Rev. Fr. Histotechnol., 1997, **10**, n° 1, p. 87 à 92

UTILISATION COMBINEE DES METHODES D'IMMUNOHISTOCHIMIE ET D'HODOLOGIE APPLIQUEES A L'ETUDE DES PROJECTIONS MONOAMINERGIQUES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL OVIN

Yves TILLET, Martine BATAILLER, Jean-Claude THIERY et Jean THIBAULT (1)

Laboratoire de Neuroendocrinologie Sexuelle, INRA 37380-Nouzilly
(1) Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques Université Paris XII Val de Marne, 94010, Créteil

Adresse pour correspondance :
Yves TILLET, Laboratoire de Neuroendocrinologie Sexuelle, INRA-PRMD, 37380 Nouzilly

INTRODUCTION

Le système nerveux central est composé de neurones et de cellules gliales. Les premiers présentent la caractéristique d'émettre des prolongements cytoplasmiques, l'axone et les dendrites, à des distances importantes du périkaryon. Ces prolongements vont ainsi contacter des cellules cibles, neurones ou cellules musculaires, situées quelquefois à plusieurs dizaines de centimètres. Cette particularité entraîne une organisation spécifique du système nerveux en de nombreux faisceaux de fibres issus des différents groupes neuronaux. Dans ces conditions les relations morphologiques entre les terminaisons que l'on peut rencontrer dans une région donnée du cerveau et les corps cellulaires dont elles sont originaires sont difficiles à établir. Ces données sont cependant essentielles pour la compréhension du fonctionnement du système nerveux central qui passe nécessairement par la connaissance de son organisation anatomique. L'étude des projections neuronales et de leur caractérisation neurochimique peut être réalisée grâce à l'utilisation conjointe des méthodes d'hodologie et d'immunohistochimie (fig 1).

I Hodologie ou traçages des voies nerveuses

L'étude du trajet des voies nerveuses, l'hodologie (ou étude des projections neuronales) utilise une propriété intrinsèque de la cellule nerveuse: le flux axonal (1). Au sein du neurone, des mouvements de flux cytoplasmiques transportent les constituants intracellulaires et les neuromédiateurs de leur lieu de synthèse dans le périkaryon vers

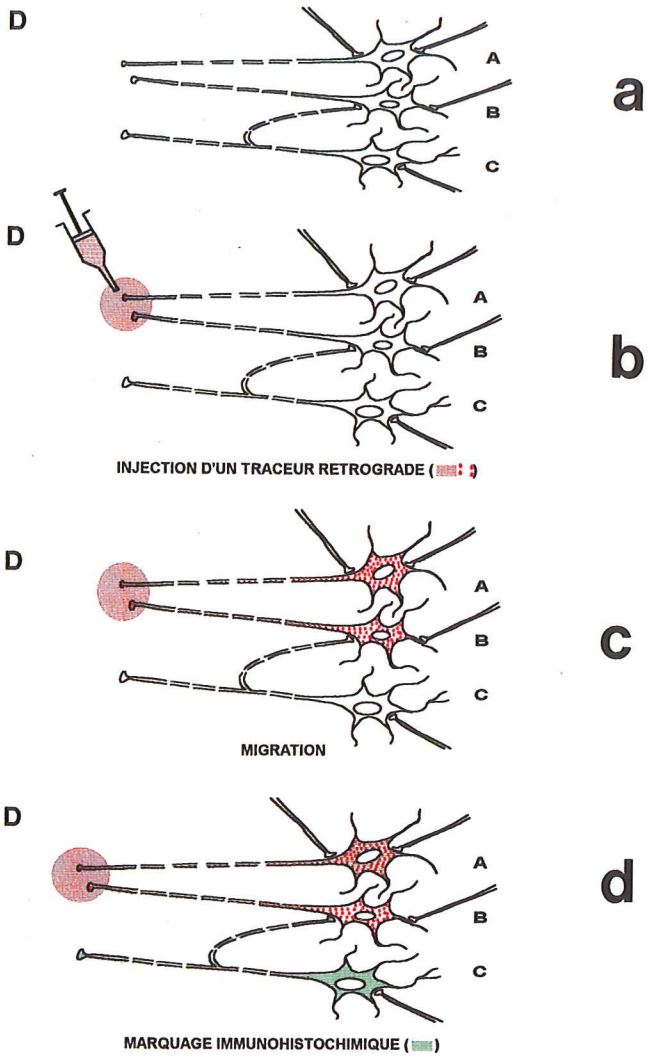

Figure 1: Représentation schématique d'un double marquage couplant l'injection d'un traceur rétrograde dans une zone de fibres en "D", suivi de l'identification des neurones "A, B, C" en immunohistochimie. Au niveau des terminaisons (1a), le traceur est injecté dans une zone restreinte (1b), il est internalisé dans le cytoplasme et migre dans l'ensemble des neurones (1c), ces derniers sont identifiés en immunohistochimie (1d). Ainsi les neurones "A" et "B" se projettent en "D", mais seul le neurone "A" est neurochimiquement identifié, le neurone "C" de même nature neurochimique que "A" se projette vers un site distinct de "D".

les terminaisons, c'est le transport "orthograde", de même, les différents métabolites transitent depuis les terminaisons jusqu'aux corps cellulaires, c'est le transport "rétrograde". Différents constituants du cytosquelette neuronal comme les microtubules et les neurofilaments servent de support morphologique à ces transports. Ainsi, toute substance injectée dans une zone de terminaisons ou de corps cellulaires, peut être internalisée dans le cytoplasme et transportée dans l'ensemble du neurone (fig. 1). C'est cette propriété qui est utilisée pour tracer et identifier les voies nerveuses. La substance utilisée doit être internalisée spécifiquement après liaison par les constituants membranaires et transportée dans la totalité du neurone sans y être dégradée ni pouvoir en ressortir par diffusion, ni être incorporée par les fibres de passage. De plus, elle doit être identifiable facilement. Les substances les plus utilisées sont les acides aminés (proline, leucine...) et les monoamines (sérotonine, catécholamines) marqués avec un atome radioactif (carbone 14 ou tritium), les lectines (de germe de blé ou de haricot...), la péroxydase du raifort seule ou couplée à d'autres molécules (lectines, particules d'or colloïdal...), et plus récemment des composés fluorescents (fluorescéine, rhodamine...) couplés ou non à des particules de latex. Dans cette dernière catégorie le fluorogold est un marqueur très utilisé depuis une dizaine d'années pour réaliser des marquages rétrogrades (2). Il présente toutes les qualités requises pour le traçage, et peut être observé en fluorescence ou en immunohistochimie à l'aide d'un anticorps spécifique.

II Identification des neurones marqués

A de rares exceptions près, comme lors de l'utilisation d'amines marquées (noradrénaline, sérotonine..), les traceurs utilisés ne renseignent pas sur la nature exacte des neurones observés. Cependant leur identification est possible par immunohistochimie sans perte du signal obtenu par les méthodes d'hodologie. Après injection du traceur et fixation du tissu, le contenu neurochimique des différents neurones marqués par le traceur est identifié en immunohistochimie à l'aide d'anticorps (fig. 1). La révélation en immunofluorescence ou en immunopéroxydase permet d'observer à la fois le traceur transporté et le marquage immunohistochimique du contenu neuronal.

Cette méthode d'identification a été utilisée dans le système nerveux du mouton pour déterminer l'origine des fibres noradrénergiques observées dans l'aire rétrochiasmatique latérale de l'hypothalamus.

III Projections noradrénergiques vers les neurones dopaminergiques du système nerveux central ovin

L'aire rétrochiasmatique située dans l'hypothalamus du mouton contient des neurones dopaminergiques (groupe A15) et de nombreuses fibres noradrénergiques dont une partie est au contact des corps cellulaires dopaminergiques. Cette observation suggère le rôle potentiel de la noradrénaline dans le contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques. Cependant, si la distribution des neurones et des terminaisons catécholaminergiques est connue dans le système nerveux central des ovins, les relations anatomo-fonctionnelles entre ces systèmes restent à déterminer. Ainsi, nous avons couplé les méthodes d'hodologie avec utilisation de fluorogold, et l'immunohistochimie des enzymes de synthèse des catécholamines, pour connaître l'origine des fibres noradrénergiques observées dans l'aire rétrochiasmatique.

Un volume de 0.2µl de fluorogold (Interchim, Montluçon) a été injecté lente-

ment par pression, en un seul site dans l'aire rétrochiasmatique latérale, sous controle stéréotaxique selon un protocole déjà décrit (3). Les animaux ont été abattus une semaine après l'injection, et le cerveau fixé par perfusion de paraformaldéhyde 4% dilué dans du tampon phosphate, puis rincé dans du saccharose à 15%. Des coupes à congélation de 40µm, flottantes, ont été réalisées dans le plan frontal. Elles ont été obtenues au niveau du site d'injection et dans le bulbe rachidien dans les zones connues pour contenir des neurones noradrénergiques, et observées au microscope à fluorescence. Alternativement, les coupes voisines ont été traitées en immunofluorescence avec un serum dirigé contre la dopamine-beta-hydroxylase (DBH), l'enzyme qui synthétise la noradrénaline à partir de la dopamine, afin d'identifier les neurones noradrénergiques.

Le site d'injection apparait comme une sphère de 2 à 3mm de diamètre, intensément fluorescente. Les neurones marqués ont été trouvés dans les parties ventrolatérale et médiodorsale du bulbe rachidien et dans la région du locus coeruleus. L'observation des coupes sous deux systèmes d'éclairage différents, le premier pour observer le fluorogold, le second pour observer la fluorescéine, a permis d'identifier les neurones contenant à la fois le traceur (fluorogold) et l'enzyme de synthèse de la noradrénaline (DBH) (fig. 2). Des neurones doublement marqués n'ont été observés que dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien. Dans la partie mediodorsale du bulbe et près du locus coeruleus, les neurones noradrénergiques et les neurones contenant le fluorogold forment deux populations distinctes.

Les fibres noradrénergiques observées au contact des neurones dopaminergiques du noyau A15 sont donc originaires du groupe A1 situé dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien comme cela a été observé chez d'autres espèces (rat, lapin..). Cependant, chez le mouton, nous avons observé des neurones marqués par le fluorogold mais pas avec l'anti-DBH, situés dans les autres groupes neuronaux connus pour être noradrénergiques. Tous ces neurones peuvent être impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones dopaminergiques du groupe A15, et leur nature neurochimique reste à déterminer à l'aide de différents anticorps.

En conclusion, l'utilisation conjointe des méthodes d'hodologie et d'immunohistochimie nous a permis d'identifier clairement les projections des neurones noradrénergiques du groupe A1 situé dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien, vers les neurones dopaminergiques de l'aire rétrochiasmatique latérale, deux structures distantes de plusieurs centimètres. Les deux marquages obtenus sont parfaitement distincts et faciles à observer sur une même coupe. L'utilisation de ces méthodes peut être envisagée et facilement mise en oeuvre pour l'étude des projections neuronales dans d'autres sites du système nerveux central ou périphérique.

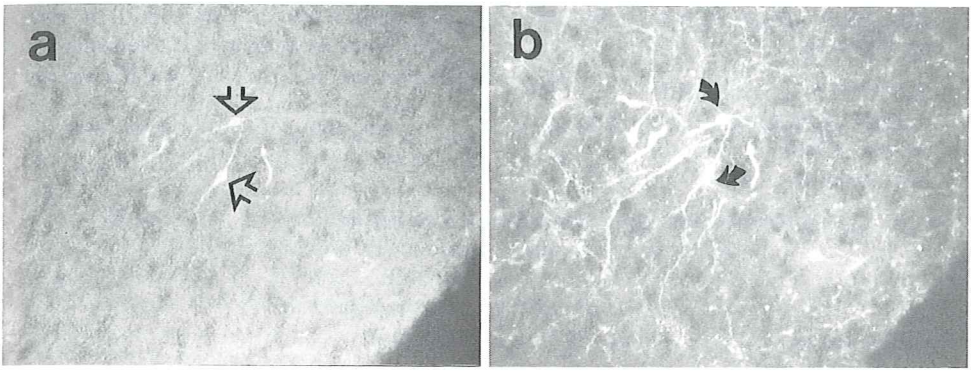

Figure 2: a, neurones marqués par le fluorogold (✍) dans la partie ventrolatérale du bulbe rachidien de mouton; b, neurones noradrénergiques (✍) marqués en immunohistochimie avec un anticorps anti-DBH, observés sur la même coupe. Noter la présence de plusieurs neurones noradrénergiques contenant le fluorogold. x52.

BIBLIOGRAPHIE

1. BRADY S.T. : Axonal transport methods and applications. In "Neuromethods. Vol 1. General Neurochemical Techniques". Eds., Boulton A.A. et Baker G.B. 1985, pp. 419-476.
2. SCHMUED L.C. et FALLON J.H. : Fluorogold : a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res. 1986, 377, 147-154.
3. BLANC M., LOCATELLI A., MALPAUX B., LEVY F. et TILLET Y. : Technique for permanent implantation of cannulae into the sheep brain. In "Handbook of Techniques of Reproductive Studies on pigs, sheep, cows, horses, chicken, goats and rabbits" Eds., Dziuk J.P. et Wheeler M.B., University of Illinois, Urbana, USA. Section VII: Sheep, 1991.