

Rôle du BDNF et des Interactions Neurogliales dans la Régulation du Sommeil Lent

Augustin Walter¹, Laure Lecoin¹, Fayçal Rezaig¹, Frédéric Chauveau²,
Nathalie Rouach¹, Armelle Rancillac¹

¹Neuroglial Interactions in Cerebral Physiopathology, Collège de France
11, place Marcelin Berthelot – Paris ; ²Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge

Introduction

Bien que le sommeil soit essentiel à la vie, ses troubles touchent encore un tiers de la population occidentale et représentent un problème majeur de santé publique en favorisant l'apparition de nombreuses autres pathologies telles que le diabète, l'hypertension ou encore la dépression. Pourtant, les mécanismes cellulaires et moléculaires de régulation du sommeil restent encore peu étudiés, en particulier au niveau du noyau préoptique ventrolatérale (VLPO), une structure clef dans la régulation du sommeil lent [1].

Récemment, il a été suggéré que les astrocytes jouent un rôle dans la régulation des états de vigilance. En effet, il a été démontré que les astrocytes peuvent moduler l'excitabilité et la synchronisation des réseaux neuronaux [2,3], en régulant la concentration extracellulaire de glutamate et l'efficacité synaptique [4]. Par ailleurs, le *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) est un facteur trophique dont le rôle dans la régulation du sommeil a également été récemment suggéré et qui pourrait favoriser la synchronisation de l'activité neuronale du VLPO en jouant sur morphologie des astrocytes. En effet, la proximité des prolongements astrocytaire aux synapses est déterminante pour l'efficacité synaptique, et serait fortement régulée par l'expression de la Connexine 30 (Cx30), une protéine astrocytaire constitutive des jonctions communicantes [5]. **L'objectif de notre étude a donc été de déterminer le mode d'action du BDNF au sein du VLPO, afin de mettre en évidence son rôle dans la régulation du sommeil lent.**

1 L'injection in vivo de BDNF dans le VLPO augmente la durée du sommeil

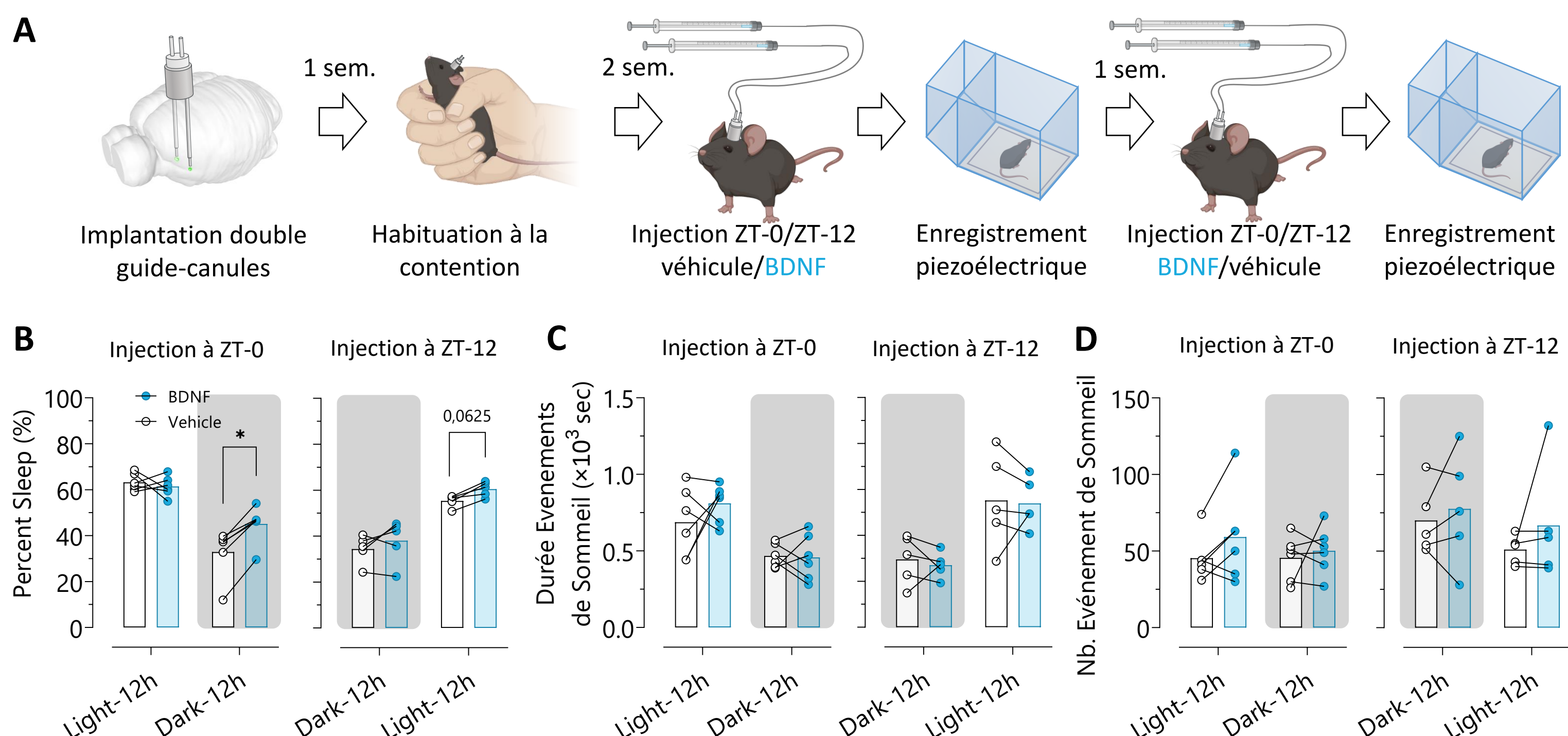


Figure 1 : Enregistrement de sommeil en cage piezoélectrique suite à l'injection in vivo de BDNF dans le VLPO. A, Protocole expérimental. B, Durée moyenne de sommeil post-injection sur une période de 12 h correspondant aux phases lumineuse et obscure ainsi que sur les 24 h d'enregistrement pour les injections à ZT-0 et à ZT-12. C, Durée des événements de sommeil (sleep bouts) en phase lumineuse et obscure (période de 12 h). D, Nombre moyen d'événements de sommeil en phase lumineuse et obscure (période de 12 h). Les valeurs représentent les moyennes sur l'ensemble des animaux, les lignes noires relient les deux valeurs mesurées sur un même animal. *P ≤ 0,050 ; Multiple Wilcoxon tests, Holm-Šidák correction.

3 Variations circadiennes du BDNF, de la taille des astrocytes et de l'espace extracellulaire

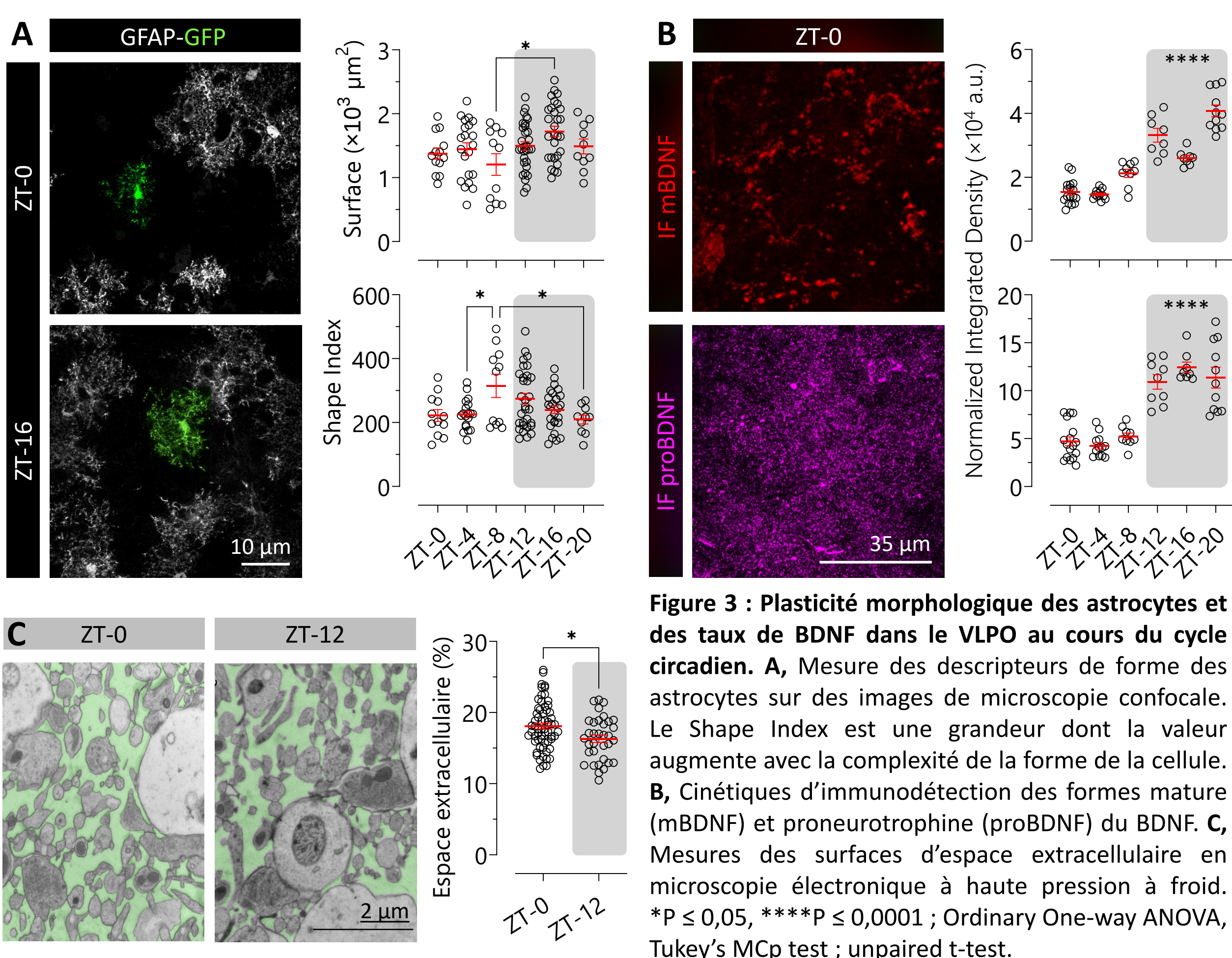


Figure 3 : Plasticité morphologique des astrocytes et des taux de BDNF dans le VLPO au cours du cycle circadien. A, Mesure des descripteurs de forme des astrocytes sur des images de microscopie confocale. Le Shape Index est une grandeur dont la valeur augmente avec la complexité de la forme de la cellule. B, Cinétiques d'immunodétection des formes mature (mBDNF) et proneurotrophine (proBDNF) du BDNF. C, Mesures des surfaces d'espace extracellulaire en microscopie électronique à haute pression à froid. *P ≤ 0,05, ****P ≤ 0,0001 ; Ordinary One-way ANOVA, Tukey's MCp test ; unpaired t-test.

5 Schéma récapitulatif

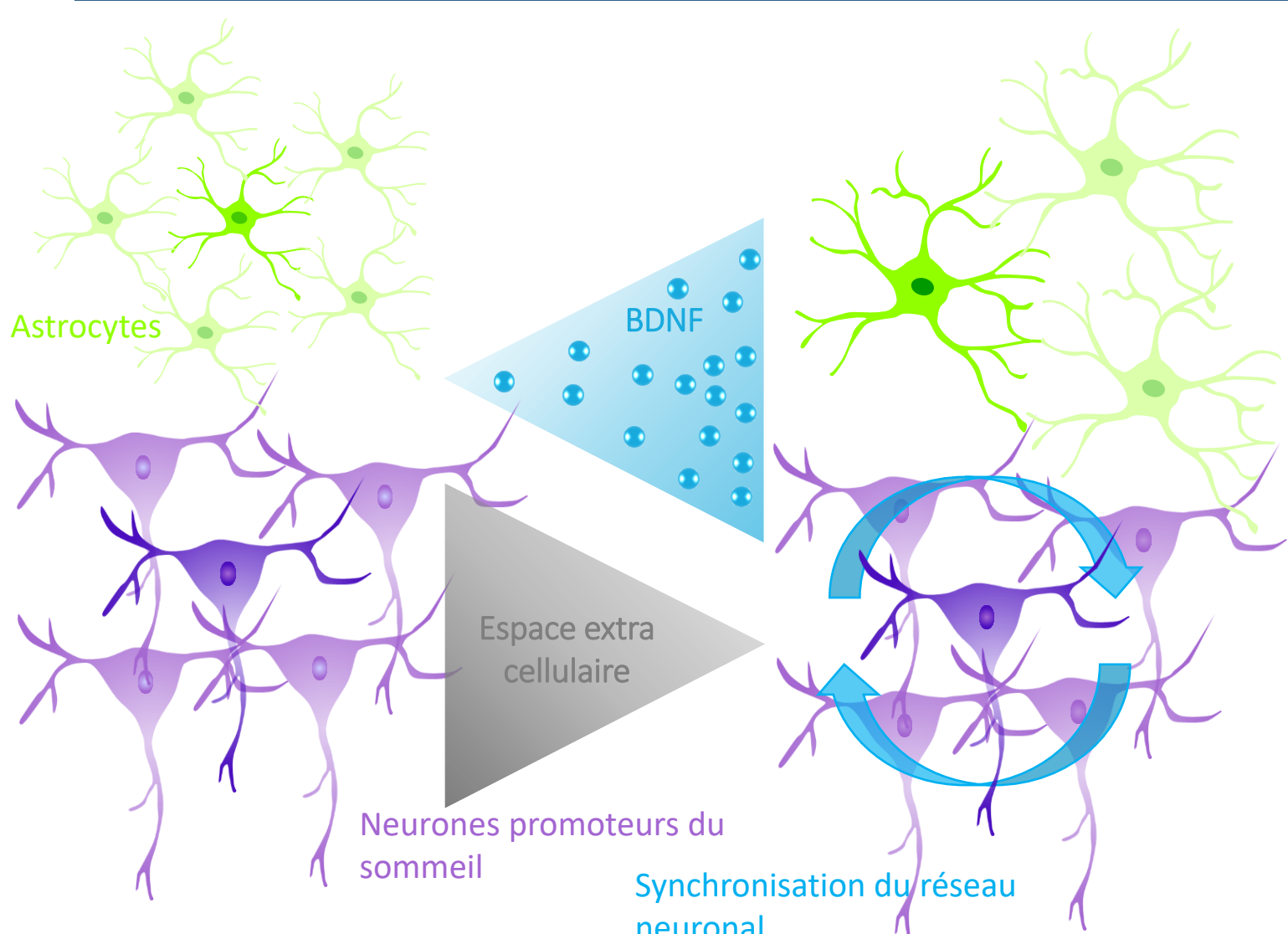


Figure 5 : L'ensemble de ce travail démontre qu'au sein du VLPO, le BDNF induit une augmentation de la taille des astrocytes, associée à une réduction de l'espace extracellulaire, qui favorise la synchronisation du réseau neuronal et par conséquent l'induction du sommeil..

Matériels et Méthodes

1) Injections bilatérales de BDNF dans le VLPO et enregistrements Piezo-électrique
Des guide-canaux ont été implantés sur des souris mâles C57BL/6 P30-40. Après 3 semaines d'habituation, des injections de BDNF et de véhicule ont été réalisées à deux moments du cycle circadien (ZT-0, quand la lumière s'allume et ZT-12, quand la lumière s'éteint). Le sommeil a été enregistré en cage Piezoélectrique (PiezoSleep, Signal Solutions) pendant 24 h.

2) Enregistrement de l'activité de réseau du VLPO

L'activité spontanée du VLPO a été enregistrée sur des tranches de cerveau de souris Gal-GFP P30-40, de 400 µm à 32 °C, en utilisant un dispositif de Matrice Multi-Electrodes (MEA, 120MEA30/10IR-ITO-gr), et de l'aCSF standard [6].

3) Analyse moléculaire et cellulaire

Des souris GFAP-GFP ou GFAP-GFP-Cx30Δ/Δ P30-40 ont été perfusées toute les 4 h du cycle circadien avec du PFA 2 %. Des coupes de VLPO de 200 µm ont été incubées 2 h avec du BDNF (concentration), puis fixées en PFA 2 %. Après immunomarquages, les tranches ont été imagées en microscopie confocale puis analysées en utilisant les logiciels FIJI (ImageJ) ou Imaris (Bitplane, Oxford Instruments).

2 Le BDNF favorise la synchronisation des réseaux neuronaux du VLPO

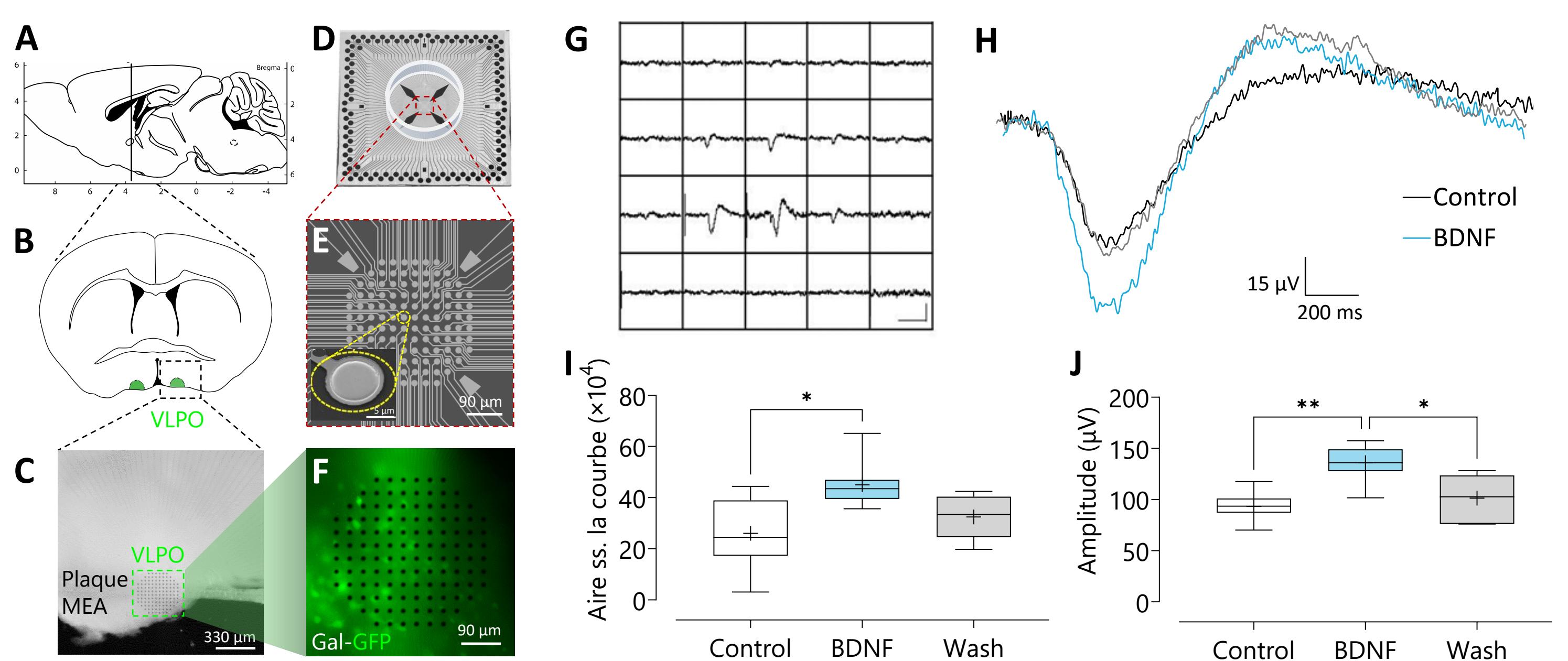


Figure 2 : Enregistrement MEA d'activité spontanée en réponse à l'application de BDNF dans le VLPO. A-B, Localisation du VLPO. C, Matrice d'électrodes (MEA) positionnée sous la région du VLPO (échelle : 2X). D-E, Photos de la matrice d'électrodes de chez multichannel systems à 120 électrodes (10 µm de diamètre et 30 µm d'espacement). Insert : zoom sur une électrode. F, Image de microscopie en fluorescence du VLPO localisée sur la matrice. G, Exemple d'une région d'enregistrement MEA d'activité spontanée (échelle 50 µV et 30 ms). H, Réponses moyennes des événements spontanés de potentiel de champ en condition contrôle (Control, n = 8, en noir), en présence de BDNF (20 ng.ml-1, n = 9, en bleu) et après 10 min de lavage (n = 15, en gris). I-J, Boîtes à moustaches illustrant l'aire sous la courbe (I, AUC) et l'amplitude des événements (J). *P ≤ 0,050, **P ≤ 0,010 ; Kruskal-Wallis test.

4 Le BDNF induit une plasticité morphologique des astrocytes dépendante de la Cx30

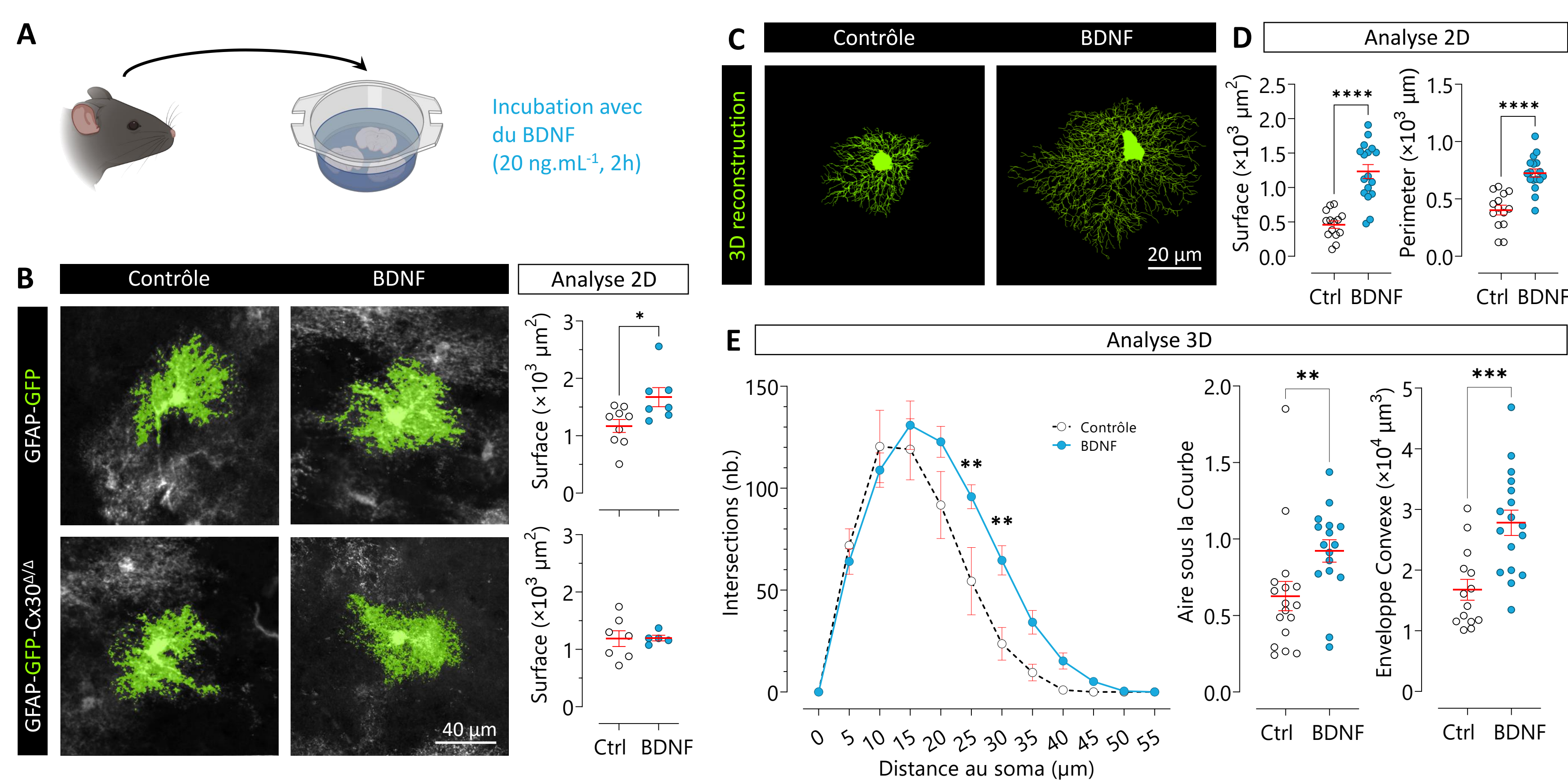


Figure 4 : Plasticité morphologique des astrocytes du VLPO dépendante de la Cx30 induite par le BDNF. A, Incubation de coupes aiguës de VLPO dans un bain de BDNF (20 ng.ml-1) ou de solution contrôle pendant 2 h. B, Images en microscopie confocale d'astrocytes de souris déficientes et non-déficientes pour la connexine 30 et analyses en 2D. C-D, Reconstitutions 3D et analyses en 2 et 3D. **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 ; Mann-Whitney test ; 2way ANOVA, Šidák's multiple comparisons test.

Conclusions et perspectives

L'ensemble de ce travail permettra d'identifier un nouveau mécanisme de régulation du sommeil, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques visant la voie de signalisation du BDNF, qui permettront d'améliorer les stratégies préventives et curatives contre les pathologies du sommeil.

En complément de ces résultats, nous envisageons d'étudier (i) la ou les sources cellulaires de BDNF, (ii) si la plasticité morphologique des astrocytes au cours des cycles circadiens est altérée chez la souris déficiente pour la Cx30, (iii) où après une exposition en lumière/obscurité constante, (iv) et si elle s'observe dans une autre structure cérébrale. De plus nous étudierons si la plasticité morphologique des astrocytes est modifiée après une expérience de privation/rebond de sommeil. Enfin, nous étudierons comment cette plasticité morphologique joue sur la proximité des prolongements astrocytaires aux synapses par imagerie à super résolution (STED).

Références

- [1] Economo, C. V. (1930), 71(3), 249–259.
- [2] Fellin, T., Halassa, M. M., Terunuma, M., Succol, F., Takano, H., Frank, M., Moss, S. J., & Haydon, P. G. (2009). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 15037–15042.
- [3] Pannasch, U., Freche, D., Dall'era, G., Ghézali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., Lübke, J. H. R., Dégion, N., Knott, G., Holtzman, D., & Rouach, N. (2014). *Nature Neuroscience*, 17(4), 549–558.
- [4] Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holtzman, D., Giaume, C., Syková, E., & Rouach, N. (2011). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8467–8472.
- [5] Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2011). (Vol. 108, Issue 45, pp. 18453–18458).
- [6] Walter, A., van der Spek, L., Hardy, E., Bemelmans, A. P., Rouach, N., & Rancillac, A. (2019). *Brain Structure and Function*, 224(9), 3045–3057.