

MODELES INTEGRES

MASTER 1

Mme Vilpoux

21 janvier 2019

Technique de localisation de protéines dans le SNC

Quantification de ces protéines

- Localisation de récepteurs, de transporteur, d'enzymes, de facteurs de transcription...
- **Localisation** dans les régions cérébrales
- **Quantification:** méthodes quantitatives et semi quantitatives
- **Comparaison** de différents niveaux d'expression
- Exemples:
 - Liaison sur membranes
 - Autoradiographie sur coupes de cerveaux
 - (Hybridation in situ)
 - Immunohistochimie

Etudes des relations ligands récepteurs

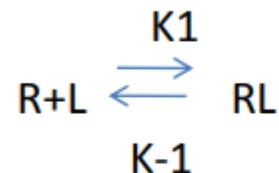
Objectif: déterminer la capacité de liaison du ligand pour son récepteur: c'est l'affinité ou K_D (unité: Molaire)
Elle est caractérisée par la concentration de ligands occupant 50% de ces récepteurs

Moyen: Liaison sur membranes= liaison sur un homogénat de tissu obtenu dans une région du cerveaux, dans le cerveau entier, sur le foie, le pancréas...etc

2 méthodes pour déterminer cette affinité:

Méthodes de saturation

Méthodes de déplacement



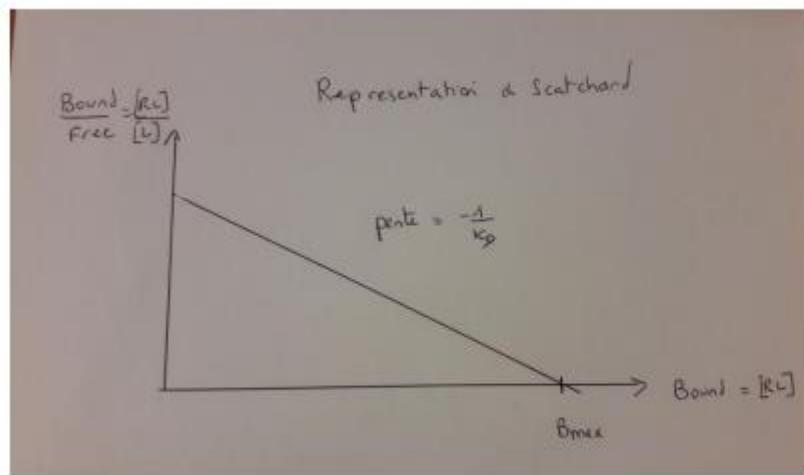
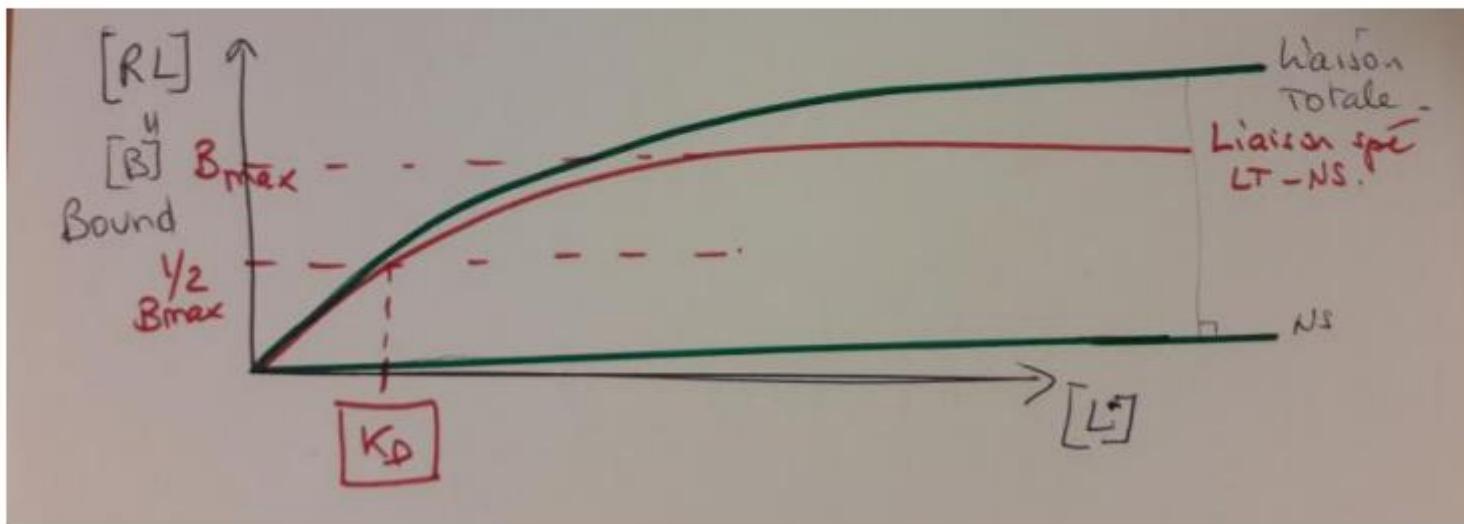
L= ligand

R = récepteur libre

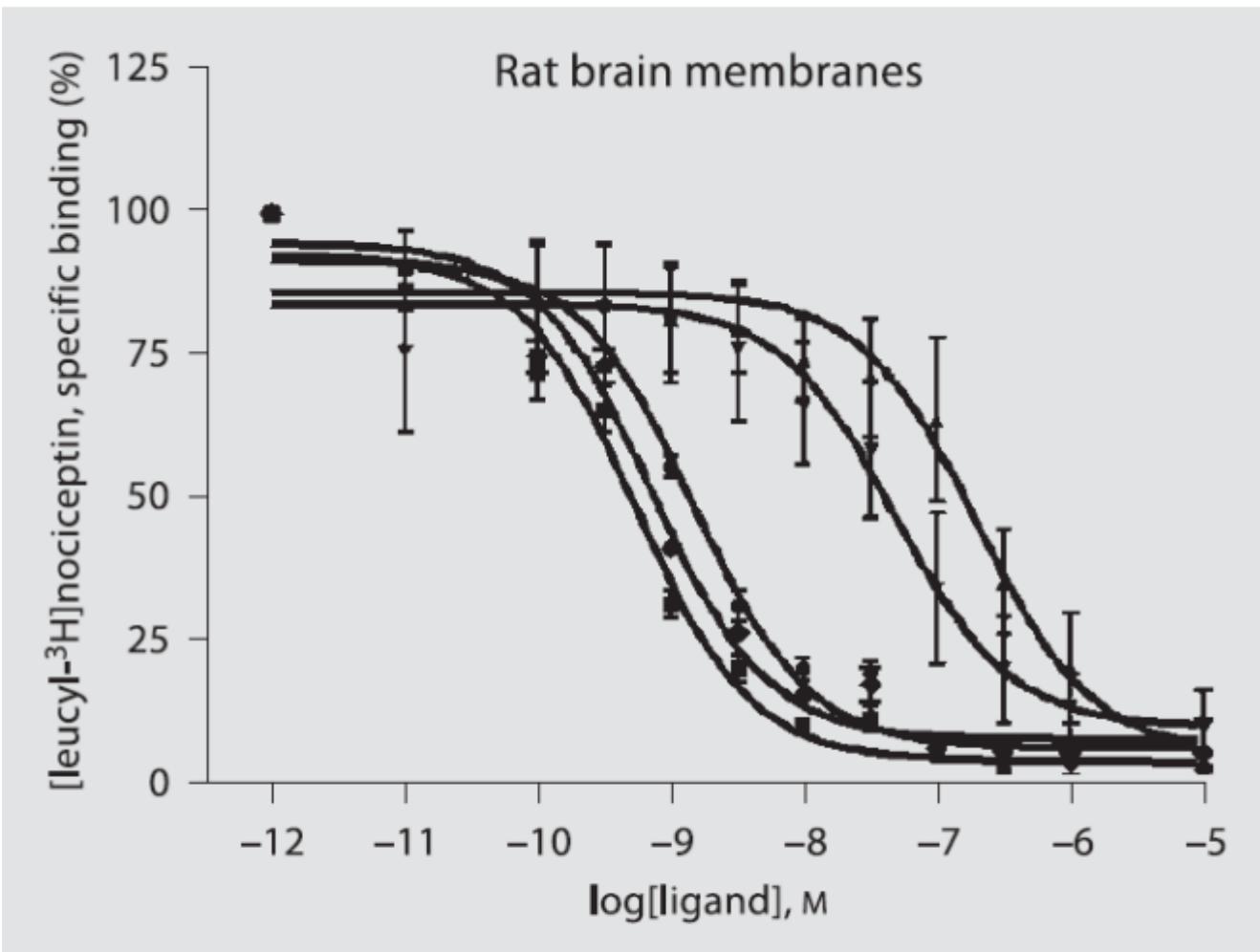
LR= complexe ligand / récepteur

A l'équilibre $K-1/K+1 = K_d$

Méthodes de saturation K_D et B_{max}



Méthodes de déplacement



- N/OFQ
- ◆ Ac-RYYRIK-ol
- Ac-RYYRIK-NH₂
- ▼ Ac-RYY-Cit-IK-ol
- ▲ Ac-RYY-Cit-IK-NH₂

Des chercheurs ont publié en 2006 une étude sur de nouveaux ligands d'un récepteur, le récepteur NOP de la nociceptine. La figure et la table ci-dessous montrent les propriétés de liaison de ces nouveaux ligands.

Déterminez graphiquement la concentration inhibitrice 50 du peptide Ac-RYYRIK-ol

Fig. 1. Equilibrium competition binding with [³H]N/OFQ ($\sim 0.05 \text{ nM}$) incubated in the presence of the hexapeptides (10^{-5} to 10^{-11} M) for 1 h at 24°C with gentle shaking. Displacement curves for C-terminally modified and Arg/Cit replaced ligands on native NOP receptors of rat brain membranes. Points represent the means \pm SEM of at least 3 different experiments each performed in duplicate.

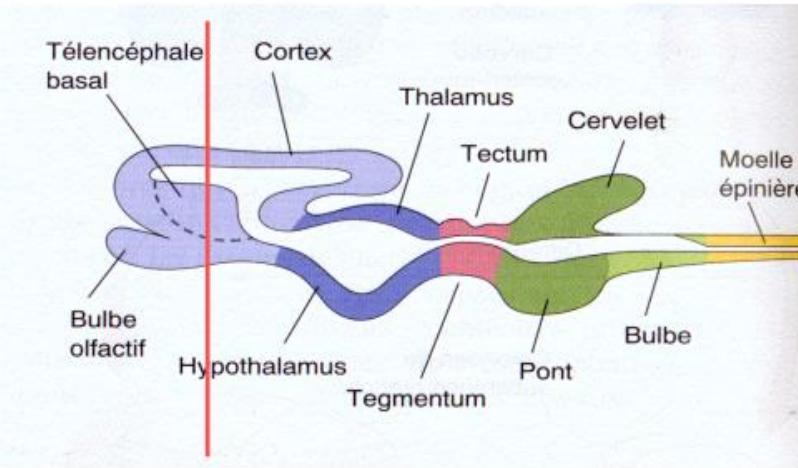
D'après vous, le peptide Ac-RYY-Cit-IK-NH₂ a-t-il plus d'affinité pour le récepteur NOP que le peptide Ac-RYYRIK-ol? Quelle est la constante d'inhibition Ki de ce peptide ?

Table 1. Displacement binding data of the hexapeptides in membranes from rat brain

Peptides	pK _i ± SEM	
	rat brain	CHO _{hNOP}
N/OFQ	9.29 ± 0.06	9.20 ± 0.06
N/OFQ(1-13)NH ₂	9.37 ± 0.07	9.71 ± 0.09
Ac-RYYRIK-NH ₂ 'parent compound'	8.80 ± 0.04	9.16 ± 0.04
Ac-RYYRIK-ol	9.10 ± 0.04	9.39 ± 0.06
Ac-Cit-YY-Cit-IK-NH ₂	<5	<5
Ac-Cit-YYRIK-NH ₂	<5	<5
Ac-RYY-Cit-IK-NH ₂	6.63 ± 0.2	6.32 ± 0.12
Ac-Cit-YY-Cit-IK-ol	<5	<5
Ac-Cit-YYRIK-ol	<5	<5
Ac-RYY-Cit-IK-ol	7.30 ± 0.13	7.39 ± 0.15
ClAc-RYYRIK-ol	8.35 ± 0.29	8.86 ± 0.08
Bz-RYYRIK-ol	7.43 ± 0.26	7.78 ± 0.23
For-RYYRIK-ol	8.00 ± 0.11	7.93 ± 0.17
Piv-RYYRIK-ol	7.63 ± 0.31	7.52 ± 0.12
H-RYYRIK-ol	6.39 ± 0.06	6.81 ± 0.05
Ms-RYYRIK-ol	6.78 ± 0.13	6.80 ± 0.18

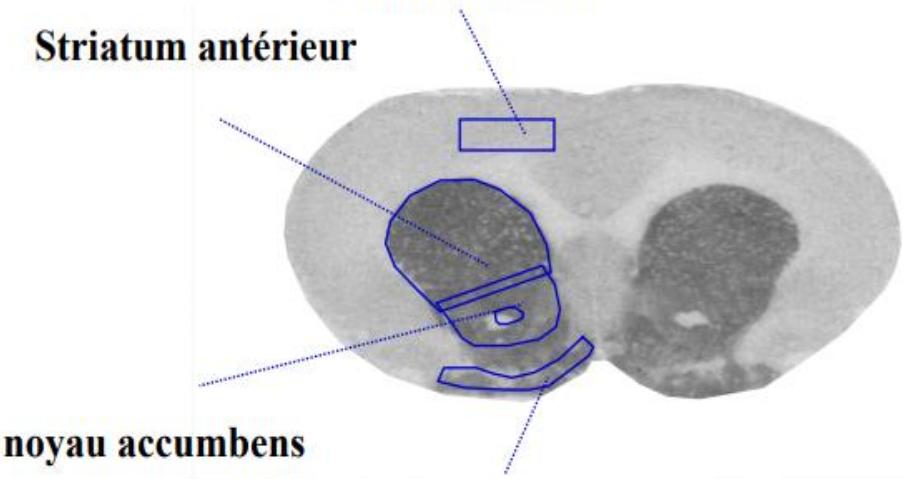
Autoradiographie sur coupes de cerveaux

Liaison de la ^{3}H -TBZOH dans le cerveau de Rat

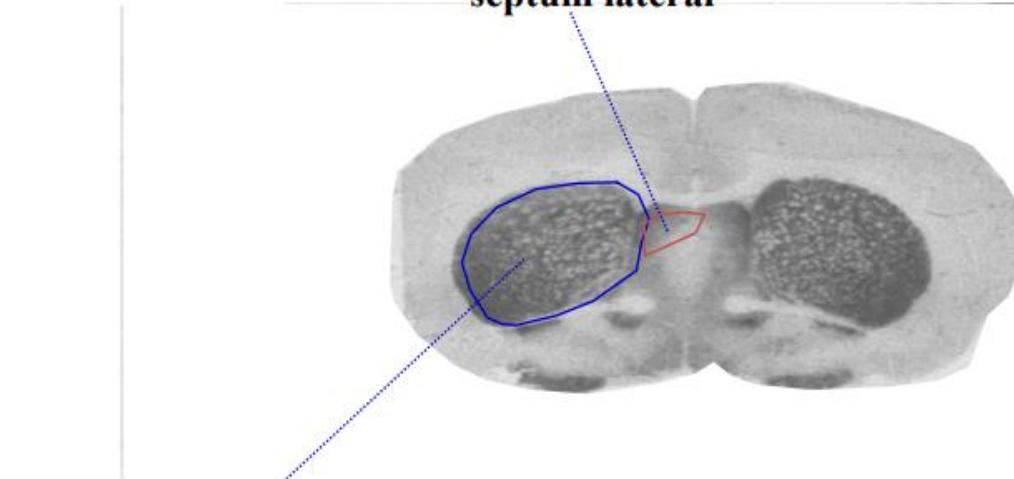


cortex frontal

Striatum antérieur



septum latéral



Striatum antérieur

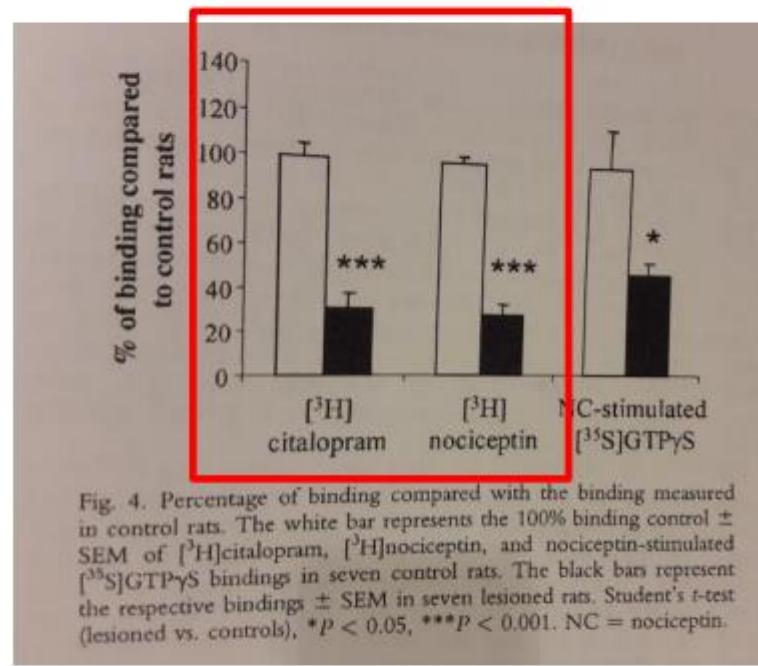


Fig. 4. Percentage of binding compared with the binding measured in control rats. The white bar represents the 100% binding control \pm SEM of $[^3\text{H}]$ citalopram, $[^3\text{H}]$ nociceptin, and nociceptin-stimulated $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S bindings in seven control rats. The black bar represent the respective bindings \pm SEM in seven lesioned rats. Student's *t*-test (lesioned vs. controls), **P* < 0.05, ****P* < 0.001. NC = nociceptin.

Opioid receptor-like 1 (NOP) receptors in the rat dorsal raphe nucleus: Evidence for localization on serotonergic neurons and functional adaptation after 5,7-dihydroxytryptamine lesion

[Le Maître et al., 2005 J Neurosci Res.](#) 2005 Aug 15;81(4):488-96. doi: 10.1002/jnr.20571.



Immuno histochimie sur coupes de cerveaux

- Localisation
- Co localisation
- Régulation de l'expression

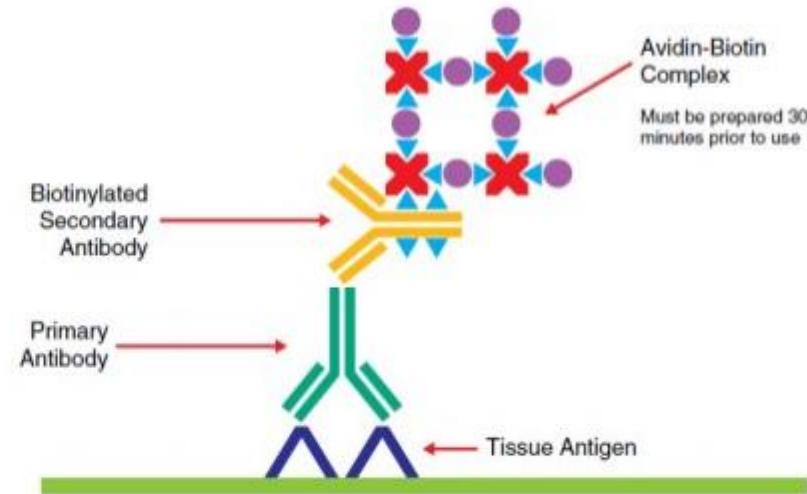


FIGURE W – SCHEMATIC REPRESENTATION OF ABC METHOD (KEY ET AL, 2009)

Figure n°1 : Technique immunohistochimique chromogénique à la DAB

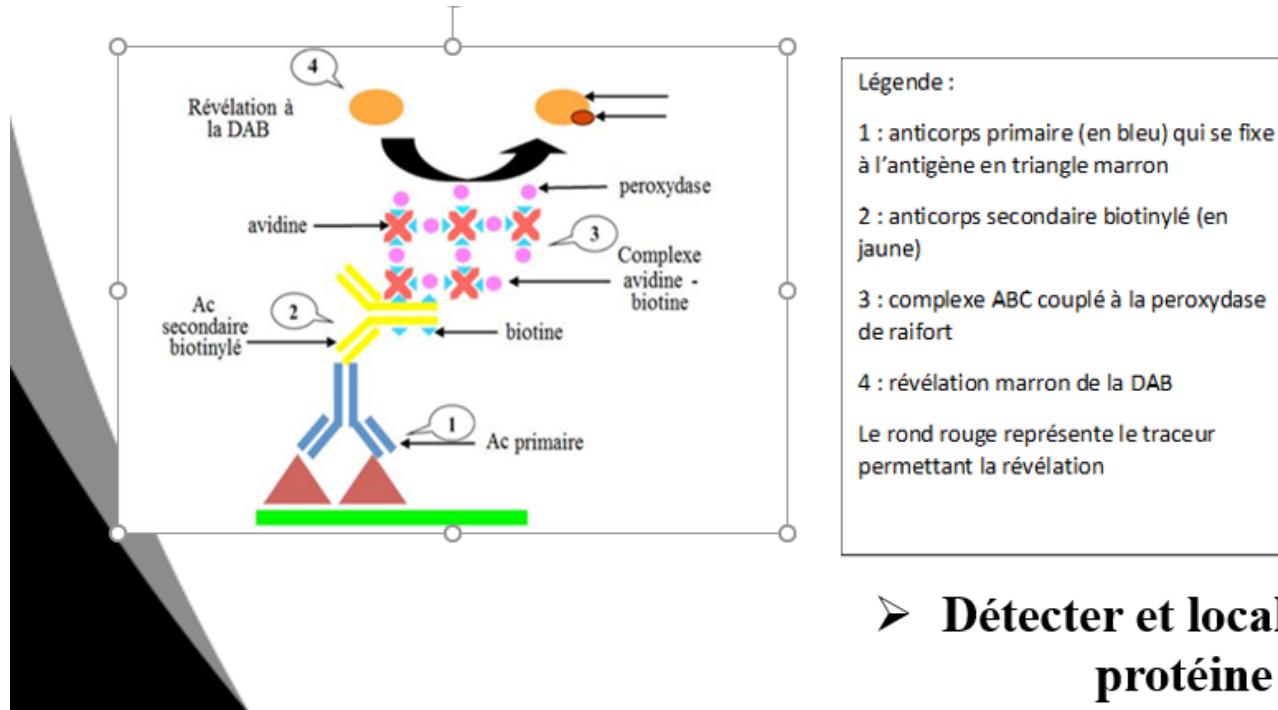
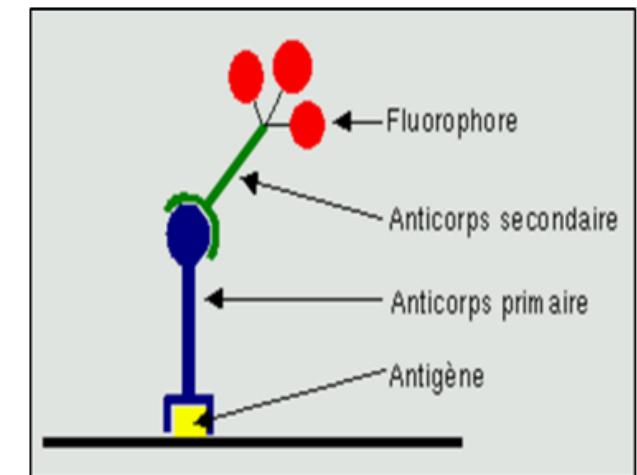


Figure n°2 : Technique d'immunofluorescence Co-Marquage Vim/GFAP

Méthode indirect; Grâce à un fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire.



➤ Déetecter et localiser spécifiquement une protéine dans une cellule.

Quantification microscopique & Analyse d'image

Observation de l'immunomarquage DAB au microscope optique connecté à une caméra.

Comptages des cellules à l'aide du logiciel d'analyse d'image Mercator®.

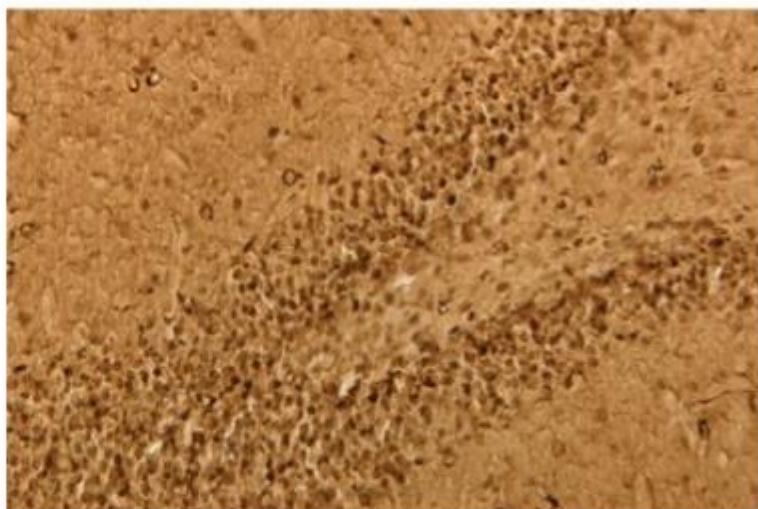


Photo n°3 : Rat témoins, Gyrus Denté,
marquage ac anti-HMGB1

Observation de l'immunofluorescence réalisé au microscope confocal Zeiss LSM 170
Analyse d'image avec le logiciel « ImageJ ».

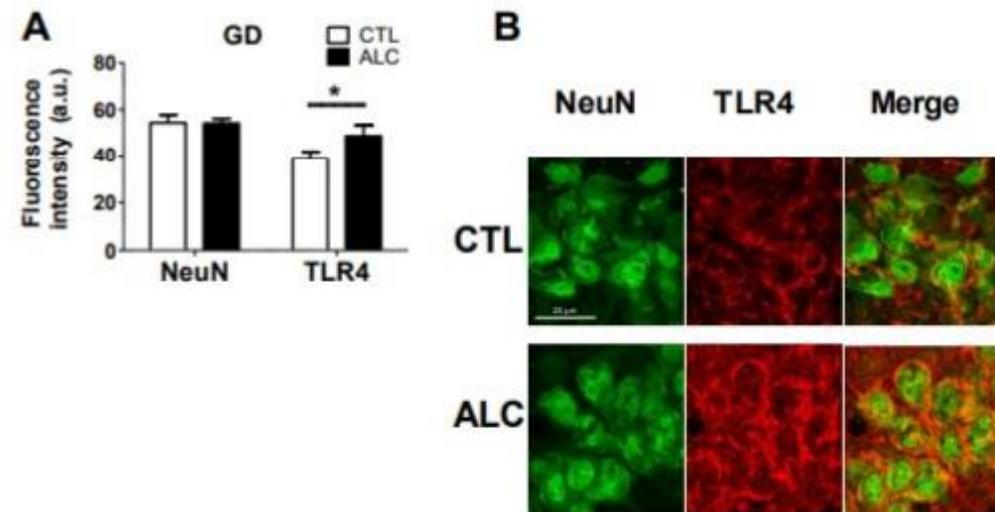


Photo n°4 : Rat alcoolisé, CA1, co-marquage NeuN/ TLR4

Iba1 rats adolescents

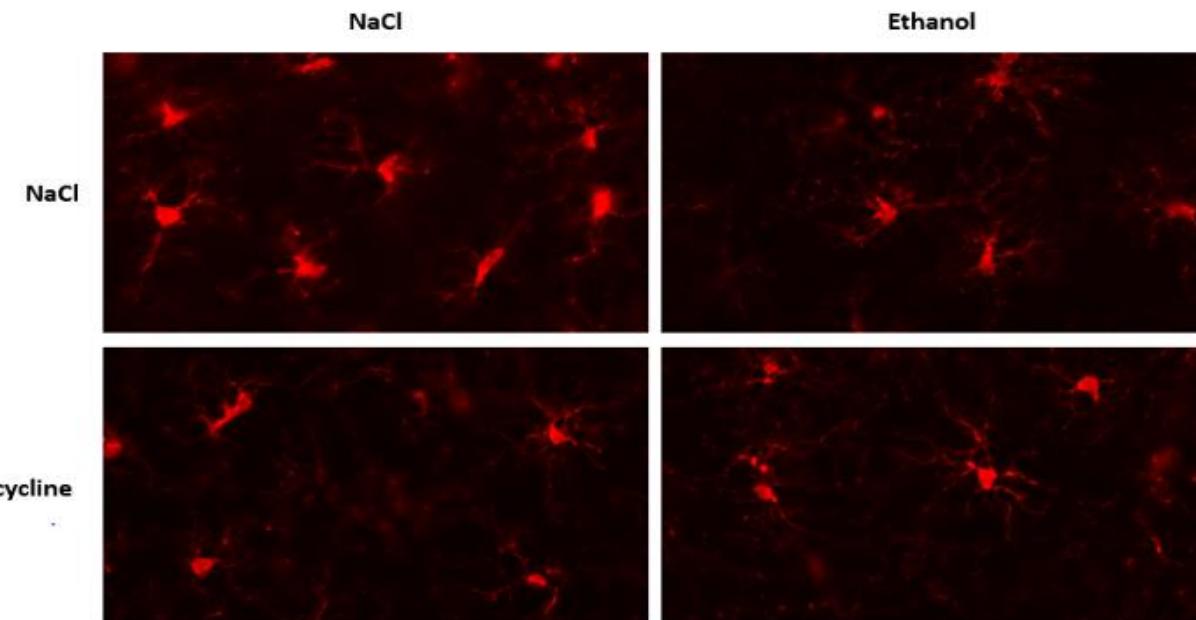


Figure 8 : Photographies illustrant les 4 groupes de l'expérience sur les rats adolescents marqués avec Iba1

CD68

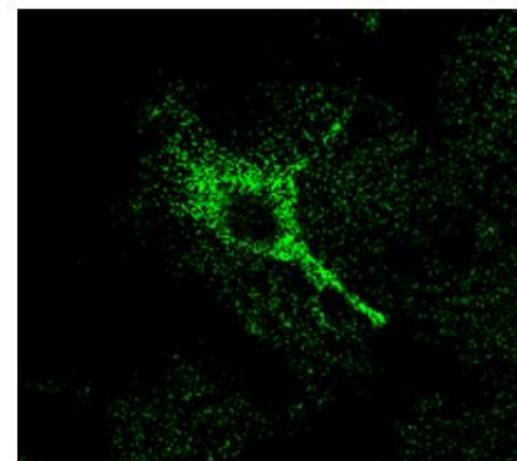


Figure 9 : Photographie illustrant le marquage CD68 effectué au 1/50^{ème}

Mise au point de l'analyse de la microglie chez les Iba1 juvéniles

4 critères sélectionnés:

- L'intensité de la microglie
- La taille du corps cellulaire
- L'intensité du corps cellulaire
- La circularité du corps cellulaire

(significatif mais très léger car augmentation de 13% → peu intense)

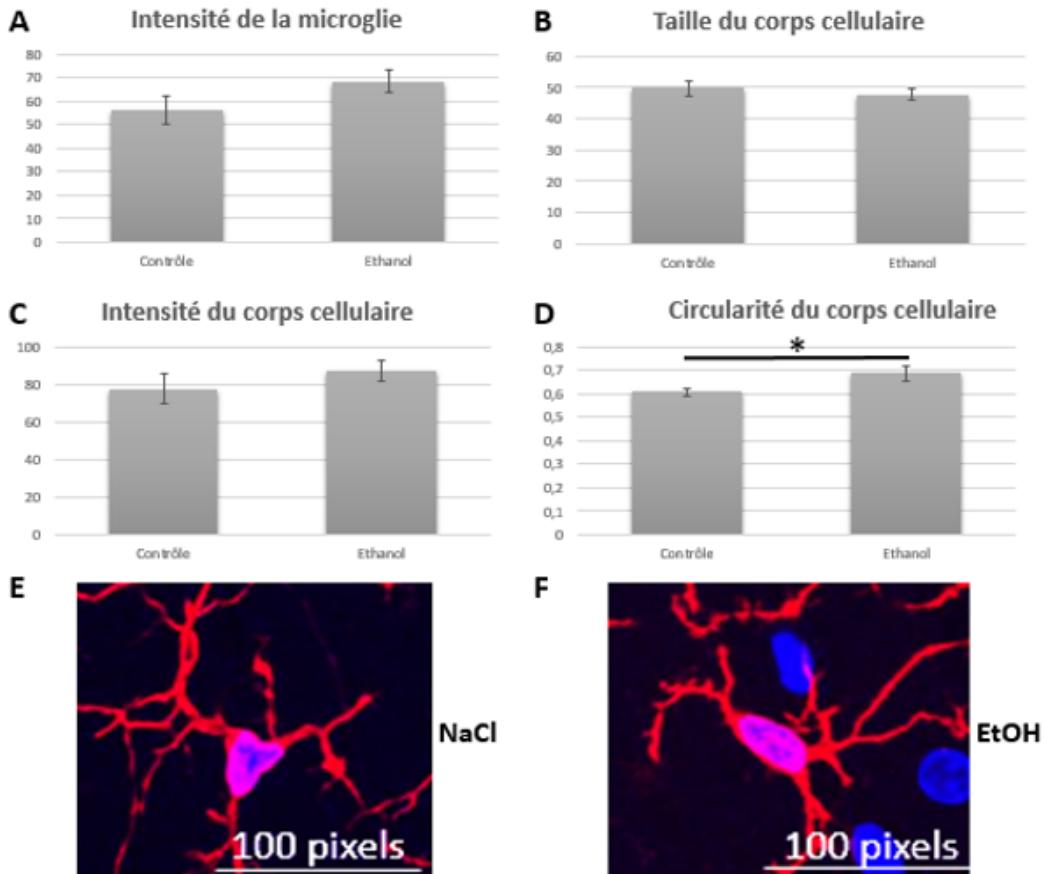


Figure 7 : Marquage de la protéine Iba1 chez les rats juvéniles exposés au protocole de binge drinking

Exemple de stratégie de recherche visant à déterminer les régions cérébrales impliquées dans l'addiction:

L'étude de l'expression des Immediate Early genes

Introduction

IEG: qu'est-ce que c'est?

IEG index d'activité neuronale

IEGs sont induit en réponse à l'administration de substances addictives

IEGs permettent de réaliser des cartographies

Etude des IEG: stratégie très utilisée en neurobiologie depuis début 90'

Introduction

IEG: qu'est-ce que c'est?

- Immediate
- Early
- Inducible Transcription factor

c-Fos
NGFIA

Régions cérébrales activées après traitement aigu d'éthanol

Induction de c-Fos (astérix : induction de NGFIA)

Régions télencéphaliques :

Neocortex:

orbital Cortex

insular Cortex

parietal Cortex

temporal cortex

Frontal cortex*

Autres régions télencephaliques

Striatum (Ny caudé et putamen) *

Lateral septum, Ventral

Bed nucleus of the stria terminalis

Nucleus accumbens core and shell

Globus pallidus

central nucleus of amygdala*

medial amygdala

Régions diencéphaliques:

Paraventricular thalamus

paraventricular hypothalamic nucleus*

parabrachial nucleus

Régions mésencéphaliques

Ventral Tegmentum area ,

substantia nigra *pars compacta, pars reticulate*

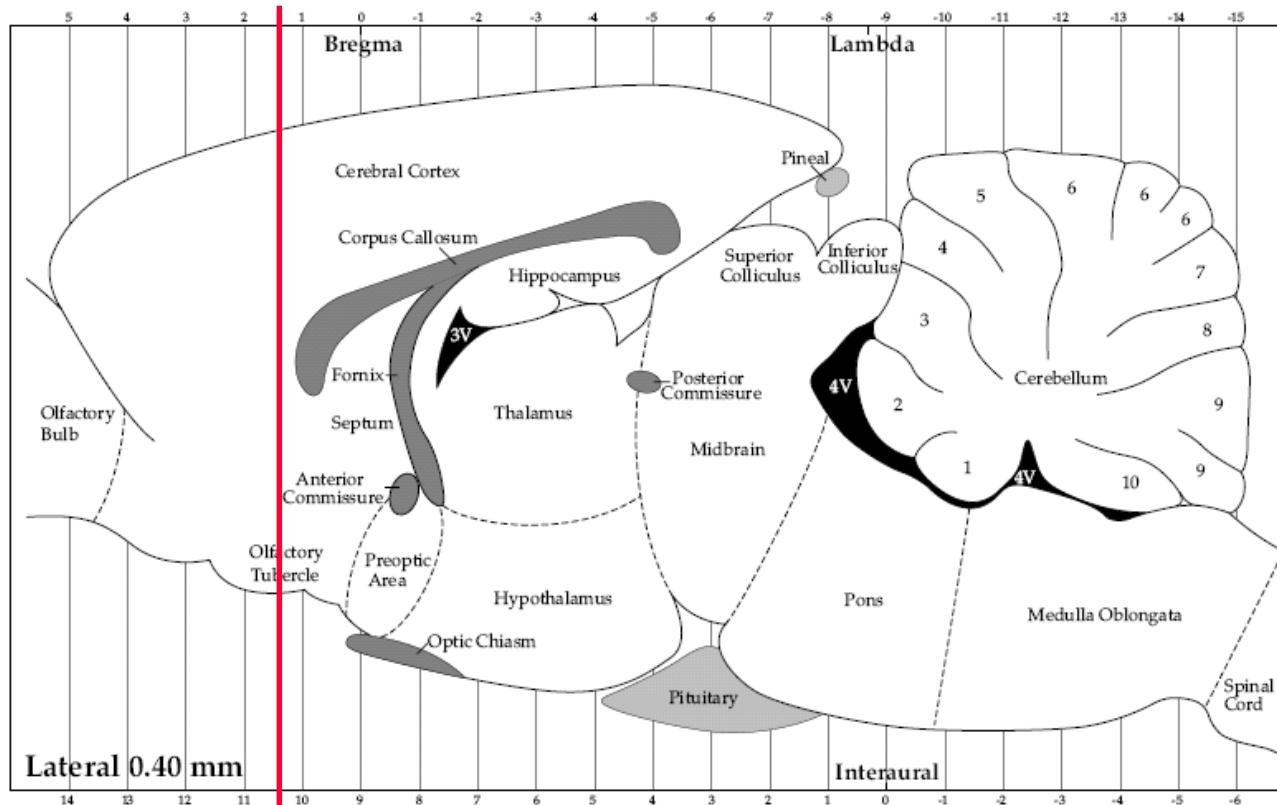
Tronc cérébral

- Edinger-Westphal Nucleus

- locus coeruleus nucleus

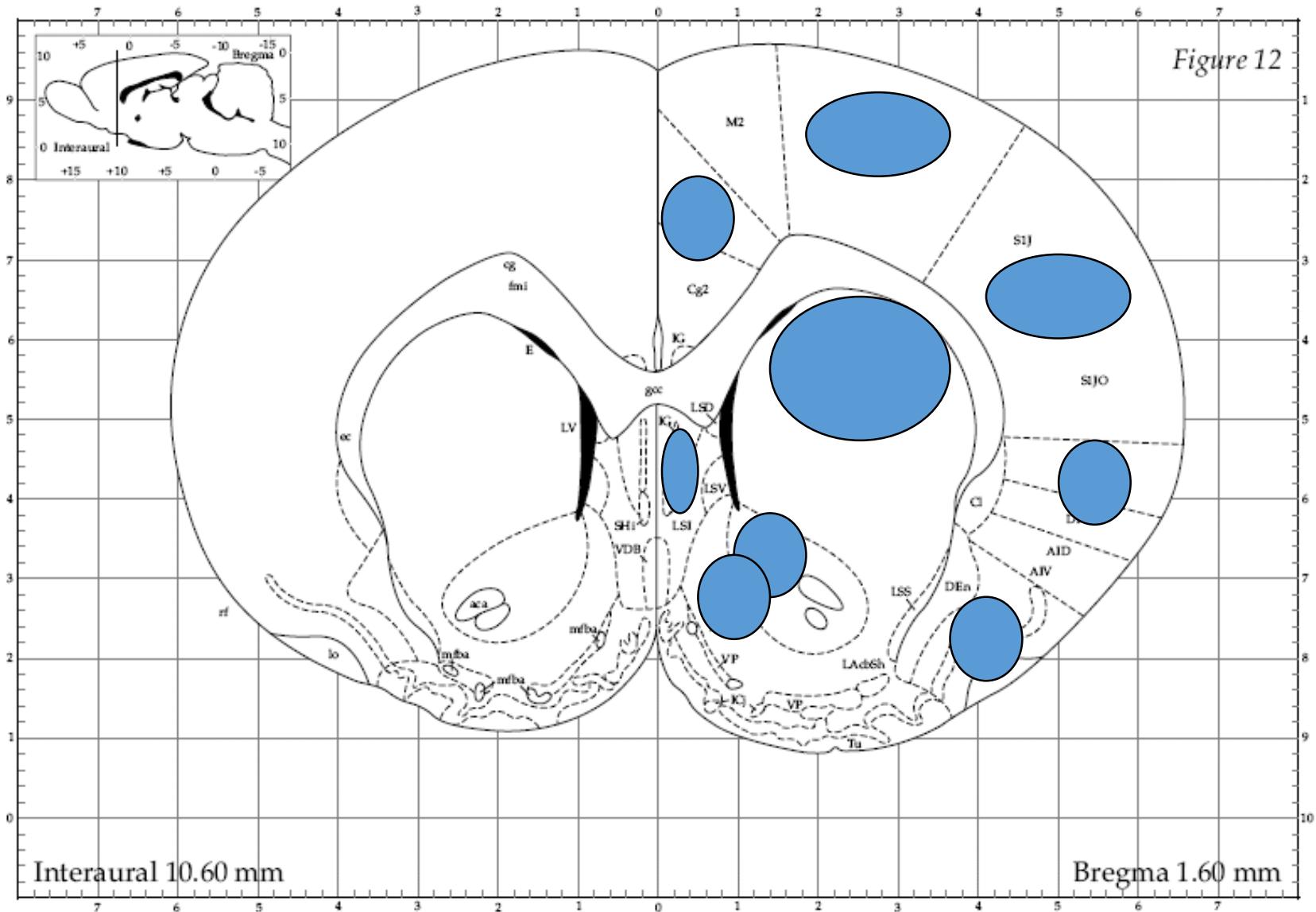
nucleus of the solitary tract

Localisation



Cortex cingule
Cortex moteur
Noyau accumbens
1.60 mm

Figure 12



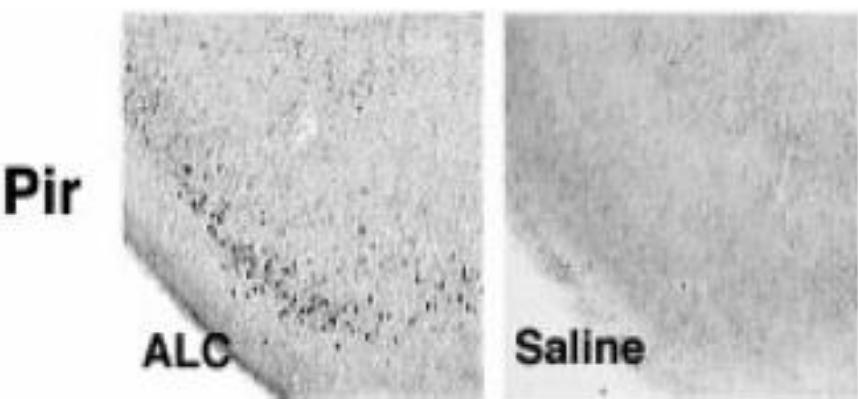


Fig. 1. Photograph showing representative samples of c-Fos immunostaining from Experiment 1. Note that both the ALC and 0.5 NA groups show robust expression of c-Fos in these regions, while Saline treatment produced no alterations. The 0.5 NIC group shows a modest increase in c-Fos in the CeC/CeL and PV, but none in the Pir.

Bachtell et Ryabinin 2001

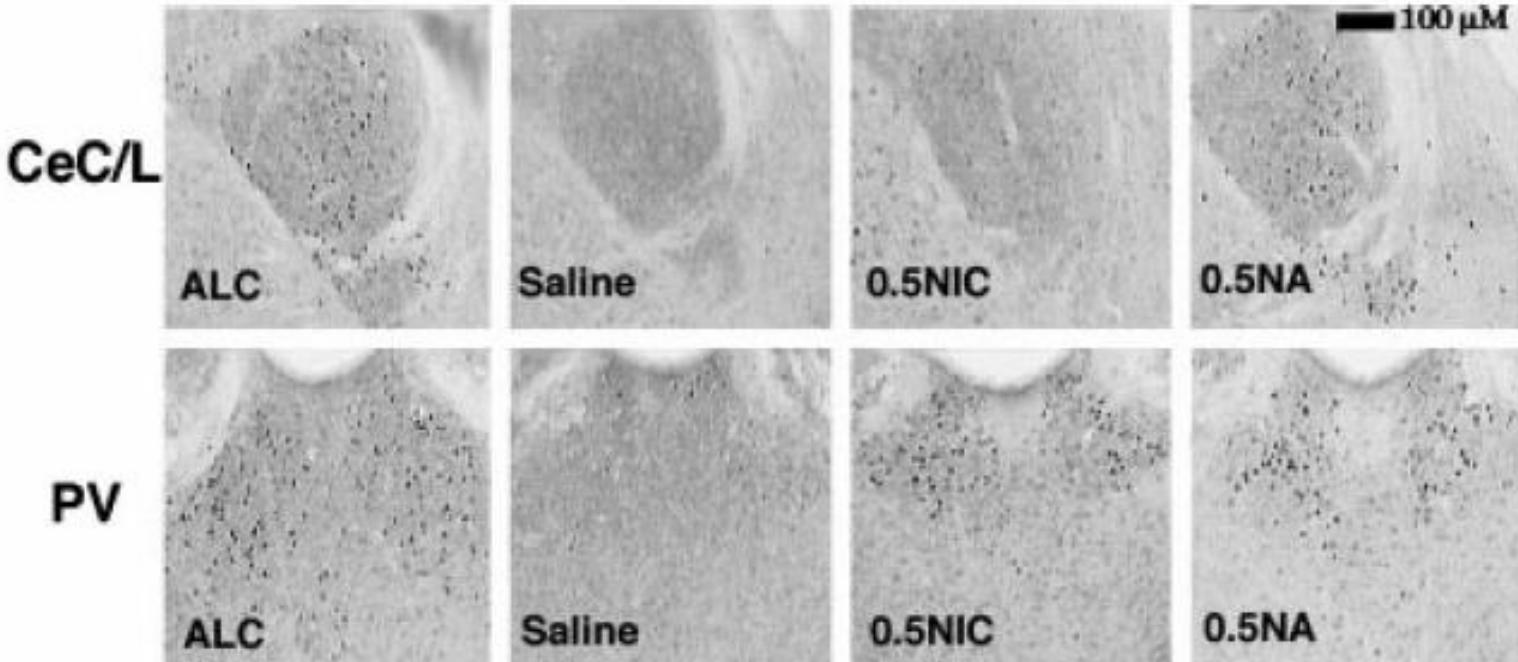


Fig. 1. Photograph showing representative samples of c-Fos immunostaining from Experiment 1. Note that both the ALC and 0.5 NA groups show robust expression of c-Fos in these regions, while Saline treatment produced no alterations. The 0.5 NIC group shows a modest increase in c-Fos in the CeC/CeL and PV, but none in the Pir.

Bachtell et Ryabinin 2001

Central nucleus of the amygdala

Induction de c-Fos

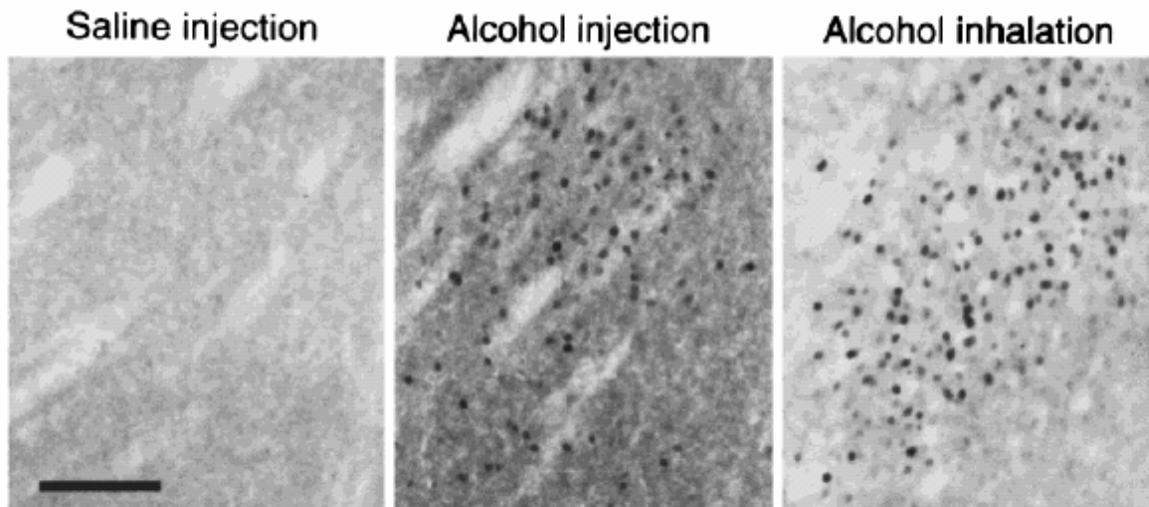


Figure 3 Alcohol induces c-Fos expression in the central nucleus of amygdala. Note the large number of c-Fos-positive cells in animals injected with 1.5 g kg^{-1} of ethanol (middle panel) and animals administered ethanol via inhalation (right panel). Scale bar indicates $100 \mu\text{m}$.

Noyau hypothalamique paraventriculaire

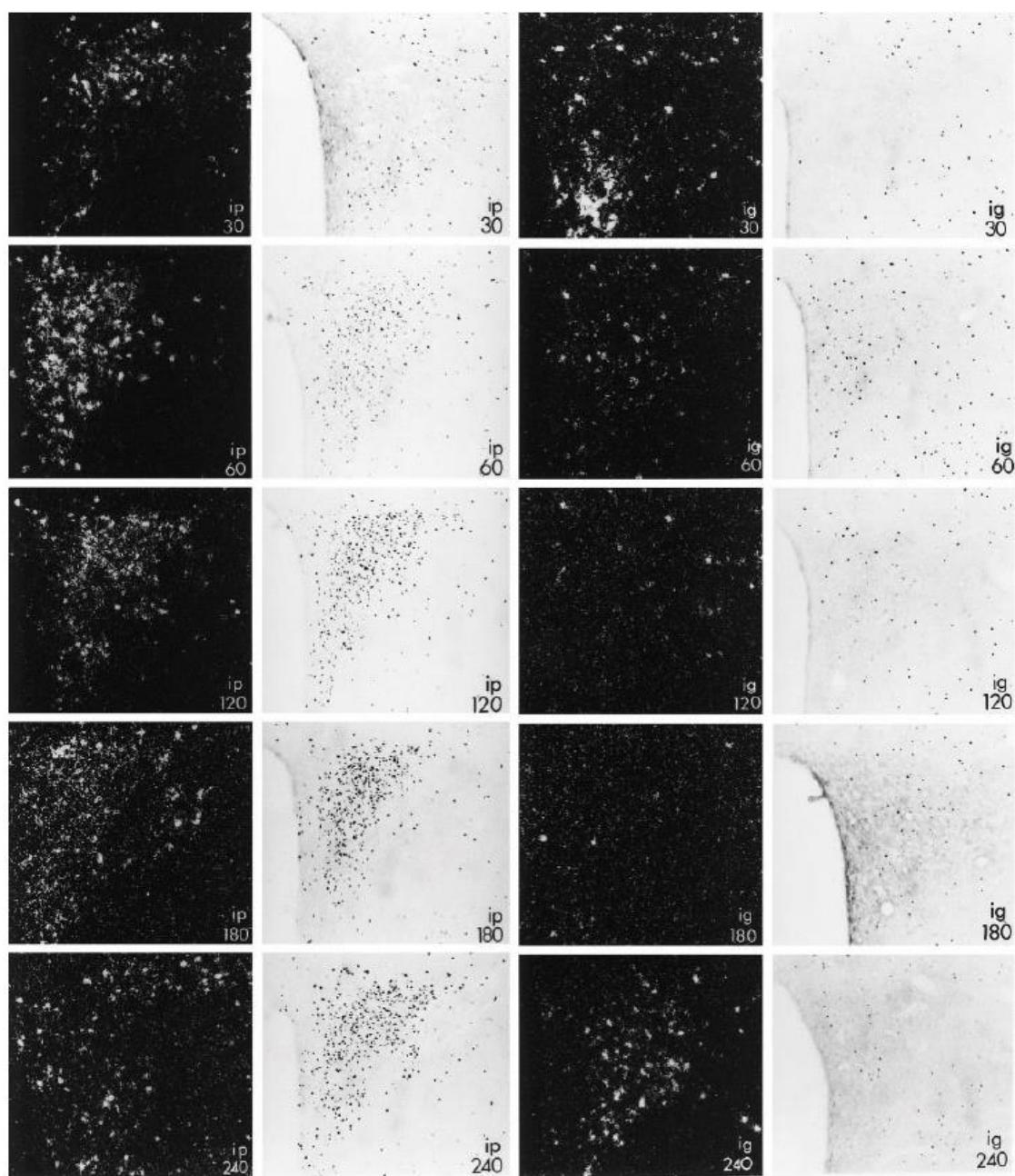


Figure 1. Expression of *c-fos* mRNA (dark-field photomicrographs) and Fos protein (bright-field photomicrographs) in the paraventricular nucleus of male rats injected with alcohol intraperitoneally (*left panels, ip*) or intragastrically (*right panels, ig*) at the times indicated (in minutes). Note that in contrast to the robust activation in response to the drug administered intraperitoneally, rats that received alcohol into the stomach had only small elevations in *c-fos* mRNA (at 30 and 240 min) and expressed Fos protein only in scattered cells (at 60 min). Magnification, 145 \times .

Ogilvie et al., 1998

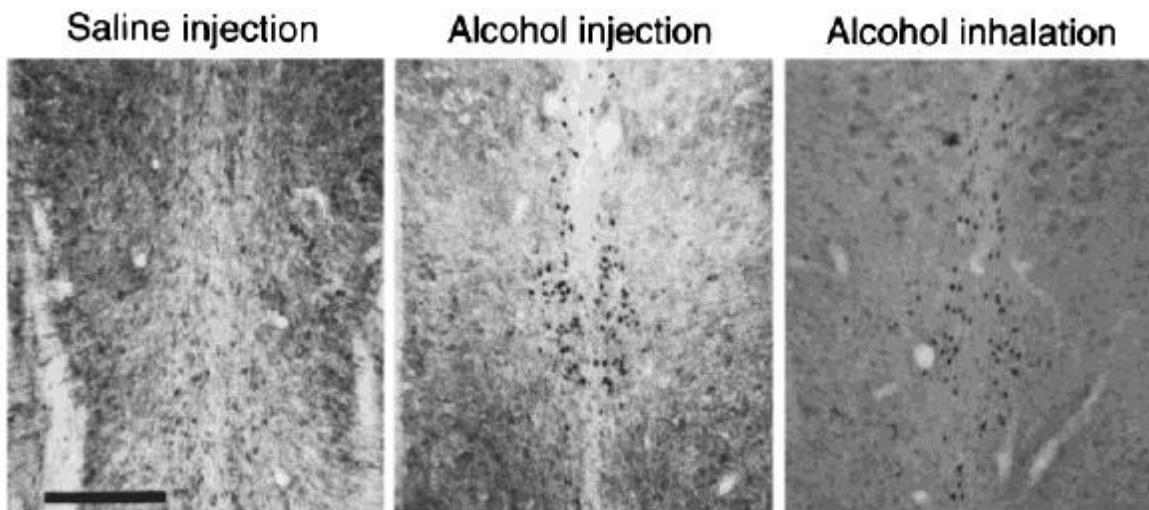


Figure 4 Alcohol induces c-Fos expression in the Edinger-Westphal nucleus. Note the large number of c-Fos-positive cells in animals injected with 1.5 g kg^{-1} of ethanol (middle panel) and animals administered ethanol via inhalation (right panel). Scale bar indicates $200 \mu\text{m}$.

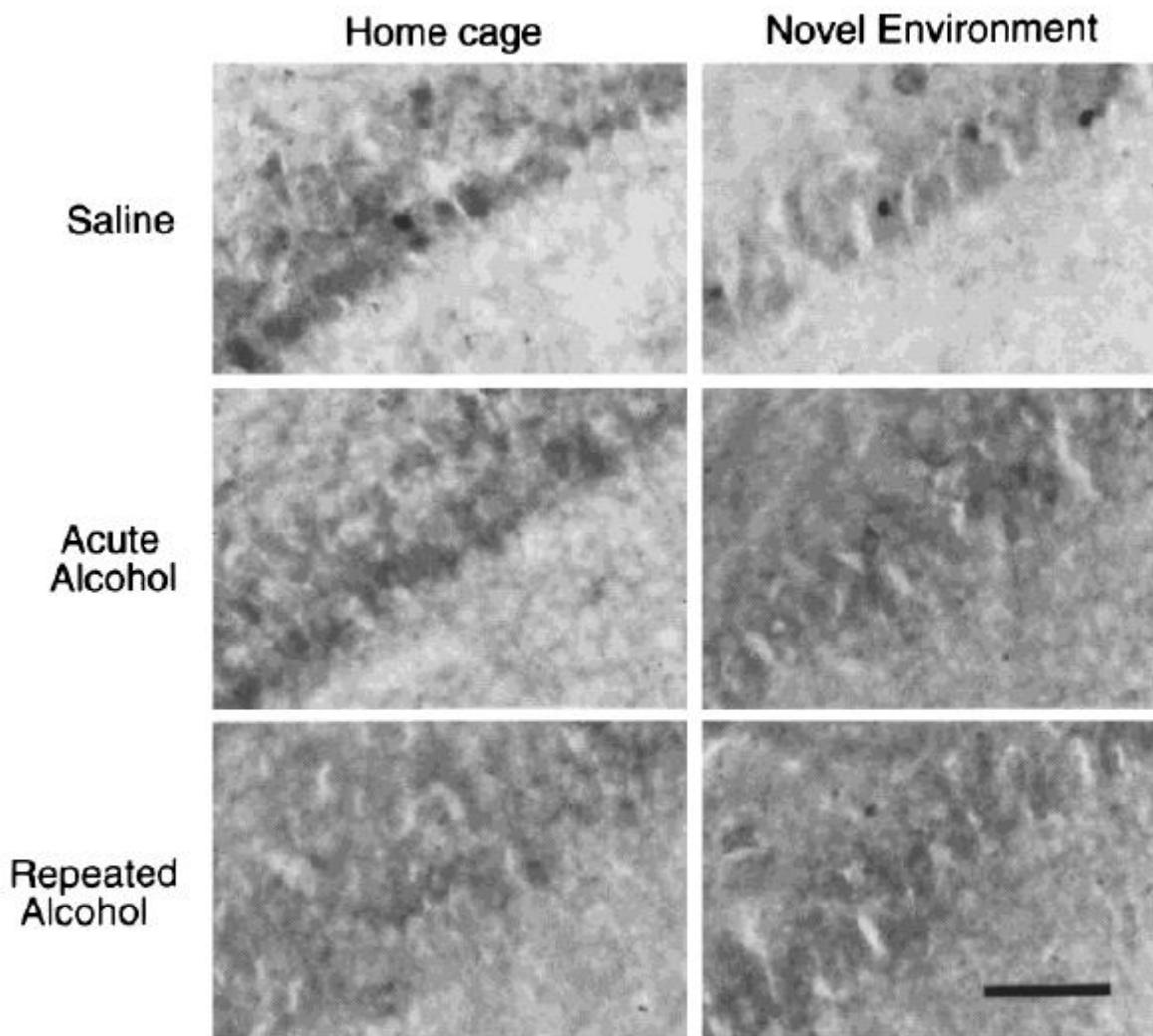
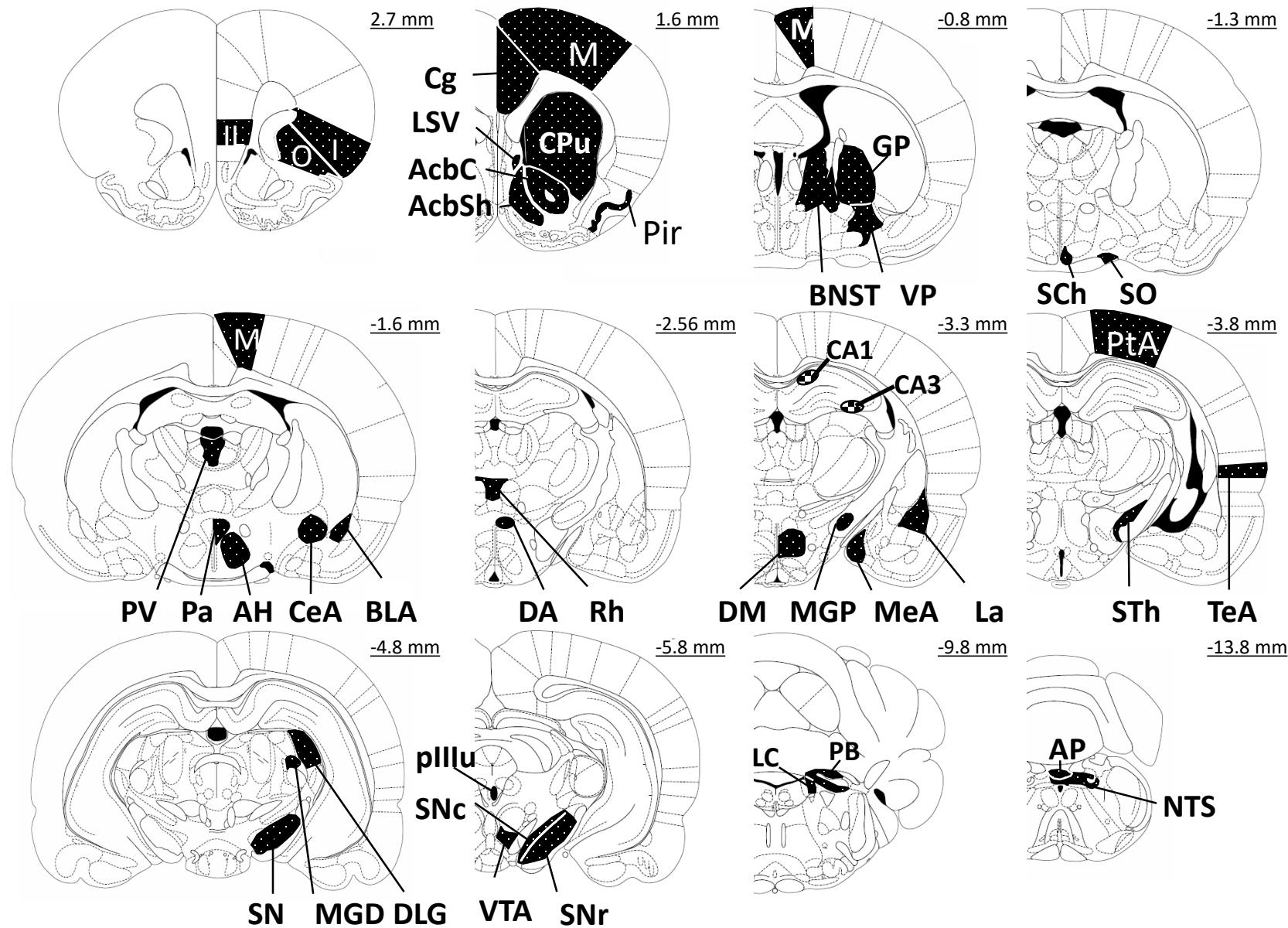


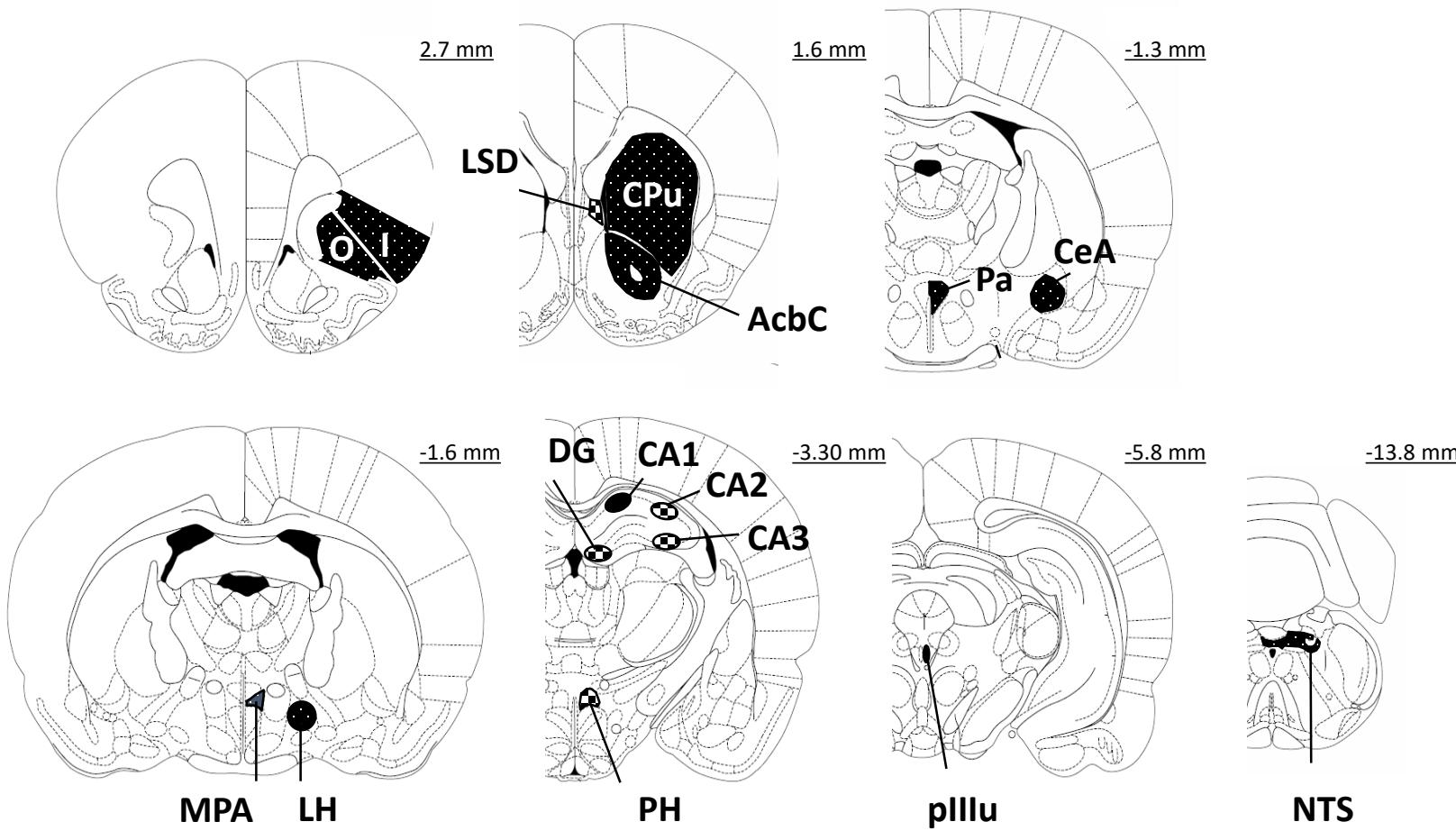
Figure 1 Administration of alcohol (1.5 g kg^{-1}) leads to suppression of c-Fos expression in the CA1 region of rat hippocampus. Note the presence of c-Fos-positive cells in saline-injected animals (dark nuclear staining in two upper panels), and the absence of c-Fos-positive cells in alcohol-pretreated animals (middle and lower panels). Scale bar indicates $50 \mu\text{m}$.

Differential sensitivity of c-Fos expression in hippocampus and other brain regions to moderate and low doses of alcohol AE Ryabinin^{1,2}, JR Criado¹, SJ Henriksen¹, FE Bloom¹ and MC Wilson^{1,3}
Molecular Psychiatry (1997) 2, 32–43

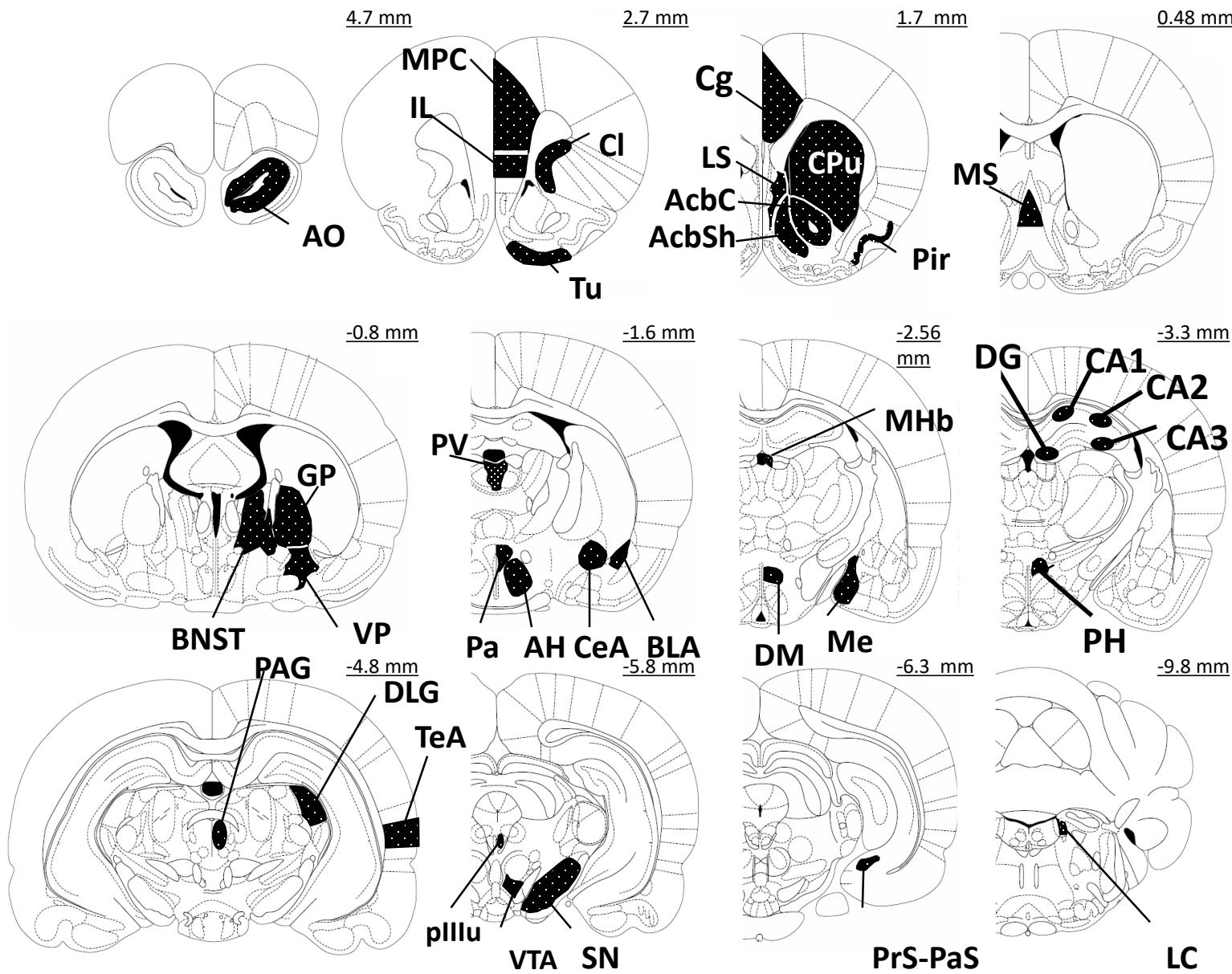
Expression c-FOS en réponse à l'alcool aigu



Expression c-FOS en réponse à l'alcool chronique



Expression c-FOS en réponse au sevrage



Bilan

On a vu l'apport de la stratégie de recherche des IEGs activées après traitement par l'alcool.

Il reste plusieurs questions:

- Quels sont les rôles de ces régions?
- Sont-elle interconnectées, par quelles projections?
Quelles sont les voies afférentes à ces régions et le neurotransmetteur impliqué?
- Quels sont les neurotransmetteurs synthétisés dans ces régions?
- Ces régions forment-elle toute ensemble un circuit fonctionnant en réponse à un stimulus addictif?

Central nucleus of the amygdala (travaux de Ryabinin et coll.)

- induction dans neurones GABA/enképhalin
- l'activation de cette région disparaît si l'animal est anesthésié lors du traitement aigu: la conscience du stimulus est nécessaire pour l'activation de cette région
- région activée lors de tous les mécanismes de peur apprise, et lors de l'anxiété
- région reliée fonctionnellement au BNST
- afférences NA et DA

Locus coeruleus LC (groupe A6) et Noyau du Tractus Solitaire NTS (A2)

- induction dans neurones TH (nz limitante synthèse des catécholamines)

NA: régule l'ingestion volontaire d'éthanol
éthanol augmente synthèse, turn-over et
libération de noradrénaline

- hypothèse de voie de projections prenant naissance dans LC et NTS impliquée dans la réponse à l'alcool

Noyau Edinger-Whesphal (Ryabinin et coll.)

Expression de c-fos induit par l'alccol dépend des recepteurs GABA A

Expression de c-fos est co-localisé avec urocortine:
mise en évidence de l'implication de ce neuropeptide
dans la réponse à l'alcool

Orbital cortex is involved in conditioned reinforcement

- 1. acquisition of cocaine-seeking behavior studied orbital cortex activation and craving upon exposure of addicts to drug-associated stimuli.**
- 2. evidence of orbital prefrontal cortex dysfunction in human drug addicts,**
- 3. animal experimental evidences suggest that addictive drugs may cause orbital cortex dysfunction and thereby contribute to the transition to drug addiction.**
- 4.even brief periods of drug exposure can lead to long-lasting functional and structural deficits associated with the OFC**

Everitt 2007

Nucleus Accumbens

plasticity in the NAc and its associated circuitry has a key role in many forms of reward-dependent learning and that the powerful reinforcing effects of drugs of abuse can hijack these circuits to produce the pathological behaviours that define addiction