



Responsable : Philippe BRÛLET (pbrulet@pasteur.fr)

Résumé

Le répertoire comportemental de l'animal nécessite l'établissement de connexions neuronales spécifiques au cours de l'embryogenèse. L'analyse de la spécification génétique et du fonctionnement des circuits neuronaux pendant l'embryogenèse est au centre de nos activités de recherche. Des outils génétiques sont développés pour une imagerie moléculaire qui permette de visualiser l'organisation synaptique fonctionnelle des circuits neuronaux pendant leur mise en place et leur maturation dans des animaux transgéniques.

Rapport d'activité

I - Analyse génétique de l'organisation synaptique fonctionnelle au cours du développement du cerveau murin

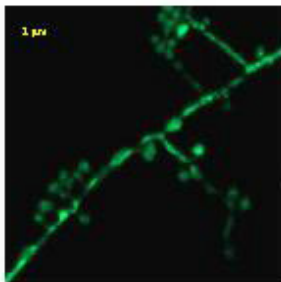
Nous avons construit des protéines hybrides entre un fragment non toxique de la toxine tétanique (TTC) et un gène rapporteur, LacZ ou GFP. Les molécules hybrides conservent les propriétés de transport rétrograde et trans-synaptique de la toxine et renseignent sur la signalisation rétrograde dans des circuits neuronaux. Les voies de signalisation antérograde et rétrograde sont essentielles à la maturation et au fonctionnement de la synapse, pendant le développement et la vie adulte. Nous cherchons à caractériser le transport rétrograde et trans-synaptique détecté par nos sondes GFP-TTC à la jonction neuromusculaire et à la synapse centrale, mais aussi dans des situations physiologiques du système nerveux en développement. Des informations sur les voies d'endocytose et de propagation des toxines dans le SNC seront aussi obtenues.

a) La jonction neuromusculaire (Sylvie Roux, Cécile Saint Cloment)

L'injection intramusculaire de ces protéines hybrides permet d'analyser les voies d'endocytose, de transport inter et intracellulaire à la jonction neuromusculaire *in vivo*. Dans le muscle, la protéine se concentre très rapidement à la jonction synaptique. Dans le motoneurone, la sonde est transportée à travers la cellule jusqu'aux dendrites puis dans les cellules nerveuses interconnectées. Dans les cellules nerveuses et musculaires, la dynamique du transport dépend très fortement de l'activité neurale pré-synaptique. Les protéines hybrides s'accrochent à leurs récepteurs membranaires, les gangliosides GT1b et GD1b ainsi qu'à une protéine p15 accrochée par une liaison GPI, puis elles sont internalisées par des vésicules de type cavéoles et transportées dans divers compartiments intracellulaires du motoneurone et du muscle; Une activité neuronale pré-synaptique encore non identifiée, module les propriétés dynamiques et structurales de microdomaines lipidiques, conduisant à une aggrégation rapide à la jonction active.

b) Caractérisation du transport rétrograde (Sylvie Roux, Cendra Agulhon, Rafael Vazquez-Martinez)

GFP-TTC permet de visualiser un transport entre une jonction musculaire active et une synapse dendritique. Cette voie de transport constitutive a été parasitée par la toxine tétanique pendant l'évolution. Nous avons émis l'hypothèse que son rôle est d'adapter la physiologie de la cellule nerveuse à l'activité des autres cellules, composantes du réseau. La vérification de notre hypothèse demande l'identification des molécules présentes dans les mêmes microdomaines lipidiques et vésicules que les récepteurs de la TTC. Nous cherchons à corréler la signalisation rétrograde réalisée par le transport de membranes à la physiologie de la cellule post-synaptique. Pour cela des stimulations électrophysiologiques et biochimiques sont appliquées aux cellules pré-synaptiques dans des coupes organotypiques de tissus nerveux.



c) Analyse génétique chez l'animal et l'embryon transgénique (Sandrine Picaud, Thomas Curie, Sylvie Roux, Rafael Vazquez-Martinez, Cécile Saint Cloment, Cendra Agulhon).

Des animaux transgéniques ont été construits dans lesquels le gène rapporteur GFP-TTC est placé sous le contrôle de promoteurs spécifiques du système nerveux central. L'imagerie du réseau neuronal est obtenue par la détection de la protéine après son transport à travers des synapses actives au sein du réseau. D'autres lignées de souris utilisant la mutagenèse dirigée et le déclenchement conditionnel pour l'expression du gène rapporteur sont en construction pour l'étude des mécanismes génétiques sous-jacents à la mise en place des réseaux au cours du développement. L'imagerie par microscopie confocale à multiphotons permet de suivre le transport intracellulaire et trans-synaptique. Cette approche d'imagerie moléculaire permettra de mieux analyser la plasticité synaptique pendant la mise en place des réseaux neuronaux.

d) Imagerie des activités neuronales dans des réseaux (Kelly Rogers)

Par analogie avec les mécanismes bioluminescents de la méduse *Aequorea victoria*, nous avons construit de nouvelles protéines bioluminescentes sensibles aux ions Ca²⁺ en fusionnant la GFP avec l'aequorine. Ces molécules peuvent être ciblées à des organelles intracellulaires ou fusionnées à des récepteurs spécifiques. Nous avons adressé le marqueur dans le compartiment pré-synaptique par sa fusion avec la synaptotagmine, protéine impliquée dans les processus d'exocytose des neurotransmetteurs. Le marqueur GFP-aequorine peut aussi être ciblé à des sous-populations de cellules nerveuses dans des expériences de transgénèse classiques ou "knock-in". Finalement, nous pourrions, grâce à la détection de ces signaux bioluminescents, visualiser des flux calciques simultanément dans un grand nombre de cellules permettant d'établir des corrélations spatiales entre les différents signaux calciques. Pour étudier les mécanismes d'apoptose qui surviennent naturellement lors de la mise en place des réseaux neuronaux moteurs et suivre la formation des connexions neuromusculaires, nous avons ciblé la protéine bioluminescente dans le locus *Hoxc-8*. Cette mutation induit une innervation défectueuse des muscles de la patte antérieure. Une étude *ex-vivo* est en cours chez l'embryon hétérozygote et homozygote.

II - Isolement de cellules souches à partir de cellules somatiques (H. Le Mouellic)

Au cours de ces dernières années, des animaux vivants ont été obtenus après transplantation de noyaux de cellules somatiques dans l'œuf. Cette technique a été couronnée de succès chez de nombreux mammifères. Par ailleurs, la fusion d'une cellule souche embryonnaire (ES)

avec une cellule somatique produit un hybride cellulaire possédant des propriétés de totipotence. Des facteurs encore non identifiés, mais localisés dans le cytoplasme de l'œuf ou exprimés dans les cellules ES, permettent de réinitialiser le programme génétique du développement et reprogramment les gènes de façon coordonnée. Ce phénomène intervient aussi naturellement, par exemple chez l'amphibien Urodèle lorsqu'une patte est sectionnée. Des cellules somatiques dédifférencient, prolifèrent et reforment de nouveaux tissus. Sachant que la reprogrammation génétique peut se faire, nous étudions la possibilité d'isoler directement des cellules souches à partir de cellules somatiques, par mutagenèse exhaustive.

Nous avons construit un nouveau vecteur rétroviral conçu pour une mutagenèse exhaustive du génome des cellules somatiques in vitro. Le système recombinase Cre/séquence loxP est utilisé de manière à éliminer la majeure partie du génome viral après intégration, ne laissant qu'un seul LTR. Celui-ci, comprenant de fortes séquences activatrices, démarre alors la transcription du gène en aval du site d'intégration. La sélection phénotypique serait permise par l'expression d'un marqueur de surface spécifique de l'état indifférencié totipotent. Le facteur de transcription Oct-4 est spécifiquement exprimé dans les cellules totipotentes de l'embryon de souris selon une régulation bimodale dans les lignées germinales et somatiques. Une séquence activatrice distale contrôle l'expression dans l'embryon pré-implantatoire, la lignée germinale ainsi que dans les cellules ES alors qu'une séquence proximale contrôle l'expression de Oct-4 dans l'épiblaste et les cellules de carcinome embryonnaire (EC). En utilisant la séquence distale de Oct-4 pour activer l'expression d'un marqueur fluorescent exposé sur la surface cellulaire, il serait possible de sélectionner, par un puissant tri magnétique, un phénotype semblable aux cellules ES. Dans la perspective de cette mutagenèse, la construction de souris transgéniques permettrait d'utiliser différents types de tissus à n'importe quel stade du développement.

Photo : *Distribution spatiale de GFP-TTC dans les épines dendritiques d'un neurone pyramidal du cortex*

Mots-clés : Neurobiologie du développement, dé-différenciation, organisation synaptique, imagerie calcique, homogène, transgénèse, cellule-souche

Publications de l'unité

> [Toutes les publications sur notre base de données](#)

Personnel

Secrétariat	Chercheurs	Stagiaires	Autre personnel
DE GROOTE Dominique (IP – Secrétaire) : degroote@pasteur.fr	BRULET Philippe (CNRS/IP - Responsable Unité) : pbrulet@pasteur.fr LE MOUELLIC Hervé (Inserm) : hervelm@pasteur.fr	CURIE Thomas (Thésard) : tcurie@pasteur.fr ROUX Sylvie (Post-doc) : sroux@pasteur.fr ROGERS Kelly (Post-doc) : krogers@pasteur.fr AGULHON Cendra (Post-doc) : agulhon@pasteur.fr VAZQUEZ-MARTINEZ Rafael (Post-doc) : rvazquez@pasteur.fr CIRIZA-ASTRAIN Jesus (stagiaire) : jciriza@pasteur.fr	PICAUD Sandrine (CNRS Assistant-Ingénieur) : spicaud@pasteur.fr SAINT CLOMENT Cécile (IP - Technicienne) : ccloment@pasteur.fr RUSSE Sophie (IP - Aide de Laboratoire) : srusse@pasteur.fr

Rapports d'activité 2002 - Institut Pasteur

 [Début de page](#)

 [Sommaire](#)

 [Portail Institut Pasteur](#)

En cas de problèmes, de remarques, ou de questions concernant cette page Web écrire à rescom@pasteur.fr