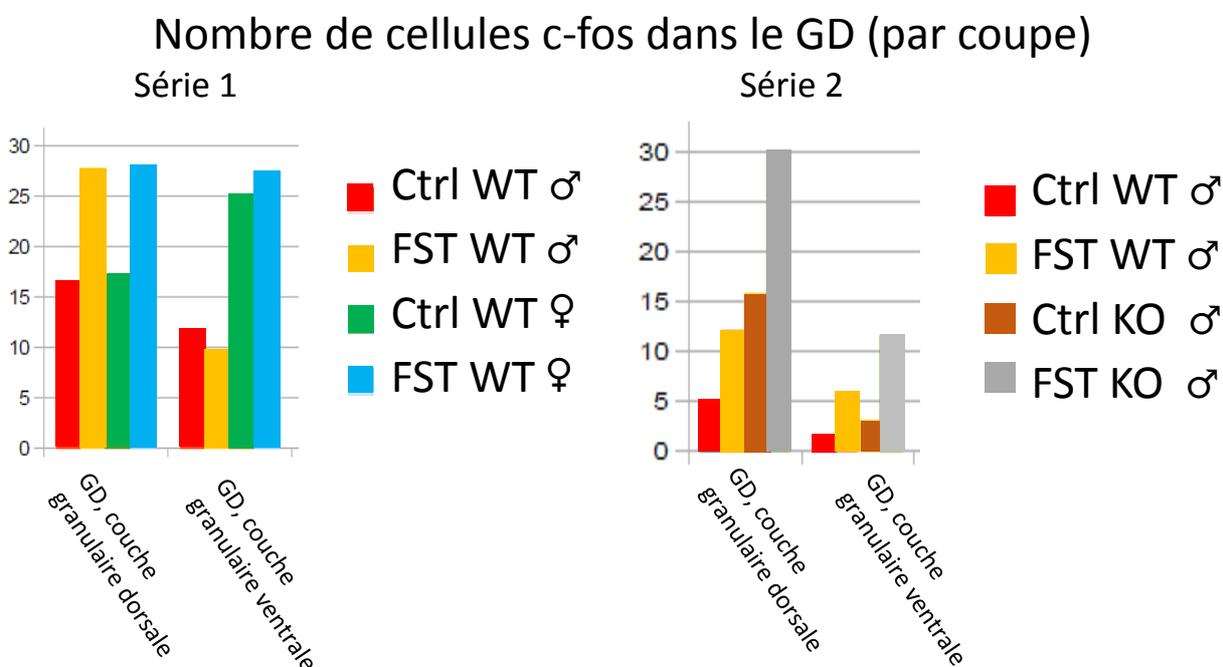
Nombre de cellules avec colocalisation  
c-fos/GFP (par coupe) – Série 2



## DISCUSSION :

Dans ce chapitre, nous allons mettre en lien les résultats des séries 1 et 2 décrites dans le chapitre précédent. Ensuite, nous tenterons de les mettre en perspective avec les hypothèses formulées dans l'introduction et en regard de la littérature préexistante. La discussion, divisée en 3 parties, se base sur les 4 marqueurs utilisés pour cette étude ; le c-Fos, la parvalbumine et la calbindine, et finalement la GFPm au même titre que leur co-localisation. Il est important de préciser que les résultats des séries 1 et 2 sont difficilement comparables en terme de valeurs absolues en raison d'une réalisation expérimentale à des temps différents, donc avec une normalisation partielle des conditions de préparation des cerveaux et des immunomarquages. La comparaison des résultats des séries 1 et 2 est par conséquent exprimée sous forme de valeurs relatives.

**Tableau 7, vue comparative 1ère/ 2ème série, c-Fos :**  
couches dorsales et ventrales



*Partie 1, comparaison et discussion, c-Fos, GD :* comme précédemment décrit, le nombre de cellules dans les couches dorsales d'une souris stimulée (FST) augmente par rapport aux souris Ctrl. A l'inverse, dans les couches ventrales, ce nombre reste constant ; voir **tableau 7**. Ce patron a été décrit dans des populations de souris WT, qu'elles soient de phénotype sexuel mâle ou femelle. Il existe une différence entre les couches dorsales (supragranulaires) et ventrales (infragranulaires) avec une réponse

Si nous comparons maintenant les résultats du tableau de la 1ère série avec celui de la 2ème, nous remarquons que les données de ce dernier expriment un patron différent du premier. En effet, comme il a été décrit dans le chapitre « analyse », le nombre de cellules d'une population de souris Ctrl à FST augmente autant dans les couches dorsales que ventrales. La population de souris de la série 2, à composition mâle uniquement, se distingue par son phénotype KO et WT. Les résultats décrivent une augmentation importante (environ d'un facteur de 3) entre les populations de souris WT et KO. Comme des souris ♂ WT sont testées dans la 2ème série et la 1ère série, ceci nous laisserait penser que les deux groupes ont un seul et même patron. Cette hypothèse est contredite par les résultats

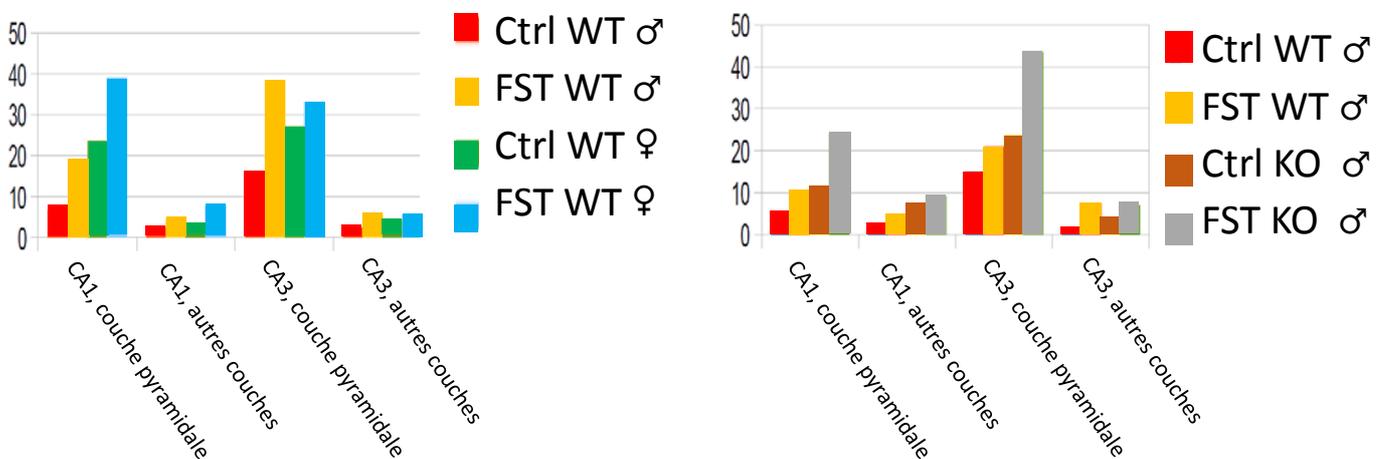
présentés dans le tableau 7. La population de souris WT ♂ est analysée dans les deux séries et on observe une différence dans la sensibilité de détection de c-Fos entre les deux séries qui ne permet pas de comparer précisément ces valeurs. Finalement il est à noter que le patron exprimé dans cette 2<sup>ème</sup> série se rapproche davantage des ceux décrits pour les couches pyramidales dans la CA (voir tableau 8).

**Tableau 8, vue comparative 1/ 2ème série, c-Fos :**  
couches pyramidales et « autres »

## Nombre de cellules c-fos dans la corne d'Amon (par coupe)

Série 1

Série 2

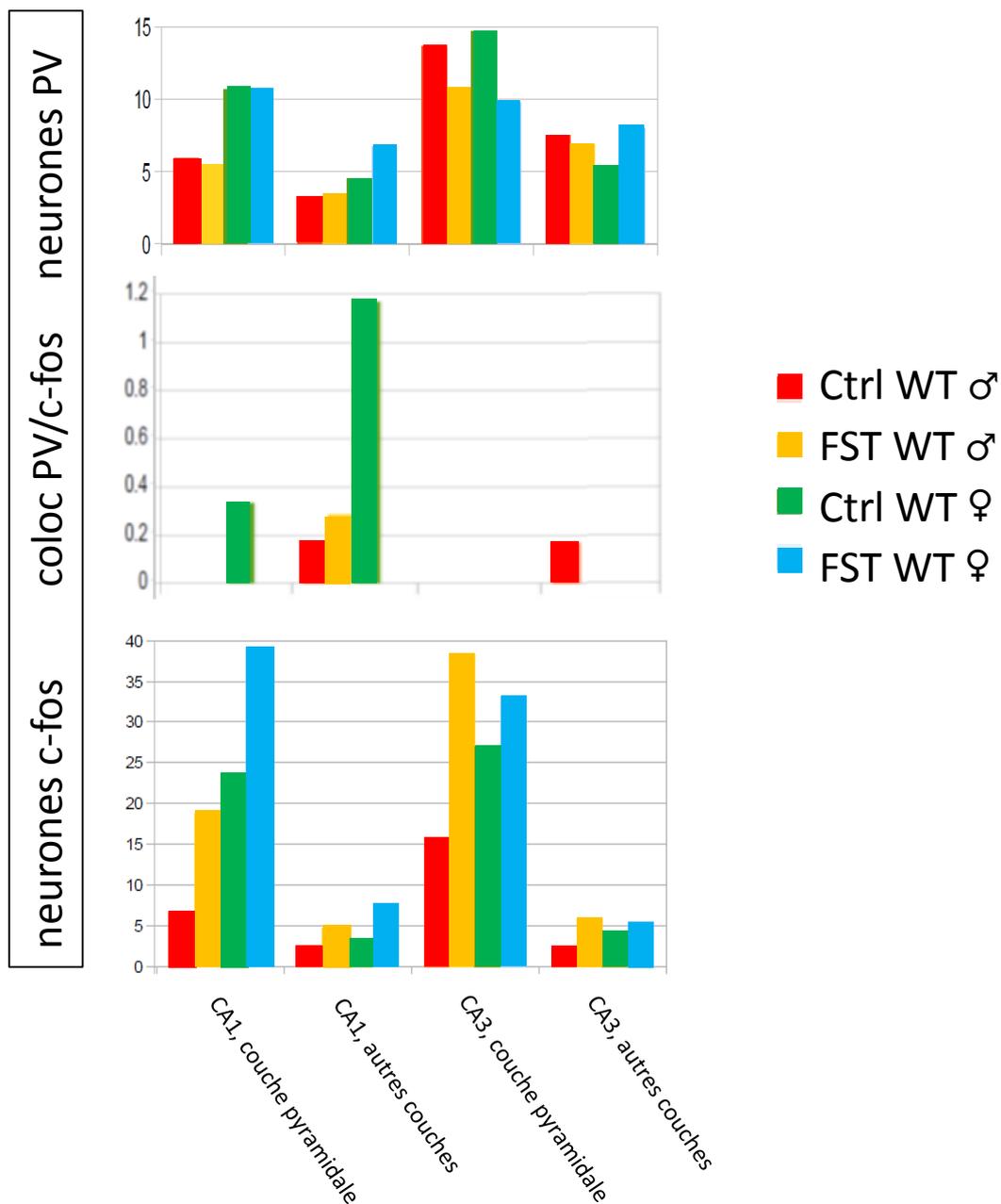


*Partie 2a, comparaison et discussion, c-Fos, couche pyramidale* : dans l'introduction, nous avons défini c-Fos comme un marqueur de l'activité neuronale. Il est fortement exprimé en présence de stimuli incluant le stress. Les résultats obtenus dans le **tableau 8** appuient les sources scientifiques citées dans l'introduction. En effet, au sein de chaque couche pyramidale, nous retrouvons un gradient croissant de cellules pour chaque population de souris (♂ < ♀, Ctrl < FST). A noter que nous ne prenons pas en compte les couches des cellules non pyramidales (« autres ») du fait d'un nombre de cellules trop peu important et donc peu exploitable. Selon les sources scientifiques, la population de rongeurs WT devrait présenter une activité cellulaire diminuée (traduit ici par un contingent de cellules) comparée à celle stimulée (FST). Les résultats obtenus au sein d'un même genre / génotype soutiennent cette théorie. Nous constatons également avec intérêt que les populations de souris Ctrl KO ♂ ou Ctrl WT ♀ présentent systématiquement un nombre augmenté de cellules c-Fos en regard des populations de souris Ctrl WT ♂, respectivement, dans les séries 1 et 2. Nous supposons par conséquent que l'activation cellulaire est tout autant influencée par le genre et le génotype que par l'exposition à un stimulus stressant. L'influence du sexe ainsi que des gènes sur l'activité neuronale et le comportement de type anxieux est discutée dans le paragraphe suivant.

*Partie 2b, comparaison et discussion, c-Fos, comparaison avec données comportementales dans la littérature* : dans cette seconde partie il est intéressant de tracer un parallèle avec les hypothèses découlant du test comportemental « Open Field ». Ces hypothèses postulent que les déplacements centraux ou périphériques dans l'arène reflètent un niveau d'anxiété bas pour les souris WT ♂ et haut pour les souris KO ♂, respectivement (13). Dans cette étude originale des souris 5-HT1aKO, les souris ♀ WT et KO ont une réponse similaire dans le test d'« Open field », mais avec un phénotype de type anxieux élevé dans ce test. Leur génotype *knock-out* et leur phénotype sexuel femelle sont tous deux des caractéristiques qui laissent penser qu'elles auraient une influence sur le niveau d'anxiété des rongeurs. Fort de constater que le patron développé à partir de ce test, se chevauche avec les résultats dans la 1ère série ; voir **tableau 8**. En effet, malgré un génotypique uniquement à caractère WT et des souris ayant toutes subi ou non une épreuve de stress, les subdivisant de ce fait en deux groupes, les Ctrl et FST, les données de la 1ère série sont en adéquation avec le modèle « Open Field ». Pour cette 1ère série, nous en déduisons que les souris avec délétion des récepteurs sérotoninergiques 5-HT1a ou soumises à un environnement stressant (FST) présentent un même niveau d'activité neuronale évoquant de ce fait un état anxieux élevé avec comme dénominateur commun entre l'Open field et la 1ère série, le phénotype sexuel ; WT ♂ et FST ♂, WT ♀ et FST ♀. Concernant la série 2, les souris ont également été soumises ou non à un environnement anxiogène (FST versus Ctrl), en gardant les mêmes caractéristiques génotypiques KO ou WT que celles qui déterminent expérimentalement les souris testées dans l'« Open field ». Les résultats de ce test sont une observation comportementale de l'animal contrairement aux résultats du « forced swim test » qui eux sont donnés sous forme d'activité neuronale. Si nous comparons les résultats de l'expression du c-Fos des séries 1 et 2 avec l'« Open field » [13], nous constatons que leurs patrons respectifs obtenus à partir des résultats expérimentaux des séries 1 et 2 sont proches, mais non identiques. Pour les souris ♂ (série 2), il y a une augmentation de l'activité neuronale (c-Fos) avec la délétion du gène 5-HT1aR, un paramètre qui corrèle le comportement anxieux décrit dans ce modèle de souris transgénique. Il y a également un niveau d'activité des souris Ctrl ♀ et KO ♀. Pour évaluer si cette corrélation entre le niveau

**Tableau 9 : comparaison de l'expression c-Fos, PV, et sa co-localisation – série 1 :**  
CA, toutes couches et populations confondues

## Colocalisation PV / c-fos – Série 1

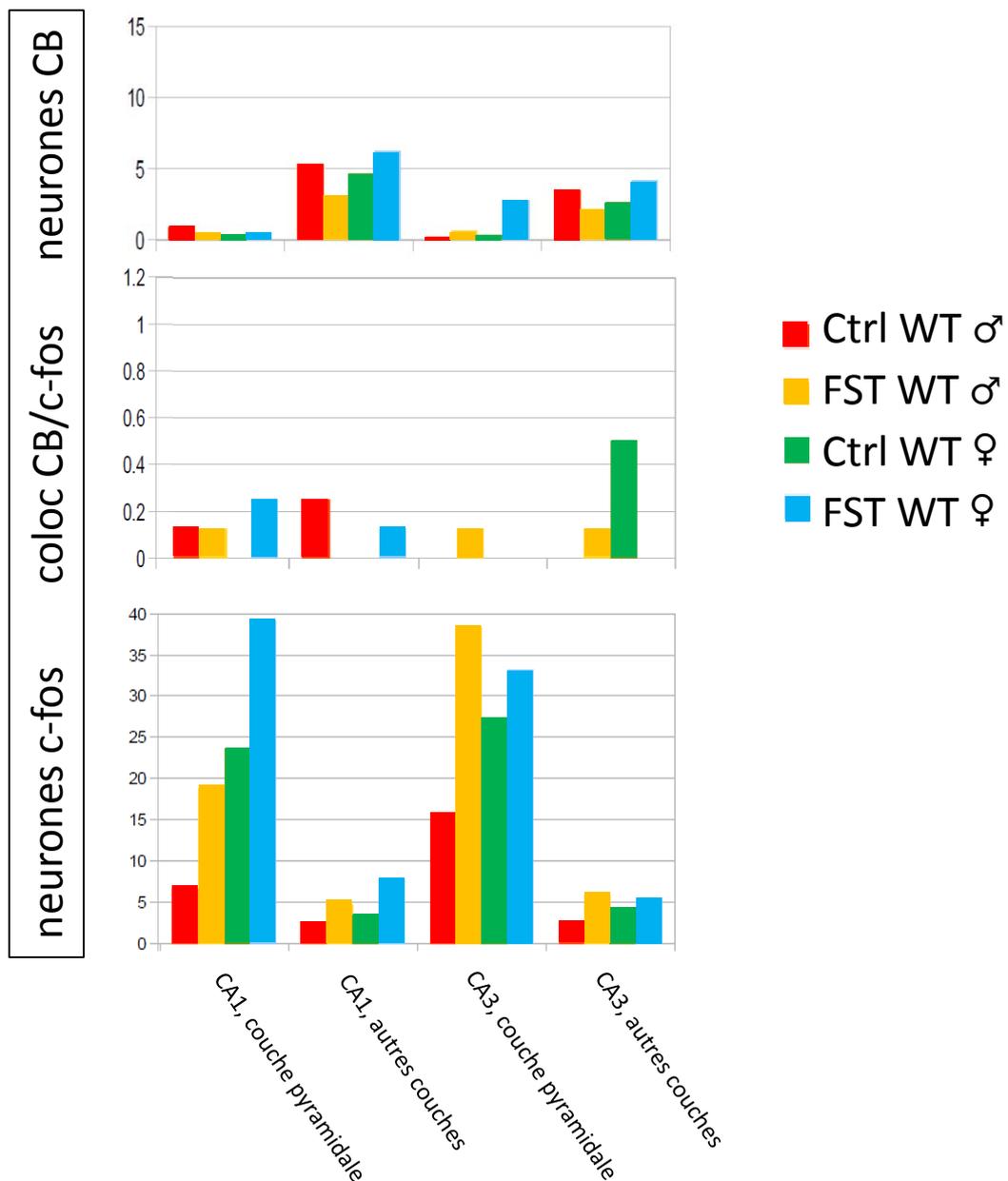


Partie 3a, comparaison et discussion, co-localisation c-Fos/ PV et CB : du fait d'un nombre très restreint de colocalisations c-Fos/ PV et c-Fos/CB des **tableaux 9 et 10**, respectivement, comparé au nombre de cellules c-Fos, les résultats présentés dans ces deux derniers tableaux sont limités.

Néanmoins, de tels résultats prouvent que les marqueurs CB et PV ainsi que c-Fos ne sont pas ou de façon négligeable associés aux mêmes types cellulaires.

**Tableau 10 : comparaison de l'expression c-Fos, CB, et sa co-localisation – série 1 :**  
CA, toutes couches et populations confondues

## Colocalisation CB / c-fos – Série 1

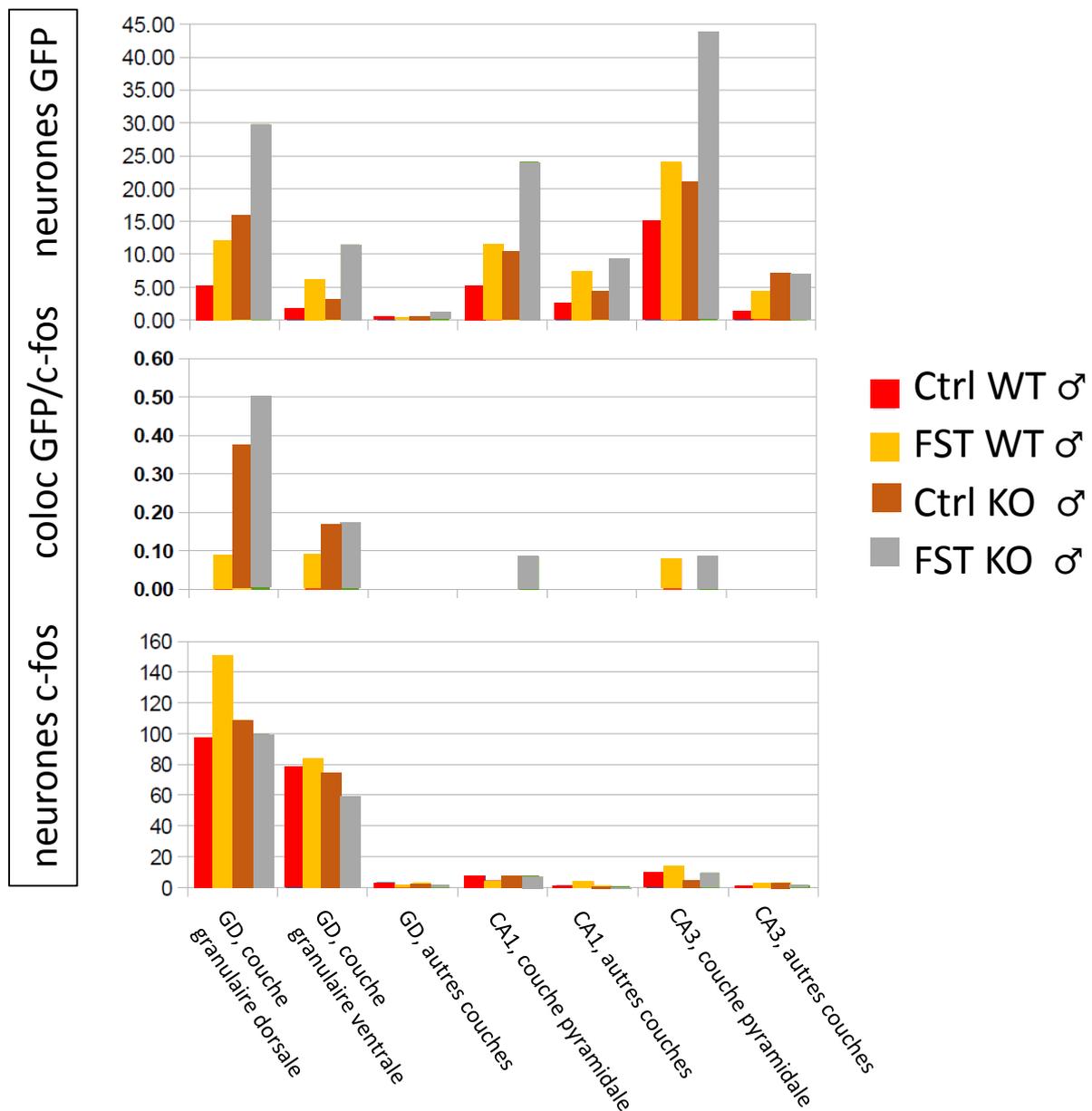


Notons qu'à ce jour, il n'est par contre pas encore formellement décrit si c-Fos est spécifiquement associée aux cellules principales hippocampiques (pyramidales ou granulaires) ou/ et à d'autres types cellulaires, constituant la structure de l'hippocampe. En lien avec ce qui a été précédemment affirmé, soulignons que les co-localisations PV et CB sont faibles, mais non nulles, ce qui nous laisse penser que le marqueur c-Fos ne concernerait pas uniquement des cellules de type pyramidale et granulaire. De plus, dans le chapitre «résultats» ; voir **tableau 3A** et **3B**, nous avons observé que les

colocalisations CB/ c-Fos étaient 10x plus nombreuses que les colocalisation PV/ c-Fos, ce qui nous laisse également supposer que c-Fos, toujours dans une moindre mesure, est stimulé davantage dans les cellules exprimant la CB que les cellules exprimant la PV. A noter que dans le DG, les cellules ganglionnaires (donc principales) expriment la CB. Donc dans cette partie de l'hippocampe, c'est les cellules principales du DG qui contribuent à cette population, les interneurons exprimant CB n'étant une population exprimant très peu c-Fos sous l'effet de la stimulation par FST. Finalement, il faut remarquer que dans le CA1, les interneurons exprimant PV colocalisent plus souvent c-Fos, dans les différentes conditions, donc laissant supposer que dans cette région, c'est une population particulière d'interneurons impliqués différemment dans les circuits hippocampaux, avec une excitabilité accrue.

**Tableau 11 : comparaison de l'expression c-Fos, GFP, et sa co-localisation – série 2 :**  
CA, toutes couches et populations confondues

### Colocalisation GFP / c-fos – Série 2



*Partie 3b, comparaison et discussion, co-localisation c-Fos/ GFPm* : En comparant la distribution des cellules GFPm et celles qui co-expriment c-Fos, il y a un rapport d'environ 1 :100 avec une proportion similaire à celui de la série 1. Les données des couches du GD dorsal et ventral du **tableau 11** spécifiquement reflètent avec précision un même patron. Dans la littérature scientifique, il est écrit que seulement 1 à 5% des cellules principales dans la région hippocampique exprime la GFP. Cette particularité nous permet ainsi de distinguer les cellules d'intérêt et dans une même logique de les comptabiliser. Relevons que parmi ce pourcentage, seul 95% des cellules détectées correspondent à des cellules principales, le reste étant de type interneurones (3 % d'interneurones) ou glial (2% d'astrocytes). Nous devons rappeler que les nombres de colocalisations sont principalement dépendants du nombre de cellules actives c-Fos, et secondairement du nombre de cellules exprimant la GFP, du fait d'une quantité de cellules c-Fos inférieur à celle des cellules GFPm. En effet, plus il y a de cellules marquées c-Fos, plus nous observons de colocalisations c-Fos/ GFPm. De plus, les résultats du **tableau 11** non nuls pour les couches pyramidales, dorsales et ventrales du GD quel que soit leur valeur, et nuls pour les couches « autres » et moléculaires nous permettent de conclure que le marqueur c-Fos intéresse majoritairement les cellules dites principales des couches pyramidales et du GD (pyramidales et moléculaires respectivement).

## CONCLUSION :

Ce travail exploratoire sur l'influence du genre et du génotype (gène pour le récepteur 5HT1a) sur l'activité dans les circuits hippocampiques en réponse à un stress montre plusieurs éléments essentiels. Tout d'abord, il y a un patron particulier lié à un stimulus choisi pour le conditionnement de stress (FST), avec une augmentation d'expression du gène précoce c-Fos dans les trois divisions de l'hippocampe. Cette augmentation est principalement dans les cellules principales (de projection), avec une expression plus réduite dans les populations d'interneurones, avec peut-être une exception pour les interneurones exprimant le PV dans la région CA1. D'autre part, cette augmentation est affectée de manière distincte entre les souris WT et KO, ainsi qu'entre les souris mâles et femelles. Il y a une augmentation de l'activité en réponse au stress entre mâles WT et KO, ce qui est comparable avec les caractéristiques morphologiques ou électrophysiologiques entre ces 2 catégories de d'animaux (nombre de dendrites et plasticité synaptique (LTP)). Par contre, il n'y a pas les mêmes correspondances pour les animaux femelles qui ont des valeurs morphologiques et électrophysiologiques correspondantes aux animaux WT ♂. Par contre, l'excitabilité (mesurée en nombre de cellules c-Fos) des animaux femelles est élevé, ce qui correspondrait plus au niveau de réponse des animaux femelles dans les expériences originales de comportement de cette souris [10]. L'expression de c-Fos serait donc plus le reflet de l'activité d'un circuit que des propriétés morphologiques (exubérance dendritique) ou fonctionnelle (LTP augmentée) des neurones individuels.

Les perspectives pour compléter ce travail serait dans un premier temps augmenter les échantillons pour les mesures quantitatives statistiques. Ensuite, il faudrait tester les femelles WT vs femelles KO pour préciser les niveaux d'activité c-Fos et les comparer aux données morphologiques et électrophysiologiques décrites pour ces animaux.

## BIBLIOGRAPHIE :

- (1) Leonardo, E.D. and Hen, R. (2008) Anxiety as a developmental disorder. *Neuropsychopharmacology* 33:134-140
- (2) Gross, C. and Hen, R. (2004) The developmental origins of anxiety. *Nature Rev.Neurosci.* 5:545-552
- (3) Lemonde, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L., Hrdina, P.D., Bown, C.D., Sequiera, A., Kuswaha, N., Morris, S.J. Basak, A., Ou, X.M., Albert, P.R. (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J.Neurosci.* 23:8788-8799.
- (4) Lanzenberger, R., Wadsak, W., Spindelegger, C., Mitterhauser, M., Akimova, E., MienL.K., Fink, M. Moser, U., Savli, M., Kranz, G.S., Han, A., Kletter, K., Kasper, S. (2010) Cortisol plasma levels in social anxiety disorder patients correlate with serotonin-1A receptor binding in limbic brain regions. *Int.J.Neuropsychopharm.* 13:1129-1143.
- (5) Gordon J.A. and Hen, R. (2004) Genetic approaches to the study of anxiety. *Ann.Rev.Neurosci.* 27:193.222.
- (6) Albert, P.A. (2012) Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. *Phil.Trans.Roy.Soc.B* 367:2402-2415.
- (7) Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung,H.F., Gardier, A.M., Dranowsky, A., David, D.J., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D. (2010) 5-HT1a autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65:40-52.
- (8) Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P. Nguyen, T.H., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranowsky, A., David, D.J. Gulard, B.P., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D. (2011) Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J.Neurosci.* 31:6008-6018.
- (9) Stockmeier, C.A., Shapiro, L.A., Dilley, G.E., Kolli, T.N., Freidman, L., and Rajkowska, G. (1996) Increase in serotonin 1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J.Neurosci.* 18:7394-7401.
- (10) Brunner, D., Hen, R. (1998) Serotonin receptor 1A knock-out: an animal model of anxiety-related disorder. *PNAS* 95:14476-14481.
- (11) Bonnin, W. Peng, W. Hewlett, P. Levitt, Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during foetal and early postnatal mouse forebrain development, *Neuroscience* 141 (2006), 781-794
- (12) Patel TD, Zhou FC (2005) Ontogeny of 5-HT1a receptor in the developing hippocampus, *Developmental Brain Research* 157: 42-57
- (13) Pokorny J, Yamamoto T. (1981) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain Research Bulletin* 7(2):113-120.
- (14) Lopez-Gallardo M, C. Prada C (2001) Spatial and temporal patterns of morphogenesis of hippocampal pyramidal cells : study in the early postnatal rat, *Hippocampus* 11, 118-131
- (15) Van Riel E., Van Gemert N. G., Meijer O. C., Joëls M., (2004) Effect of early life stress on serotonin responses in the hippocampus of young adult rats, *Synapse* 53, 11-19
- (16) Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R. (2002) Serotonin 1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416:396-400.
- (17) Toni N., Beny J.-L., Muller. D. (2000) Modifications morphologiques associées à la plasticité synaptique.
- (18) Emmenegger M., Hornung, J.-P. (2014) Influence of 5-HT1a receptor on the mouse limbic system: studying immediate early gene activation and neuromorphology in the hippocampus and the basolateral amygdala. *Travail de stage en biologie, Université de Zurich.*

- (19) Amaral, D; Lavenex P (2006) Hippocampal Neuroanatomy. Chapter 3, in Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- (20) Andersen, P; Bliss TVP; Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* 13 (2): 222–238.
- (21) Andersen, P; Soleng AF; Raastad M (2000) The hippocampal lamella hypothesis revisited. *Brain Res.* 886 (1–2): 165–171.
- (22) Knowles, WD; Schwartzkroin, PA (1981) Axonal ramifications of hippocampal CA1 pyramidal cells. *The Journal of neuroscience* 1 (11): 1236–41.
- (23) Andersen, Per; et al. (2007) *The Hippocampus Book*. Oxford University Press.
- (24) M. F. Bear, B. W. Connors, M. Paradiso (1997) *Neuroscience à la découverte du cerveau, Traduction et adaptation française André Nieoullon, Editions Pradel.*
- (25) Schwaller B., Meyer M., Schiffmann S. (2012) New functions for 'old' proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. *Studies with knockout mice. The Cerebellum* 1(4) : 241-258.
- (26) Cates MS, Berry MB, Ho EL, Li Q, Potter JD, Phillips GN (October 1999) Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. *Structure* 7 (10): 1269–78.
- (27) Klausberger T, Marton LF, O'Neill J., Huck, JH, Dalezios, Y, Fuentealba, P, Suen, WY, Papp, E, Kaneko, T, Watanabe, M., Csicsvari, J, Somogyi, P. (2005) Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations. *J. Neurosci.* 25(42): 97829793.
- (28) Abrahám H, Veszprémi B, Kravják A, Kovács K, Gömöri E, Seress L (2009) Ontogeny of calbindin immunoreactivity in the human hippocampal formation with a special emphasis on granule cells of the dentate gyrus. *Int J Dev Neuroscience*, 27(2):11527.
- (29) Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280(2):183-96.
- (30) Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-Fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods* 29: 261–265.
- (31) Sheng, M, Greenberg ME (1990) The regulation and function of c-Fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, volume 4, Issue 4, pages 477-485.
- (32) Van Elzaker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL (2008) Environmental novelty is associated with a selective increase in c-Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Memory* (12): 899–908.
- (33) Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-Fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* Vol. 240 no. 4857 pp. 1328-1331.
- (34) Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* 67: 509–44.
- (35) Chalfie M. (2009) GFP: Lighting up life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106 (25): 10073–10080.
- (36) Olesya V. Stepanenko, Vladislav V. Verkhusha, Irina M. Kuznetsova, Vladimir N. Uversky and K.K. Turoverov (2008) Fluorescent Proteins as Biomarkers and Biosensors: Throwing Color Lights on Molecular and Cellular Processes. *Curr Protein Pept Sci.* 9(4): 338–369.
- (37) Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews* 90 (3): 1103–63.
- (38) Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen OT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, and Sanes JO (2000) Imaging Neuronal Subsets Neurotechnique in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP variants. *Neuron* 28:41–5.

## **REMERCIEMENTS :**

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hornung pour son aide, son soutien et sa disponibilité. J'ai pu en effet grâce à lui réaliser cette étude dans des excellentes conditions, ce qui m'a valu d'acquérir une multitude de connaissances dans le domaine des sciences fondamentales, et des neurosciences plus précisément. Je tiens également à remercier tous les membres de son équipe, Monsieur Alexandre Pinault et Madame Christine Fülling pour le temps qu'ils m'ont consacré pour des explications et démonstrations. Et finalement, je remercie également toutes les personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans la réalisation de cette étude, le Département des neurosciences fondamentales de Lausanne ainsi que pour le matériel et locaux mis à ma disposition.